

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jovana B. Ajdarić

**PRIMENA VEŠTAČKIH NEURONSKIH
MREŽA U OPTIMIZACIJI PROCESA
LIOFILIZACIJE U PROIZVODNJI
ESOMEPRAZOL PRAŠKA ZA RASTVOR
ZA INJEKCIJU/INFUZIJU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jovana B. Ajdarić

**APPLICATION OF ARTIFICIAL NEURAL
NETWORKS IN THE OPTIMIZATION OF
LYOPHILIZATION PROCESS IN THE
PRODUCTION OF ESOMEPRAZOLE
POWDER FOR SOLUTION FOR
INJECTIONS/INFUSIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Sandra Cvijić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Danina Krajišnik, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ljubiša Ignjatović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

Dr sc. Aleksandra Catić Đorđević, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu – Medicinski fakultet

Mentor

1. _____

Dr sc. Svetlana Ibrić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentor

2. _____

Dr sc. Branka Ivković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane _____

Primena veštačkih neuronskih mreža u optimizaciji procesa liofilizacije u proizvodnji esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je definisanje kritičnih parametara proizvodnje i optimizacija procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg postupkom liofilizacije, kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet uvećane serije leka tokom roka upotrebe. Istraživanje se sastojalo iz tri dela.

U prvom delu istraživanja ispitana je kinetika degradacije lekovite supstance esomeprazol-natrijum u farmaceutskom obliku prašak za rastvor za injekciju/infuziju, izvršena je identifikacija nečistoća koje su posledica degradacije lekovite supstance i ispitana je stabilnost rekonstituisanog proizvoda. U ovom delu istraživanja je utvrđen uticaj faktora formulacije, kritičnih proizvodnih koraka i kritičnih delova opreme/sistema na mogućnost dobijanja stabilnog gotovog proizvoda uvećanih serija (*scale-up* sa 17.000 na 33.000 bočica). Detaljno su ispitane fizičko-hemijske karakteristike i mikrobiološki kvalitet uvećanih serija kod kojih je varirana temperatura kojoj su izložene napunjene bočice pre početka programa liofilizacije od 20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C (korak pre-zamrzavanja). Ispitano je i maksimalno vreme koje delimično zatvorene napunjene bočice rastvorom esomeprazola mogu da provedu od trenutka punjenja do momenta početka liofilizacije na navedenim temperaturama. Utvrđeno je da punjenje liofilizatora na temperaturi polica od -30 °C u poređenju sa temperaturom od 20 °C, značajno produžava vreme za koje rastvor esomeprazola ostaje stabilan i bez promena njegovih fizičko-hemijskih i mikrobioloških karakteristika. Pre-zamrzavanje na temperaturi od -30 °C je dovoljno da obezbedi direktno zamrzavanje rastvora u svim bočicama, pri čemu rastvor postaje inertan i na taj način sprečava da dođe do snižavanja pH vrednosti usled izlaganja rastvora kiseoniku. Dobijeni rezultati su potvrdili da definisani parametri procesa i ispitivanje u toku procesa, zajedno sa korakom pre-zamrzavanja, obezbeđuju pouzdanu i ponovljivu proizvodnju esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, ispunjavajući sve unapred definisane attribute kvaliteta i specifikacije za finalni proizvod.

U drugoj fazi, na osnovu dobijenih podataka o proizvodu i procesu proizvodnje iz prve faze istraživanja, primenom *Quality by design* (QbD) koncepta, u okviru FMEA (engl. *Failure Mode and Effects Analysis* - Analiza efekata u slučaju neizvršenja (FMEA)) analize rizika, definisani su svi CQA (engl. *Critical Quality Attributes* - kritični atributi kvaliteta (CQA)) sa najvećim RPN skorom (engl. *Risk Priority Number* – prioritetni broj rizika (RPN)). Na osnovu CQA, najkritičnijih za postizanje željenog kvaliteta esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, procenjene su sve varijable formulacije i proizvodnog procesa koje potencijalno mogu uticati na dobijanje rezultata izvan specifikacije. One promenljive formulacije i procesa za koje je pokazano da je obezbeđen odgovarajući kvalitet proizvoda su izostavljene iz daljeg razmatranja. Sa druge strane, temperatura (sobna temperatura, temperatura polica, temperatura zamrzavanja) kojoj je proizvod izložen, kao i vremensko trajanje ove izloženosti (vreme zadržavanja), koje su korelirane kao kritični parametri procesa sa promenama pH vrednosti rastvora kao CQA, uz sadržaj esomeprazola i srodnih supstanci, su dalje razmatrani i korišćeni su kao ulazni podaci za definisanje *design space*-a (prostor za dizajniranje kvaliteta). Za treniranje veštačke neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (engl. *Multi Layer Perceptron* - MLP) korišćenjeni su rezultati 32 eksperimentalne probe iz prve faze. Mreža koja najbolje opisuje uticaj navedenih ulaznih promenljivih na pH vrednost rastvora je odabrana, a na osnovu dobijenih rezultata definisan je *design space* za liofilizaciju uvećanih serija koji opisuju granice temperature polica (-10 °C do -30 °C) i vreme koje delimično zatvorene bočice mogu da provedu izložene vazduhu (5 – 26 h), a da pH vrednost rastvora ostane u granicama specifikacije (pH 10,8-11,8).

U trećoj fazi istraživanja uspostavljen je model veštačke neuronske mreže, koji je u stanju da predvidi sadržaj esomeprazola i profil nečistoća u zavisnosti od pH vrednosti finalnog proizvoda, za 36 meseci

roka upotrebe, kao i da odredi granicu pH vrednosti koja će obezbediti željeni kvalitet proizvoda tokom ovog perioda. MLP mreža, kao alat za učenje, u kojem su pH vrednost rastvora esomeprazola i vreme skladištenja u mesecima bili ulazni podaci za mrežu, a sadržaj esomeprazola i nečistoće rezultati mreže, omogućio je odlično predviđanje i slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata i uspostavljanje željenog *design space*-a procesa liofilizacije. Krajnji rezultat je bio *design space* koji opisuju granice pH vrednosti rekonstituisanog proizvoda (pH 10,4-10,6), u kome će se sadržaj esomeprazola i svih nečistoća nalaziti u okviru specifikacija tokom definisanog roka upotrebe proizvoda od 36 meseci.

Ključne reči: esomeprazol, liofilizacija, pH vrednost proizvoda, pre-zamrzavanje, stabilizacija, QbD, temperatura, srodne supstance, sadržaj, veštačke neuronske mreže.

Application of artificial neural networks in the optimization of lyophilization process in the production of esomeprazole powder for solution for injections/infusions

Abstract

The goal of this research was to define critical production parameters and optimize the lyophilization process in the production of esomeprazole 40 mg powder for solution for injection/infusion, which will ensure the quality of the drug of the enlarged batches during the declared shelf life. The research consisted of three parts.

In the first part of the research, the kinetics of the degradation of the active pharmaceutical ingredient (API) esomeprazole sodium in the pharmaceutical form of lyophilisate for injections was examined, where the impurities resulting from the degradation of the API were identified and the stability of the reconstituted product was examined. In this part of the research, the influence of formulation factors, critical production steps and critical parts of the equipment/system on the possibility of obtaining a stable finished product of an enlarged batches (scale-up from 17,000 to 33,000 vials) was also determined. The physico-chemical and microbiological results obtained for the scale-up batches, where the temperature to which the filled vials were exposed after filling and before the start of the lyophilization program was varied from 20°C, -5°C, -15°C, -30°C (pre-freezing step), were examined. The maximum time that partially closed vials filled with esomeprazole solution can spend from the moment of filling, to the moment of lyophilization, at the given temperatures, was also tested. It was found that filling the lyophilizer at a shelf temperature of -30°C, compared to a temperature of 20°C, significantly increases the time for which the esomeprazole solution remains stable and without changes in its physicochemical and microbiological characteristics. Pre-freezing at a temperature corresponding to that of the first step of the lyophilization program (freezing step - at a temperature of -30°C), is sufficient to ensure direct freezing of the solution in all vials, whereby the solution becomes inert and prevents pH decrease due to exposure to oxygen. The results obtained in this way confirmed that the defined process parameters and in-process testing, together with the pre-freezing step, ensure reliable and reproducible production of esomeprazole lyophilisate for solution for injection/infusion, meeting all predefined quality attributes and specifications for the final product.

In the second phase, based on the knowledge about the product and the production process from the first phase of research, applying the Quality by design (QbD) concept, within the FMEA (Failure Mode and Effects Analysis) risk analysis, all CQAs (Critical Quality Attributes) with the highest RPN score (risk priority number) are defined. Based on CQA, the most critical for achieving the desired quality of esomeprazole powder for solution for injection/infusion, all formulation and manufacturing process variables that could potentially affect obtaining results outside the specification were evaluated. Those formulations and process variables for which there is a proven assurance of good control and a positive experience in ensuring adequate product quality, are omitted from further consideration. On the other hand, the temperature (room temperature, shelf temperature, freezing temperature) to which the product is exposed, as well as the duration of this exposure (holding time), which were correlated as critical process parameters with changes in the pH value of the solution as CQA, and also with assay of esomeprazole and related substances, were further considered and used as input data to define the design space. An artificial neural network with multi-layer perceptron (MLP) was trained using the results of 32 experimental trials from the first phase. The network that best describes the influence of these input variables on the pH value of the solution was selected, and based on the obtained results, a design space was defined for the lyophilization of scale-up batches that describe the shelf temperature limits (-10°C to -30°C) and the time that partially closed vials can spend exposed to air (5-26h), while the pH value of the solution remains within the specification limits (10.8-11.8).

In the third phase of the research, an artificial neural network model, which is able to predict the assay of esomeprazole and the profile of impurities depending on the pH value of the final product, for 36

months of storage, was established. Additionally, the limit of the pH value that will ensure the desired quality of the product during this storage period was determined. The MLP network, as a deep learning tool, in which the pH value of the esomeprazole solution and the storage time in months were input to the network, and the assay of esomeprazole and impurities were the results of the network, enabled excellent prediction and matching of experimentally obtained and predicted results and establishment of the desired design space of the lyophilization process. The end result was a design space that describes the pH limits of the reconstituted product (10.4-10.6), which will keep all impurities, including the esomeprazole assay, within specifications during the product's declared shelf life of 36 months.

Key words: esomeprazole, lyophilization, pH value of the product, pre-freezing, stabilisation, QbD, temperature, related substances, assay, artificial neural network.

Sadržaj

| | | |
|---------|---|----|
| 1.0 | Opšti deo | 1 |
| 1.1 | Uvod..... | 1 |
| 1.2 | Inhibitori protonske pumpe..... | 5 |
| 1.2.1 | Mehanizam dejstva i farmakokinetika inhibitora protonske pumpe..... | 5 |
| 1.2.2 | Esomeprazol..... | 8 |
| 1.3 | Postupak proizvodnje parenteralnih preparata u industrijskim uslovima proizvodnje | 10 |
| 1.4 | Liofilizacija | 13 |
| 1.4.1 | Zamrzavanje..... | 13 |
| 1.4.2 | Sušenje | 15 |
| 1.5 | Kvalitet gotovog proizvoda – Stabilnost..... | 17 |
| 1.5.1 | Tipovi ispitivanja stabilnosti..... | 17 |
| 1.5.2 | Poreklo i ispitivanje nečistoća..... | 18 |
| 1.6 | Optimizacija procesa proizvodnje i <i>scale-up</i> | 19 |
| 1.7 | Farmaceutski razvoj | 21 |
| 1.7.1 | Upravljanje rizicima..... | 22 |
| 1.7.2 | Analiza efekata u slučaju neizvršenja | 23 |
| 1.8 | Veštačke neuronske mreže | 25 |
| 1.8.1 | Arhitektura veštačkih neuronskih mreža..... | 27 |
| 1.8.2 | Učenje/trening veštačkih neuronskih mreža | 28 |
| 1.8.3 | Algoritmi za učenje veštačkih neuronskih mreža | 28 |
| 1.8.3.1 | Algoritam za propagaciju unatrag..... | 28 |
| 2.0 | Cilj istraživanja | 30 |
| 3.0 | Eksperimentalni deo..... | 31 |
| 3.1 | Materijali | 31 |
| 3.2 | Metode..... | 33 |
| 3.2.1 | Ispitivanje stabilnosti | 33 |
| 3.2.2 | Analitičke metode u ispitivanju gotovog proizvoda | 35 |
| 3.2.2.1 | Analitičke metode u ispitivanju liofiliziranog proizvoda | 35 |
| 3.2.2.2 | Analitičke metode u ispitivanju rekonstituisanog proizvoda..... | 37 |
| 3.2.3 | Ispitivanje prisustva R-enantiomera API esomeprazol..... | 43 |
| 3.2.4 | Procena rizika..... | 44 |
| 3.2.4.1 | Preliminarna analiza rizika..... | 44 |
| 3.2.4.2 | Analiza efekata u slučaju neizvršenja | 44 |
| 3.2.5 | Uspostavljanje design space-a | 47 |
| 3.2.6 | Izgradnja i primena veštačke neuronske mreže | 47 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.0 | Rezultati i diskusija | 48 |
| 4.1 | Ispitivanje kinetike degradacije API, studija stabilnosti i analiza uticaja faktora kritičnih za dobijanje stabilnog gotovog proizvoda | 48 |
| 4.1.1 | Proizvodnja i ispitivanje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju | 48 |
| 4.1.2 | Karakterizacija nečistoća u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju..... | 58 |
| 4.1.3 | Formalna studija stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju..... | 67 |
| 4.1.3.1 | Procena stabilnosti | 68 |
| 4.1.3.2 | Zaključak formalnih studija stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju | 73 |
| 4.1.4 | Analiza uticaja kritičnih faktora na dobijanje stabilnog gotovog proizvoda uvećane serije | 75 |
| 4.2 | Primena Quality by design koncepta u optimizaciji procesa proizvodnje esomeprazol praška za injekciju/infuziju..... | 80 |
| 4.2.1 | Analiza rizika i razvoj strategije kontrole kritičnih faktora za dobijanje stabilnog proizvoda..... | 80 |
| 4.2.2 | Razvoj design space-a procesa liofilizacije | 84 |
| 4.3 | Primena algoritma učenja za predviđanje profila stabilnosti esomeprazol praška..... | 86 |
| 4.3.1 | Ispitivanja sprovedena za esomeprazol prašak | 86 |
| 4.3.2 | Analiza uticaja pH vrednosti na stabilnost lekovitog proizvoda..... | 87 |
| 4.3.3 | Pregled rezultata stabilnosti | 91 |
| 4.3.3.1 | Pregled rezultata ispitivanja sadržaja esomeprazola i srodnih supstanci dobijenih tokom studija stabilnosti | 91 |
| 4.3.4 | Izgradnja i primenu veštačke neuronske mreže u predviđanju sadržaja esomeprazola i profila nečistoća u zavisnosti od pH i vremena trajanja kondicioniranja | 96 |
| 5.0 | Zaključak..... | 100 |
| 6.0 | Literatura | 103 |
| 7.0 | Biografija autora..... | 108 |
| | Изјава о ауторству..... | 109 |
| | Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторскограда | 110 |
| | Изјава о коришћењу..... | 111 |

1.0 Opšti deo

1.1 Uvod

Proces liofilizacije, odnosno "sušenje zamrzavanjem", je proces sušenja nestabilnih farmaceutskih supstanci osetljivih na toplotu u cilju očuvanja njihove osnovne hemijske strukture i biološke aktivnosti. Proizvod koji nije stabilan kao rastvor ili sadrži značajnu količinu vode, suši se zamrzavanjem radi uklanjanja vode koja može biti hemijski aktivna i dovesti do nestabilnosti proizvoda. Cilj ovog procesa je da se obezbedi finalni proizvod koji je stabilan, lako se rekonstituiše i pruža prihvatljivu hemijsku ili biološku aktivnost za predviđenu namenu. Proces liofilizacije uključuje pripremu materijala, njegovo zamrzavanje, a zatim uklanjanje vode kombinacijom sublimacije i desorpcije [1]. Na stabilnost rastvora pre procesa liofilizacije mogu uticati: temperatura, izloženost svetlu, pH rastvora, prisustvo konzervansa, koncentracija API¹, prisustvo kiseonika i uslovi čuvanja [2]. Sve navedene faktore treba dobro poznavati i razumeti pre nego što se odabere formulacija za proizvodni proces koji uključuje liofilizaciju.

Zamrzavanje je često najkritičniji deo liofilizacije i ima uticaj na proces koji sledi, kao i na karakteristike finalnog proizvoda (tj. fizičku stabilnost, izgled liofiliziranog kolača, zaostalu vlagu, vreme rekonstitucije) [3]. Faktori koji u najvećoj meri mogu uticati na stabilnost proizvoda tokom procesa zamrzavanja su: promene pH vrednosti, dehidratacija, promena jonske jačine i formiranje međuprostora između vode i leda [4, 5]. Na fizičku stabilnost utiču: pH, temperatura, jonska jačina, zamrzavanje-odmrzavanje, koncentracija API i različite vrste mehaničkog *stresa* [6]. Voda ili drugi rastvarači koji kristališu tokom zamrzavanja uklanjaju se sublimacijom, do koje dolazi kada zamrznuta tečnost pređe direktno u gasovito stanje bez prolaska kroz tečnu fazu. Nizak sadržaj zaostale vode ili drugog rastvarača, koji je neophodan da bi se obezbedila prihvatljiva stabilnost proizvoda, postiže se desorpcijom [1].

Sa gledišta uvećanja serije (engl. *scale-up*), procesi liofilizacije ostaju izazov koji zahteva detaljnu karakterizaciju laboratorijskih i komercijalnih liofilizatora i programa za liofilizaciju, kao i razumevanje celokupnog proizvodnog procesa. Tu važnost dizajniranja kvaliteta (engl. *Quality by design-a* (QbD)), sistemskog pristupa razvoju zasnovanog na upravljanju rizikom kvaliteta, posebno dolazi do izražaja. Pristup QbD razvoju farmaceutskih proizvoda počinje sa unapred definisanim ciljevima i naglašava razumevanje proizvoda i procesa i kontrolu procesa. Kritični elementi QbD-a su prostor za dizajniranje kvaliteta (engl. *design space* - DS) i tehnologija za analizu procesa (engl. *Process analytical technology* - PAT) [7]. Prema "*ICH Q8 Pharmaceutical Development Guidance*" [8], DS je višedimenzionalna kombinacija ulaznih varijabli i parametara procesa za koje je dokazano da pružaju garanciju kvaliteta proizvoda. Za farmaceutski razvoj koji primenjuje QbD pristup, tri ključna elementa, kritični atributi kvaliteta (engl. *Critical Quality Attributes* - CQA), kritični parametri procesa (engl. *Critical Process Parameters* - CPP) i kritični atributi materijala (engl. *Critical Material Attributes* - CMA), se koriste u farmaceutskoj industriji. CQA su fizička, hemijska, biološka ili mikrobiološka svojstva ili karakteristike koje bi trebale biti u okviru odgovarajuće specifikacije, kako bi se osigurao željeni kvalitet proizvoda. CPP su parametri procesa čija varijabilnost utiče na CQA i stoga ih treba pratiti ili kontrolisati kako bi se osigurao proizvod željenog kvaliteta. CMA su atributi polaznih materijala čija varijabilnost utiče na CQA i stoga ih treba pratiti ili kontrolisati kako bi se osiguralo dobijanje proizvoda željenog kvaliteta. Sva tri entiteta (CQA, CPP i CMA) treba utvrditi da bi se razvio proizvod željenog kvaliteta [8]. U tu svrhu treba sprovesti procenu rizika radi identifikacije i rangiranja parametara procesa koji mogu uticati na CQA na osnovu naučnih saznanja, eksperimenata i razviti efikasne strategije kontrole kako bi se rizici sveli na prihvatljiv nivo. S druge strane, PAT je

¹ API – eng. Active Pharmaceutical Ingredient – skraćenica koja se najčešće koristi za lekovitu supstancu u farmaceutskoj industriji

sastavni deo QbD-a, koji se oslanja na praćenje i kontrolu procesa u realnom vremenu, kao deo sveukupne strategije kontrole.

Podaci dobijeni tokom razvoja proizvoda i procesa proizvodnje, prema QbD pristupu, mogu se koristiti za dobijanje željenog DS-a, koji daje mogući radni opseg za optimizaciju postupka liofilizacije. Kontrola i verifikacija procesa na nivou proizvodnje (uvećanih *scale-up* serija) moguća je na osnovu studija sprovedenih na reprezentativnom laboratorijskom modelu, a uz korišćenje pomenutih znanja baziranih na naučnim principima i pristupu zasnovanom na upravljanju rizikom. Matematički proračuni se mogu koristiti za konstruisanje i validiranje granica DS-a. Drugim rečima, optimizaciju procesa liofilizacije treba obezbediti pomoću CQA, CPP i CMA, u okviru DS-a i uz pomoć PAT [9, 10].

Iako se primarnom sušenju i dalje pridaje najveća pažnja iz perspektive optimizacije procesa liofilizacije i *scale-up*-a, kritičnost koraka zamrzavanja u dizajnu, razvoju, optimizaciji i *scale-up*-u procesa liofilizacije sve više se ističe [3]. Dizajn procesa zamrzavanja (održavanje na temperaturi izvan opsega temperature zamrzavanja ili kontrolisana nukleacija leda) indirektno utiče na mehanizam zamrzavanja, što se dalje može odraziti na performanse procesa i na kvalitet proizvoda [3]. Posebno se naglašava postupak jednostavnog držanja proizvoda pod temperaturnim uslovima iznad krajnje temperature zamrzavanja u određenom periodu, koje se obično koristi za kontrolu temperature zamrzavanja radi kristalizacije komponenti sa poboljšanim kristalinitetom [4, 10]. Studija Howard i sar. je pokazala suprotno u odnosu na do tada poznate činjenice, da bi veća brzina zamrzavanja trebalo da rezultira manjim kristalima leda koji uzrokuju manji mehanički *stres* na čestice. Pokazalo se da se bolja redispersibilnost može postići sa temperaturom zamrzavanja na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nego sa nižom temperaturom od $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) i da, iako sporija brzina zamrzavanja na toj temperaturi nije značajno uticala na promenu veličine čestica, to može smanjiti promenu u raspodeli veličina čestica [11]. Što se tiče temperature zamrzavanja, ističe se činjenica da se ne kontroliše temperatura proizvoda direktno, već da se najpre radi o temperaturi polica liofilizatora i ukazuje se na važnost postojanja odgovarajuće bezbedonosne margine unutar DS-a, što znači da zadata tačka treba da bude daleko od maksimalne temperature koju proizvod može da podnese bez uticaja na kvalitet proizvoda [12]. Ovo ukazuje na to da je DS zasnovan na uobičajenom ponašanju proizvoda, zbog čega se predlaže da se na osnovu uticaja varijacija unutar serije i razlike u uvećanim serijama definišu stroge granice. Kvantitativni rezultati dobijeni na ovaj način bi se dalje uključili u procenu DS-a [13-15], sa strožijim granicama koje se definišu kao sama temperatura kolapsa i koja je određena pouzdanom tehnikom [16]. S druge strane, DS za sušenje zamrzavanjem može biti dobijen uzimanjem u obzir nesigurnosti parametara modela, kao i varijabilnosti parametara u bočicama u liofilizatoru i heterogenost serije, bez potrebe za prevelikom sigurnosnom marginom pri izboru uslova rada za očuvanje kvaliteta proizvoda [17]. Proučavana je takođe kontrola nukleacije i kristalizacije leda tokom koraka zamrzavanja za proteinske lekove. Primenjene su različite metode zamrzavanja i procenjen je uticaj zamrzavanja na ostatak procesa proizvodnje i kvalitet krajnjeg proizvoda [4]. Kao rezultat toga, date su smernice za izbor optimalne temperature polica i pritiska u komori potrebnih za postizanje ciljne temperature proizvoda bez prekomernog prenosa toplote i/ili mase u samom liofilizatoru [4]. S tim u vezi, Shivkumar i sar. predstavili su besplatno dostupan alat za simulaciju i optimizaciju liofilizacije pod imenom LyoPRONTO, koji se sastoji od kalkulatora zamrzavanja i primarnog sušenja, generatora DS-a i optimizatora primarnog sušenja [18]. Ovaj alat je dizajniran da odredi profil za pritisak u komori i/ili temperaturu police unutar ograničenja opreme, proizvoda i praktičnih ograničenja [18]. Takođe kada je reč o *scale-up*-u procesa liofilizacije, računarska dinamika fluida (engl. *Computational Fluid Dynamics* - CFD) je korišćena za proučavanje i predviđanje nezavisnih promenljivih (temperature polica i pritiska u komori) i promenljivih odgovora (otpore osušenog proizvoda na sublimaciju vodene pare, temperature proizvoda i vremena primarnog sušenja) za datu formulaciju za laboratorijski i pilot liofilizator, kako bi se konstruisao prediktivni DS za razvoj robusnog procesa liofilizacije uvećane veličine serije [19]. U studiji De-Luca i sar. [20], pravilno kalibrisani dvozonski model procesa liofilizacije korišćen je za dizajniranje optimalnih eksperimenata za brzu procenu parametara modela

primarnog sušenja. U ovom modelu, svi statistički ključni parametri prenosa toplote i mase su procenjeni korišćenjem jednog, optimalno dizajniranog eksperimenta. Rezultati su pokazali da predložena metodologija može značajno olakšati eksperimentalnu fazu, čime se ubrzava razvoj operacija sušenja zamrzavanjem, sa glavnim akcentom na kalibraciju modela u slučaju transfera/*scale-up*-a proizvoda [20]. Liu i sar. [21] predložili su postupak optimizacije tehnologije proizvodnje liofiliziranog praška ginkolida B. Optimizovani proces liofilizacije dobijen je ortogonalnim dizajnom, pri čemu su kvalifikovani izgled proizvoda i sadržaj preostale vlage korišćeni kao dva indeksa evaluacije, a sledeće četiri stavke su bile faktori istraživanja:

I: temperatura zamrzavanja, brzina hlađenja i trajanje;

II: promene temperature tokom primarnog sušenja, sa gradijentom zagrevanja od 0,1 °C/min;

III: vreme primarnog sušenja i pritisak;

IV: temperatura sekundarnog sušenja i pritisak sušenja [21].

Fokusiranjem na metod za optimizaciju procesa liofilizacije, ne treba zanemariti samu API i celokupnu formulaciju lekova, jer kao što je pomenuto, mogu biti izloženi različitim stresnim uslovima, koji uključuju promenu pH, dehidrataciju, povećanu jonsku jačinu, formiranje granične površine voda/led i promene temperature tokom procesa liofilizacije. Izbor pravih stabilizatora stoga može biti presudan ne samo za poboljšanje stabilnosti leka, već može uticati i na parametre procesa liofilizacije. Posebno se ističe da kombinacija često korišćenih (trehaloza, saharoza) i novih stabilizatora (fenilalanin, leucin, arginin) može doprineti poboljšanoj stabilnosti leka, posebno pod agresivnim uslovima sušenja, što može dovesti do vremenski i novčano isplativije liofilizacije [22]. Pored toga, povećanjem broja ekscipijenasa koji mogu biti korišćeni u formulacijama liofiliziranih lekova, uvođenjem novih sistema kontejnera, pružajući sveobuhvatnije razumevanje mehanizama stabilizacije i primenom QbD-a, razvoj poboljšanih formulacija i dizajn optimizovanog procesa je umnogome olakšan, što rezultira poboljšanjem kvaliteta proizvoda [23].

Optimizacija procesa proizvodnjeesomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg neophodna je zbog nestabilnosti rastvora leka, koja je prvenstveno posledica osetljivosti API na kiseonik. Aktivna supstanca je (S)-enantiomer omeprazola i nalazi se u obliku natrijumove soli, esomeprazol-natrijum. Inhibitor je protonske pumpe i terapijsku primenu nalazi u lečenju dispepsije, peptičkog ulkusa, gastroezofagealne refluksne bolesti i *Zollinger-Ellison*-ovog sindroma.

Esomeprazol-natrijum je hemijski nestabilno jedinjenje, što iziskuje da se na samom početku razvoja formulacije ispita njegova stabilnost i sprovede studija forsirane degradacije, kako bi se definisali potencijalni degradacioni proizvodi, kao i putevi degradacije [24-27]. Hemijska struktura jedinjenja kao i dostupni literaturni podaci ukazuju da je ovo jedinjenje izuzetno nestabilno: osetljivo na toplotu, oksidaciju i kiselu hidrolizu. Pod uticajem navedenih faktora nastaje veliki broj degradacionih proizvoda. Glavni degradacioni proizvodi esomeprazola javljaju se u uslovima termičke i oksidativne degradacije [27]. Evropska farmakopeja (engl. *European Pharmacopoeia* - Ph. Eur.) navodi devet nečistoća esomeprazol-natrijuma, koje bi se na osnovu potencijalnih puteva degradacije mogle podeliti u nekoliko grupa [28]. Nečistoće (engl. *Impurity* - Imp) vezane za proces (Imp. A, Imp. B, Imp. C, Imp. D, Imp. E, Imp. F, Imp. G, Imp. H, Imp. I); degradacioni proizvodi nastali pod dejstvom povišene temperature (nečistoće A, B, C, D, E, F, G, H); proizvodi kiselo katalizovane degradacije (nečistoće C, D, F, G, H); proizvodi bazno katalizovane degradacije (nečistoće A, B, C, D, F, G); proizvodi fotodegradacije (nečistoće A, D, F, G) i proizvodi oksidativne degradacije (nečistoće D, F, G). Brändström i sar. su potvrdili postojanje prethodno pomenutih nečistoća u svojem opsežnom istraživanju [29]. Brezizka je dokazao degradaciju omeprazola u čvrstom stanju pri uslovima povišene temperature i povišene relativne vlažnosti [30]. Dokazano je da API podleže hidrolitičkoj degradaciji u kiseloj, baznoj i neutralnoj sredini, kao i oksidativnoj degradaciji, dajući ukupno 16 degradacionih proizvoda, koji su okarakterisani primenom LCMS/MS metode [31-32]. Dosadašnji podaci iz literature koji se odnose na studije forsirane degradacije ukazuju da su pH, temperatura i kiseonik ključni faktori za stabilnost esomeprazola, od kojih pH igra najvažniju ulogu. Baishya i sar.

[33] su uporedili ciklus procesa liofilizacije između laboratorijske i proizvodne veličine serije kako bi se razvila stabilna liofilizirana injekciona formulacija esomeprazol-natrijuma. Optimalan proces liofilizacije koji je uporediv između proizvodne i laboratorijske serije je dobijen kada je podešavanjem temperature sublimacije obezbeđena temperatura uzorka niža od temperature raspadanja od $-19,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, određene uz pomoć mikroskopa za sušenje zamrzavanjem. Da bi razvili optimizovan proces liofilizacije esomeprazol-natrijuma, Venna i sar. [34] su varirali ukupno vreme ciklusa, koje obuhvata vreme zamrzavanja i "holding" vreme (vreme čuvanja bočica na policama liofilizatora pre započinjanja procesa liofilizacije), kao i vreme primarnog i sekundarnog sušenja, uz održavanje konstantnog sastava formulacije. Dobijeni rezultati ove studije pokazali su da je u ciklusu liofilizacije ukupnog trajanja od 35 h dobijen proizvod u kome je API očuvala svoju hemijsku stabilnost.

Degradacija API dovodi do brzog pada pH vrednosti proizvoda, što nadalje olakšava degradaciju API i smanjuje sadržaj esomeprazola, a time i terapijsku efikasnost. Proizvodnja se izvodi u potpuno "zatvorenom" sistemu (sistem sudova od nerđajućeg čelika, povezanih putem cevi od nerđajućeg čelika i silikona) koji podrazumeva odsustvo kiseonika, te vreme kada API dolazi u kontakt sa kiseonikom je vreme od momenta kada su napunjene bočice delimično zatvorene, do momenta početka procesa liofilizacije. Vreme tokom kojeg delimično zatvorene bočice mogu biti izložene vazduhu, odnosno maksimalno vreme trajanja procesa punjenja koje neće ugroziti stabilnost API i time kvalitet proizvoda, treba maksimalno skratiti. Skraćenje vremena trajanja faze punjenja značajno ograničava kapacitet liofilizatora i smanjuje broj „dobrih“ bočica gotovog proizvoda koje su u skladu sa zahtevima specifikacije. Upravo iz tog razloga, optimizacija ovako nerobustnog koraka u procesu proizvodnje je neophodna kako bi se omogućilo povećanje veličine serije (*scale-up*) sa 17.000 bočica na željenih 33.000 bočica i dobijanje finalnog proizvoda koji zadovoljava zahteve specifikacije.

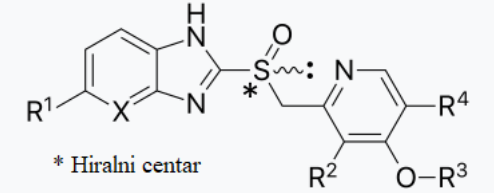
Izuzetna nestabilnost rastvora esomeprazola koja se u najvećoj meri odražava na kontrolisanje pH vrednosti proizvoda, zahteva posebnu pažnju tokom definisanja formulacije. Polazeći od činjenice da se pH vrednosti rastvora smanjuje različitom brzinom u zavisnosti od uslova kojima je proizvod izložen pre same liofilizacije (temperatura, kiseonik, kao i vreme izloženosti ovim faktorima), teško je nadalje kontrolisati pH vrednosti finalnog, rekonstituisanog proizvoda, a samim tim i njegovu stabilnost tokom roka upotrebe. Zbog toga je važno definisati granice pH rekonstituisanog rastvora u kojima će API ostati stabilan i time osigurati dobijanje proizvoda koji zadovoljava sve zahteve specifikacije tokom roka upotrebe od 36 meseci.

Data mining (istraživanje podataka) je prepoznat kao korisno oruđe u predviđanju i kontroli profila kvaliteta lekova u Pharma 4.0 konceptu u farmaceutskoj industriji. Duboko učenje je oblast *data mining*-a koja koristi algoritme koji se nazivaju veštačke neuronske mreže (engl. *artificial neural networks* - ANN). Uspešno se koristi u poslednje dve decenije u razvoju formulacija i procesa [35-38]. Glavna prednost ANN je u tome što je moguće predvideti brojne varijable istovremeno, kao i uspostaviti složene modele između zavisnih i nezavisnih promenljivih, čak i u slučajevima kada su postojeće tradicionalne metode, poput eksperimentalnog dizajna, neuspešne. ANN mogu sadržati različit broj slojeva, kao i različit broj neurona u svakom sloju; dodatno, korisnik može izabrati algoritme učenja, aktivaciju i post-sinaptičke funkcije; stoga postoje brojne mogućnosti za mrežnu arhitekturu [39]. U literaturi postoji samo nekoliko pokušaja primene *data mining*-a za predviđanje stabilnosti lekova. U jednoj od prethodnih studija upoređene su multipla regresiona analiza (engl. *multiple regression analysis* - MRA) i dinamička neuronska mreža (engl. *dynamic neural network* - DNN) za predviđanje stabilnosti natrijum-hidrookortizonsukcinat 100 mg praška za rastvor za injekcije. Proizvodi razgradnje natrijum-hidrookortizonsukcinata su praćeni tokom studija stabilnosti [40]. Svi podaci dobijeni tokom studija stabilnosti korišćeni su za izgradnju i primenu veštačke neuronske mreže, a rezultati su potvrdili superiornost DNN nad MRA modelovanjem [40].

1.2 Inhibitori protonske pumpe

Inhibitori protonske pumpe (IPP) predstavljaju grupu antisekretornih lekova, koji su za samo nekoliko godina postali lekovi prvog izbora za sva patofiziološka stanja koja su praćena pojačanim lučenjem želudačne kiseline. Glavne indikacije za njihovu primenu su peptički ulkus, erozivni i neerozivni refluksni ezofagitis, *Zollinger-Ellison*-ov sindrom, infekcija izazvana bakterijom *Helicobacter pylori*, kao i profilaksa tzv. *stresa ulkusa*. Od derivata benzimidazola – omeprazol je prvi uveden IPP osamdesetih godina prošlog veka, a danas se na tržištu nalaze i drugi derivati kao što su: lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol i esomeprazol (aktivni S-izomer omeprazola), prikazani u Tabeli 1.1 [41].

Tabela 1.1 Hemijske strukture navedenih IPP

|  | | | | | |
|--|----|-------------------|------------------|--|-----------------|
| IPP | X | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
| Omeprazol | CH | OCH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Esomeprazol (S-enantiomer) | CH | OCH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ |
| Lansoprazol | CH | H | CH ₃ | CH ₂ CF ₃ | H |
| Rabeprazol | CH | H | CH ₃ | (CH ₂) ₃ OCH ₃ | H |
| Pantoprazol | CH | OCHF ₂ | OCH ₃ | CH ₃ | H |

Napomena: Slika preuzeta i prilagođena iz https://sh.wikipedia.org/wiki/Inhibitor_protonske_pumpe

Prema načinu aplikacije, lekovi koji sadrže IPP se mogu podeliti u dve grupe: preparate za oralnu primenu i preparate za parenteralnu primenu. Preparati za parenteralnu primenu, obzirom na hemijske osobine benzimidazolskih derivata, su u obliku liofiliziranog praška za rastvor za injekciju.

1.2.1 Mehanizam dejstva i farmakokinetika inhibitora protonske pumpe

Parijetalne ćelije želuca su epitelne ćelije koje se nalaze u unutrašnjem sloju sluzokože želuca. One imaju sekretorni membranski sistem, a glavni protein u sastavu ove membrane je enzim H⁺/K⁺-ATP-aza, poznatiji kao protonska pumpa. Dejstvom ovog enzima dolazi do sekrecije jona vodonika u ekstracelularnu tečnost iz koje se preuzima jon kalijuma. Dakle, protonska pumpa je direktno odgovorna za lučenje vodonikovih jona u lumen želuca i poslednji je korak u regulaciji sekrecije hlorovodonične kiseline, te upravo zato predstavlja ciljno mesto delovanja lekova koji inhibiraju lučenje želudačne kiseline [42, 43].

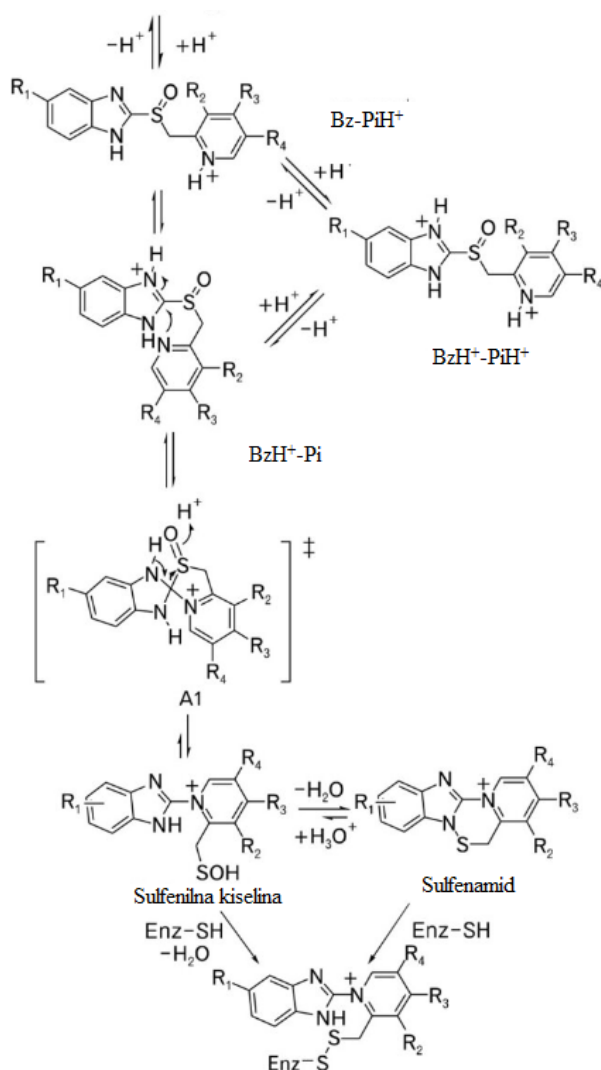
Inhibitori protonske pumpe smanjuju lučenje želudačne kiseline tako što ireverzibilno inhibiraju enzim H⁺/K⁺-ATP-azu. [42, 43].

Za razliku od blokatora histaminskih H₂ receptora koji se reverzibilno vezuju za H₂ receptore na površini parijetalnih ćelija, inhibitori protonske pumpe stvaraju kovalentne disulfidne veze sa ATP-azom i na taj način nepovratno inhibiraju enzim. Lučenje kiseline se potpuno zaustavlja sve dok ne dođe do sinteze proteina. Upravo iz ovog razloga, inhibitori protonske pumpe predstavljaju efikasniju

grupu lekova u odnosu na blokatore H₂ receptora [44].

Smatraju se relativno bezbednim lekovima, s obzirom da se neželjena dejstva retko javljaju i to kod 1-3% pacijenata i da su bezazlena. Obično se javle mučnina, abdominalni bol, konstipacija ili dijareja. Pored toga, moguća je pojava osipa, glavobolje, dosta retko subakutne miopatije i vrtoglavice [44].

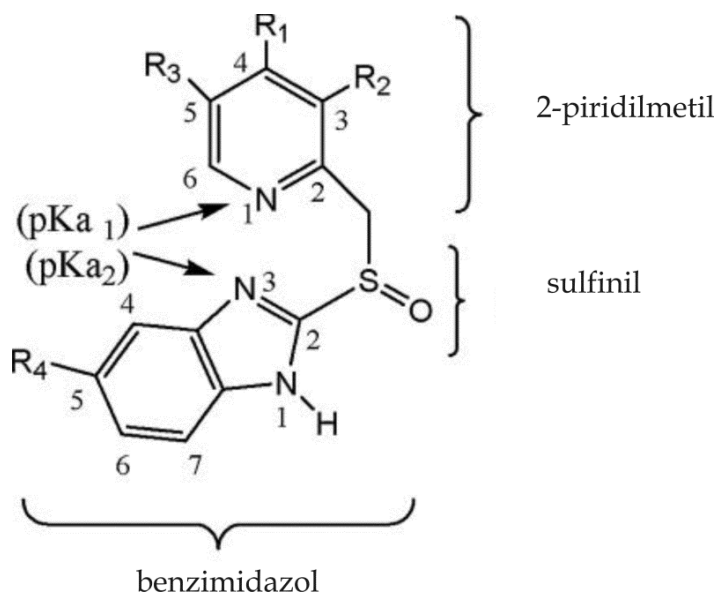
IPP značajno smanjuju bazalnu i stimulisanu sekreciju kiseline u želucu. Nakon jedne dnevne doze obezbeđuju pH oko 4 u lumenu želuca i to u trajanju od 10,5 h do 16,8 h u toku 24 h. U osnovnom obliku (Tabela 1.1) i pri neutralnim vrednostima pH (kakvi su u svim tkivima), ova jedinjenja su prolekovi bez inhibitornog dejstva. Međutim, kada kao lipofilne molekule difunduju u sekretorni kanalikularni sistem parijetalnih ćelija (u kojima je kisela sredina i vrlo niske vrednosti pH) oni se aktiviraju, kroz nekoliko aktivacionih koraka (Slika 1).



Slika 1. Reakcioni i aktivacioni put inhibitora protonske pumpe (preuzeto i prilagođeno iz *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2013; 19(1): 25-35, Publication Date: January 8, 2013, <https://doi.org/10.5056/jnm.2013.19.1.25>, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Proton Pump Inhibitors, Copyright © The Korean Society of Neurogastroenterology and Motility.)

Najpre dolazi do protonizacije azota u pirimidinskom prstenu, usled čega je onemogućen izlazak molekula iz parijetalne ćelije, a zatim dolazi do protonizacije na benzimidazolskom azotu kao slabijoj bazi (Slika 2). Sulfinil grupe formiraju sulfenilnu kiselinu i sulfenamid, da bi se najzad sulfenamid

kovalentnom vezom vezao za sulfhidrilne grupe cisteinskih ostataka enzima H^+/K^+ -ATP-aze i doveo do njegove inhibicije [45].



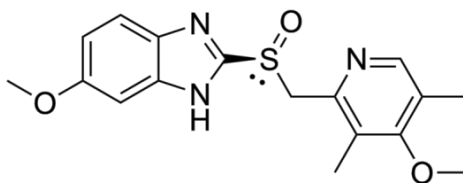
Slika 2. Piridilmetilsulfinilbenzimidazolska farmakofora inhibitora protonске pumpe sa naznačenim mestima na kojima se dešava protonizacija (pK_{a1} i pK_{a2}) (preuzeto iz A. Pavlović, Tečno-Hromatografska i Spektrofotometrijska Karakterizacija i Određivanje Esomeprazola, Njegovih Nečistoća i Degradacionih Proizvoda; Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija (2014))

Farmakofora kod IPP-a je 2-piridilmetilsulfinilbenzimidazolska struktura. Trenutno se u terapiji koristi pet jedinjenja iz ove klase lekova (omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol i rabeprazol (Tabela 1.1)). Svi sadrže ovaj osnovni strukturni element, a razlikuju se u strukturi i osobinama supstituenata u piridinskom i benzimidazolskom prstenu. Osobine supstituenata kao što su njihov negativni ili pozitivni induktivni efekat ima značajan uticaj na hemijsku reaktivnost molekula i time na efikasnost u antisekretornom delovanju [46].

Omeprazol i ostali IPP su prolekovi kod kojih lako dolazi do protonizacije u kiseloj sredini što ih čini osetljivim na uticaj želudačne kiseline (u kojoj može doći do inaktivacije pre same apsorpcije), pa se oralno primenjuju u obliku acidorezistentnih kapsula ili tableta. Apsorpcijom iz tankog creva dospevaju u sistemsku cirkulaciju, a potom u parijetalne ćelije i njihove kanaliće. Njihova bioraspoloživost varira u opsegu 30-90% ukoliko se uzmu pre obroka, a istovremena primena sa hranom može smanjiti bioraspoloživost za čak 50%, zbog čega se uzimaju 30-60 min pre doručka. Mada im je poluvreme eliminacije oko 30-90 min, dejstvo jedne dnevne doze na želudačnu sekreciju traje 2-3 dana, zato što se akumuliraju u sekretornim kanalićima parijetalnih ćelija. IPP se metabolišu u jetri preko sistema enzima citohrom P 450, posebno CYP2C19, a inaktivni produkti metabolizma se izlučuju mokraćom [41].

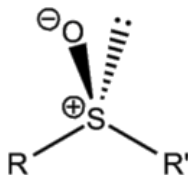
1.2.2 Esomeprazol

Esomeprazol je hemijski 6(5)-Metoksi-2-[(S)-[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol (Slika 3):



Slika 3. Strukturna formula esomeprazola (preuzeto iz A. Pavlović, Tečno-Hromatografska i Spektrofotometrijska Karakterizacija i Određivanje Esomeprazola, Njegovih Nečistoća i Degradacionih Proizvoda; Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija (2014))

Oficinalan je u obliku natrijumove soli, molekulske formule $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$ i molekulske mase 367,4. Esomeprazol je (S)-enantiomer omeprazola, najstarijeg od poznatih IPP. Omeprazol je primer hiralnog molekula za čiju je hiralnost odgovaran atom sumpora. Elektronski par koji se nalazi na atomu sumpora daje mu tetraedarsku strukturu, poput sp^3 hibridizovanog ugljenikovog atoma, kao što je prikazano na Slici 4 [48].

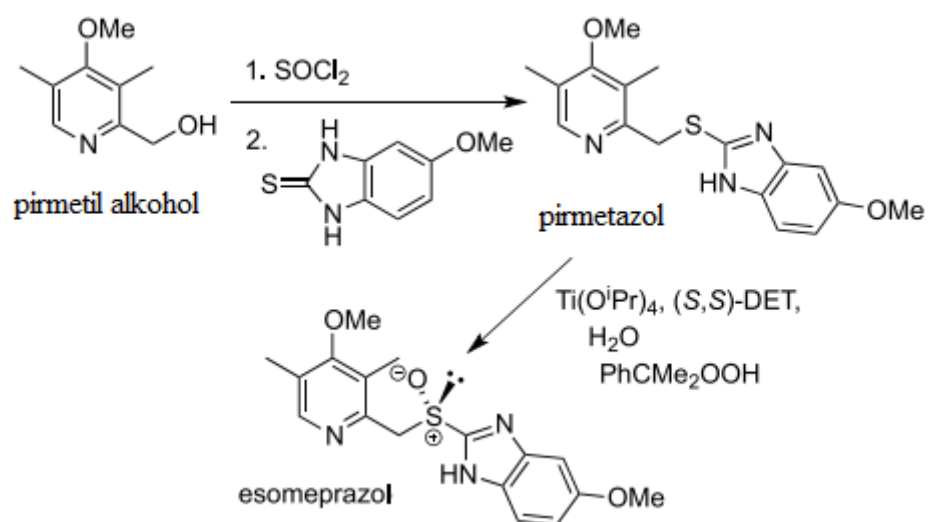


Slika 4. Tetraedarska struktura sulfoksida (preuzeto iz A. Pavlović, Tečno-Hromatografska i Spektrofotometrijska Karakterizacija i Određivanje Esomeprazola, Njegovih Nečistoća i Degradacionih Proizvoda; Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija (2014))

Aktivni oblik omeprazola je ahiralni ciklični sufenamid, čime bi se zaključilo da prisustvo hiralnog centra u omeprazolu nema uticaja na njegovu farmakološku aktivnost. Međutim, utvrđeno je da enantiomeri omeprazola imaju različitu aktivnost. (S)-enantiomer omeprazola ima bolju bioraspoloživost u ljudskom organizmu iz razloga što se (R)-enantiomer lakše metaboliše u jetri i na taj način eliminiše iz organizma [49, 50]. Esomeprazol ispoljava optičku aktivnost okarakterisanu sa $[\alpha]_D^{20} = 42,3^\circ$ ($c = 0,5\%$ u vodi) [51].

Sam omeprazol je vrlo teško rastvorljiv u vodi, umereno rastvorljiv u etil i metil alkoholu i metilen hloridu. Omeprazol-natrijum je beo ili skoro beo prašak i može biti u kristalnom ili amorfnom obliku [52]. Omeprazol-natrijum je lako rastvorljiv u vodi i etil alkoholu, umereno rastvorljiv u propilen glikolu, vrlo teško rastvorljiv u metilen-hloridu [53]. Poboljšana rastvorljivost i stabilnost u odnosu na omeprazol bazu čine da se ova so koristi u različitim farmaceutskim oblicima [52].

Postoji veliki broj patentnih rešenja i naučnih radova koji navode različite sintetičke puteve optički čistog esomeprazol-natrijuma [54-56]. Generalno, mogu se izdvojiti tri glavna koraka koji su sadržani u svim predloženim putevima sinteze (Slika 5). U prvom koraku omeprazol sulfid, (2-[[[4-(metoksi)-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]tio]-1H-benzimidazol) nastaje kondenzacijom 5-metoksi-1H-benzimidazola i 2-hlorometil-4-(metoksi)-3,5-dimetil piridina. U drugom koraku se vrši asimetrična oksidacija sulfida, koja može da se izvede na više načina, čiji je proizvod sulfoksid velike enantiomerne čistoće [57-60]. Finalno prečišćavanje dobijenog sirovog enantiomera obično se vrši metodom višestruke prekrizalizacije. U trećem sintetičkom koraku u cilju povećanja stabilnosti, sulfoksid se prevodi u natrijumovu so uz pomoć natrijum-hidroksida u metanolnom rastvoru (Slika 5).



Slika 5. Osnovni koraci u sintezi esomeprazol natrijuma (preuzeto i prilagođeno iz *J. Chem. Educ.* 2019, 96, 11, 2617–2621, Publication Date: October 7, 2019, <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00350>, Copyright © 2019 American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc.)

1.3 Postupak proizvodnje parenteralnih preparata u industrijskim uslovima proizvodnje

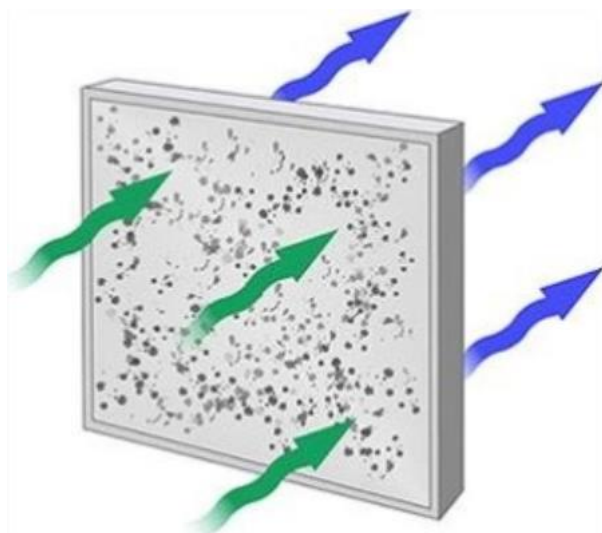
Celokupan proces industrijske proizvodnje pod aseptičnim uslovima mora da bude u skladu sa propisima dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practices* - GMP) i GMP Aneksom 1 za sterilne preparate [61]. Ovi propisi navode posebne zahteve koji definišu stepen čistoće vazduha, prostorija, opreme, procesa proizvodnje i osoblja.

Za industrijsku proizvodnju potrebne su radne prostorije sa sterilnim vazduhom, takozvane "čiste sobe" (Slika 6) za aseptičan rad, kako bi se unos mikroorganizama i stranih tela sveo na minimum.



Slika 6. Čista soba

Vazduh koji kroz prostoriju struji laminarno, steriliše se filtracijom kroz visokoeфикаsne filtere (HEPA filtere – engl. *High-Efficiency Particulate Air*) koji se nalaze na zidovima i plafonu prostorija (Slika 7). Brzina protoka vazduha je obično 0,30 m/s. Kao filtracioni medijum HEPA filtera koriste se staklena vlakna, koja se posebno oblikuju da bi se osigurao dovoljan protok vazduha [62].



Slika 7. HEPA filteri (preuzeto iz <https://www.tecomak.com/service/hepa-filters-dop-testing/>)

Postoje četiri klase čistih prostora za proizvodnju sterilnih preparata, a podela je izvršena na osnovu dozvoljenog broja čestica po m³ (Tabela 1.2) i na osnovu preporučene granične vrednosti mikrobiološke kontaminacije u određenom uzorku vazduha. Klasa A je prostor u kome se vrše najrizičniji procesi proizvodnje, koji podrazumevaju punjenje i direktan kontakt preparata sa spoljašnjom sredinom. Klasa B se koristi za aseptičnu pripremu i punjenje, a ujedno predstavlja i

okruženje za zonu klase A. Klase C i D se koriste za manje rizične faze u proizvodnji sterilnih preparata (Tabela 1.2) [62].

Tabela 1.2. Prikaz klasifikacije prostora prema veličini čestica [61]

| Klasa | stanje mirovanja | | stanje u radu | |
|-------|--|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | maksimalan broj dozvoljenih čestica/m ³ | | | |
| | ≥0.5 μm | ≥5 μm | ≥0.5 μm | ≥5 μm |
| A | 3 520 | nije specificirano ^(a) | 3 520 | nije specificirano ^(a) |
| B | 3 520 | nije specificirano ^(a) | 352 000 | 2 930 |
| C | 352 000 | 2 930 | 3 520 000 | 29 300 |
| D | 3 520 000 | 29 300 | nije unapred određeno ^(b) | nije unapred određeno ^(b) |

Napomene: (a) Klasifikacija koja uključuje čestice veličine 5 μm može se uzeti u obzir kada je to naznačeno u strategiji kontrole kontaminacije ili istorijskim trendovima; (b) Operativni limiti za D klasu čistoće vazduha nisu unapred određeni. Proizvođač treba da odredi operativne limite na osnovu procene rizika i rutinskih podataka, ukoliko je primenljivo.

Prostorije moraju da ispunjavaju sledeće uslove: da su snabdevene sterilnim, filtriranim vazduhom laminarnog strujanja pod pritiskom višim od pritiska koji vlada u susednim prostorijama (nižeg stepena čistoće); mora biti postignuta zadovoljavajuća temperatura i vlažnost vazduha; da je obezbeđen poseban stepen zaptivenosti prozora, vrata i drugih otvora (između prostora sa različitom čistoćom vazduha); da je pristup u aseptičnu prostoriju moguć samo jednosmerno i da se vrši redovna mikrobiološka kontrola vazduha, zidova, prostorija, uređaja i opreme. Održavanje laminarnog protoka vazduha mora da bude dokazano i validirano. Veza između prostorija mora da bude adekvatna [63].

Prostori treba da se kontrolišu tokom celog procesa proizvodnje kako bi se pratili broj i veličina čestica u prostorima različitih klasa čistoće. Kada se radi u aseptičnim uslovima kontrolisanje treba da bude često, uz upotrebu metoda kao što su: "taložne" ploče, volumetrijsko uzorkovanje vazduha, kao i uzimanje uzoraka sa površina. Nakon kritičnih faza procesa proizvodnje (npr. sterilna filtracija i punjenje) mora da se izvrši kontrola čistoće površina i osoblja. Kontrolisanje mora biti dokumentovano.

Pre ulaska u „čistu sobu“, kako bi se kontaminacija svela na minimum, osoblje mora da prođe kroz zonu za presvlačenje (Slika 8), vrata na zonama za presvlačenje, vazdušne pregrade, ili prolazna vratanca, koja imaju pregrade koje sprečavaju da oba kraja budu otvorena u isto vreme. Da bi se smanjila kontaminacija, u zonama u kojima se izrađuju sterilni preparati treba da boravi što manji broj osoba [63].



Slika 8. Zona za presvlačenje (preuzeto iz *The Proper Gowning Techniques Before Entering A Cleanroom*, Published on 6th Mar 2018, Copyright © 2023 SOSCleanroom.com)

Osoblje treba redovno da se obučava o svim važnim aspektima bitnim za ispravnu proizvodnju sterilnih proizvoda, a ova obuka treba da obuhvati i zahteve za ličnu higijenu. Presvlačenje i pranje treba da se obavljaju u skladu sa pisanom procedurom koja je definisana tako da minimizira kontaminaciju odeće koja se nosi u čistoj prostoriji. Ručni satovi, šminka i nakit ne smeju da se nose u čistim prostorijama. Osoblju, koje radi na proizvodnji sterilnih preparata, treba dati uputstva na koji način da prijave slučaj koji može dovesti do širenja velikog broja različitih vrsta kontaminanata. Iz tog razloga su poželjne česte zdravstvene provere osoblja. Odgovorna osoba za proizvodnju, mora da preduzme odgovarajuće mere u vezi sa osobljem koje može predstavljati mikrobiološku opasnost [63].

Sve površine prostora u kojima se vrši proizvodnja treba da budu glatke i nepropustljive, oblih ivica, bez pukotina i udubljenja, kako bi se omogućilo lakše čišćenje i pranje i samim tim kontaminacija svela na minimum. Sva proizvodna oprema u koju spadaju sterilizatori, sistemi za ventilaciju i filtriranje vazduha, filteri za vazduh i gasove, oprema za prečišćavanje vode, proizvodnju, skladištenje i distribuciju, treba da se validira i održava prema planu [63].

Proizvodnja mora da ispuni i GMP propise iz Aneksa 9 koji se odnose na proizvodnju tečnih farmaceutskih oblika, krema i masti. Potrebno je ispoštovati posebne mere predostrožnosti da bi se sprečila kontaminacija proizvoda. Koriste se zatvoreni sistemi za proizvodnju i prenos. Izbegavaju se staklene aparature, dok je nerđajući čelik visokog kvaliteta materijal izbora za delove opreme. Standardi hemijskog i mikrobiološkog kvaliteta vode koja se koristi u proizvodnji su jasno definisani i redovno se vrši njena kontrola i uredno se dokumentuje [63].

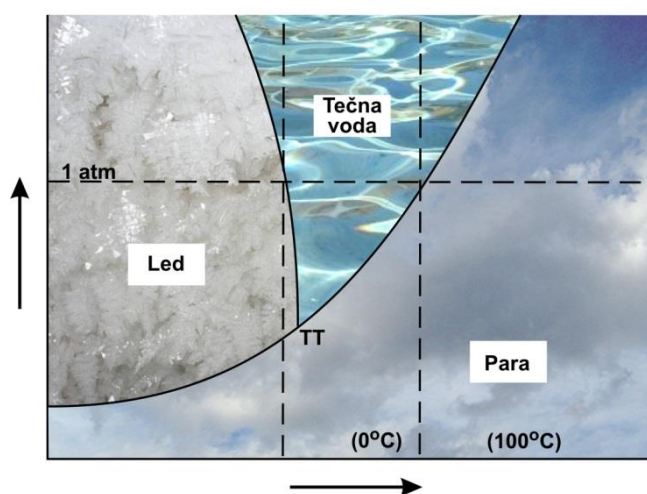
1.4 Liofilizacija

Liofilizacija je tehnološki proces koji se primenjuje u proizvodnji lekova čije su aktivne supstance osetljive na vlagu, a u cilju dobijanja proizvoda koji ostaje stabilan tokom roka upotrebe.

Ovim postupkom se proizvodi mogu sušiti na temperaturama koje ne prelaze 30 °C, tako da na kraju sadrže ispod 1% vlage.

Osnovni princip liofilizacije je sublimacija, pri čemu se iz rastvora termolabilne supstance eliminiše rastvarač (najčešće voda) kroz faznu promenu iz čvrstog u gasovito stanje, bez prelaska kroz tečno stanje.

Na Slici 9, prikazan je fazni dijagram vode i raspon pritiska i temperature u kojima je prelaz iz čvrstog u gasovito stanje moguć [64].



Slika 9. Dijagram pritisak-temperatura za vodu (preuzeto i prilagođeno iz *Lyophilization/Freeze Drying - An Review*, G. Nireesha, L. Divya, V. Lavakumar, Published 2013, *INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*)

Na dijagramu se tri agregatna stanja razdvajaju krivama, a dve faze mogu postojati istovremeno pod uslovima duž linija razdvajanja. Iz dijagrama se uočava da u trojnoj tački (TT), sve tri faze mogu postojati istovremeno. Trojna tačka za vodu se javlja pri pritisku 610,48 Pa i temperaturi od 0,0099 °C, dok se sublimacija javlja ispod ovih vrednosti [64].

Liofilizacija se odvija kroz dva osnovna procesa: zamrzavanje i sušenje.

1.4.1 Zamrzavanje

Zamrzavanje se vrši do temperature na kojoj su voda i rastvorene supstance u njoj kristalizovane. Kristalizacija zavisi od nekoliko faktora koji utiču jedni na druge: brzina hlađenja, inicijalna koncentracija rastvora, krajnja tačka hlađenja i vreme za koje se ona postigne.

Količina toplote (engl. *melting heat*) - Q_{tot} koja se oduzima od čiste vode može se izračunati, ako se znaju početna i krajnja temperatura proizvoda, iz jednačine (1) [65]:

$$Q_{tot} = c_v (T_1 - T_0) + Q_c + c_l (T_0 - T_2) \quad (\text{kJ/kg}) \quad (1)$$

gde su:

c_v – specifični toplotni kapacitet vode,

Q_c – *melting heat* leda,

c_l – specifični toplotni kapacitet leda,

T_0 – temperatura mržnjenja leda,

T_1 – inicijalna temperatura vode,

T_2 – finalna temperatura leda.

Kada je reč o rastvorima i suspenzijama, mora se uzeti u obzir i količina čvrste supstance, pa se primenjuje jednačina (2):

$$Q_{\text{tot}} = [(c_v x_v + c_f x_f)(T_1 - T_0)] + x_v Q_c + [(c_e x_v + c_f x_v')(T - T_0)] \quad (2)$$

gde su:

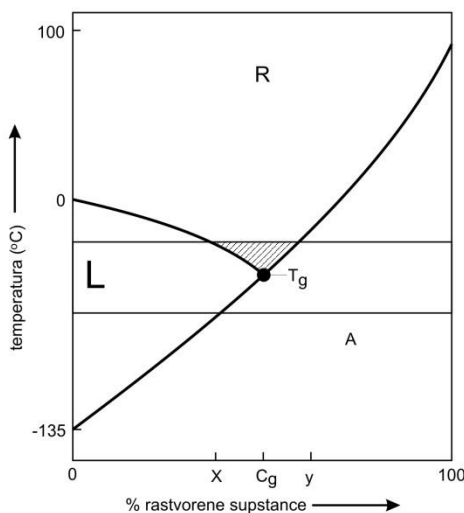
x_v – deo vode iznad 0 °C,

x_f – udeo čvrste supstance,

x_v' – deo leda koji se zamrzava dok se ne postigne T_2 ,

c_f – specifična toplota čvrte supstance.

Iako postoji jednačina u koju je uključen uticaj ekscipijenas, zamrzavanje kompleksnih rastvora je teško teoretski predvideti. Brzina zamrzavanja, tj. brzina stvaranja kristala leda zavisi od temperature i viskoznosti rastvora, tj. osobina i koncentracije rastvorenih supstanci. Brzina zamrzavanja sa druge strane utiče na oblik i veličinu kristala, odnosno pojavu amorfnе supstance između kristala leda (Slika 10).



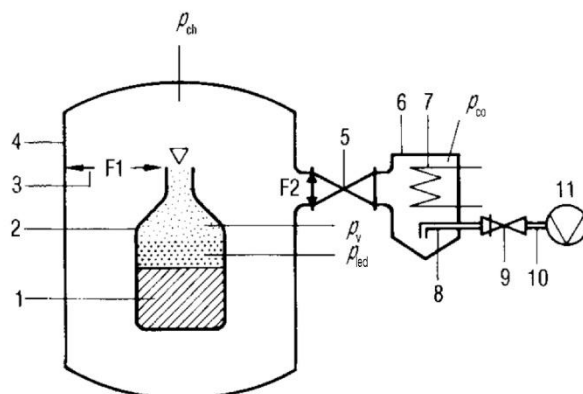
Slika 10. Idealni diagram generalne zavisnosti faza od temperature i koncentracije; A- amorfnа faza, L – led, R – faza rastvora, c_g – granična koncentracija, T_k – kritična temperatura iznad koje proizvod može da rekristališe, počinje da omekšava ili ostane u amorfnоj fazi; Ispod kritične temperature i kada je koncentracija niža od c_g mogućа je kristalizacija (preuzeto i prilagođeno iz *Lyophilization/Freeze Drying - An Review*, G. Nireesha, L. Divya, V. Lavakumar, Published 2013, *INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*)

Proizvod se zamrzava na dva načina u zavisnosti od sastava: eutektički (na temperaturi ispod najniže eutektičke tačke) i neeutektički kod supstanci koje nemaju eutektičku tačku (ispod temperature staklene tranzicije amorfnе faze) [66-69].

Dokazano je da je većina lekovitih supstanci manje stabilna u amorfnom nego u kristalnom stanju [66-69]. Zbog toga se definišu parametri procesa (temperatura i vreme) tako da obezbede formiranje kristalne forme.

1.4.2 Sušenje

Proces sušenja obuhvata: transport energije u cilju prevođenja leda (čvrste faze) u vodenu paru i transport vodene pare sa površine sublimata, do sistema za kondenzaciju ili apsorpciju pare. Ovo je proces u kome počinje da se primenjuje toplota na proizvod, a pritisak u komori se redukuje kako bi se izazvala sublimacija zamrznute mobilne vode (Slika 11).



Slika 11. Prikaz transporta vodene pare u liofilizatoru, 1 – zamrznuti proizvod, 2 – bočica, 3 (F1) otvor bočice kroz koji se kreće vodena para, 4 – komora za liofilizaciju, 5 – ventil, 6 – kondenzator, 7 – površina za hladjenje i kondenzaciju, 8, 9, 10 i 11 – sistem koji obezbeđuje vakuum; p_{led} – pritisak vodene pare na sublimacionom frontu, p_v – pritisak u bočici, p_{ch} – pritisak u komori, p_{co} – pritisak u kondenzatoru (preuzeto iz *Lj. Solomun, Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012)*)

Proces sublimacije leda se naziva primarno, glavno ili sublimaciono sušenje. Ovo je najduža faza liofilizacije. Brzina sublimacije leda iz zamrznutog proizvoda zavisi od razlike u pritisku isparavanja proizvoda u poređenju sa pritiskom isparavanja kondenzatora (kolektora leda): molekuli se kreću sa uzorka višeg pritiska na oblast nižeg pritiska. Brzina sušenja se održava konstantnom jer je brzina sublimacije spora i predstavlja kontrolni faktor. Za maksimalnu brzinu postoji optimalan pritisak, pa se dovođenje toplote i ostali parametri podešavaju da održe ovu vrednost [64]. Kako bi se obezbedio odgovarajući pritisak isparavanja bitno je da temperatura proizvoda bude viša od temperature kondenzatora. Takođe je izuzetno važno da temperatura na kojoj se proizvod liofilizira bude izbalansirana između temperature na kojoj se održava integritet zamrznutog proizvoda i temperature koja maksimizuje pritisak isparavanja proizvoda. Sve dok je prisutna zamrznuta *mobilna* voda, proizvod se mora držati ispod eutektičke temperature ili temperature staklenog prelaza, što se praktično postiže upotrebom vakuum pumpe (vezuje kondenzibilne gasove) i kondenzatora (vezuje nekondenzibilne gasove) [70].

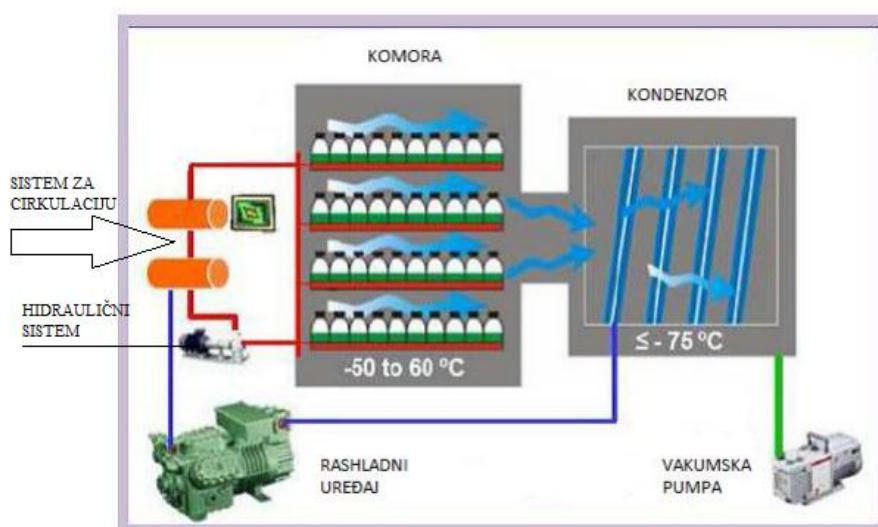
Da bi se poboljšao transfer toplote kroz proizvod, u komoru za sušenje se može uvesti i inertni gas, npr. azot. Prisustvo molekula ovog gasa pomaže grejanje zidova kontejnera, pa stoga i povećava količinu toplote koja se isporučuje proizvodu po jedinici vremena [70].

Sušenje proizvoda se odvija od vrha prema dnu, te je inicijalno uklanjanje vode uspešno. Međutim, kako se front sušenja pomera na dole kroz proizvod, sušenje je otežano. Molekuli vode se sada kreću kroz osušene delove proizvoda što otežava njihovo oslobađanje [70].

Nakon sublimacije, dolazi do desorpcije preostale vode sa površina čvrstih čestica, što predstavlja sekundarno ili desorptivno sušenje. Sušenje se odvija pri višoj temperaturi, neophodnoj da bi se postigla granična vlaga (7-8%), odnosno preostali višak vode desorbovao iz proizvoda i time

obezbedila njegova stabilnost. Primenjuje se temperatura viša od ambijentalne, koja neće uticati na stabilnost komponenata proizvoda. Pritisak je što je moguće niži, kako bi se osigurao adekvatan protok vodene pare iz proizvoda u kondenzator. Temperatura kondenzatora bi trebalo da bude niska koliko je to moguće postići. Sekundarno sušenje može da traje do nekoliko sati. Za vreme ovog procesa transport energije nije od presudnog značaja, s obzirom na to da je sadržaj vode manji od 10% i on uglavnom zavisi od sastava proizvoda. Tokom ovog koraka liofilizacije treba izbegavati prekomernu toplotu (koja može dovesti do smanjenja ili ugljnenisanja suvog liofiliziranog kolača), ili prebrzo povećavanje temperature (koje može dovesti proizvod iznad temperature staklenog prelaza i kolapsa istog). Oba faktora mogu negativno uticati na kvalitet proizvoda [70].

Kako bi se lakše razumeli prethodno objašnjeni koraci procesa liofilizacije, na Slici 12 je prikazan liofilizator i opisani su njegovi sastavni delovi [70]:



Slika 12. Shematski prikaz liofilizatora (preuzeto i prilagođeno iz *Lyophilization/Freeze Drying - An Review*, G. Nireesha, L. Divya, V. Lavakumar, Published 2013, *INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*)

Sastavni delovi liofilizatora su [70]:

- Komora za sušenje, sa temperaturno kontrolisanim policama. U unutrašnjosti polica nalazi se sistem cevi kroz koji protiče *fluid* za transfer toplote. Police se na završetku ciklusa liofilizacije koriste za potpuno utiskivanje čepova u bočice.
- Kondenzator koji prihvata vodu ili neki drugi rastvarač uklonjen iz proizvoda.
- Rashladni sistem - u fazi zamrzavanja hladi silikonsko ulje da bi proizvod efikasno bio zamrznut, a u fazi sušenja hladi kondenzator kako bi efikasno prihvatao rastvarač uklonjen iz proizvoda.
- Vakuum sistem (primarna vakuum pumpa, izolacioni ventil i pomoćna vakum pumpa) koji redukuje pritisak u komori i kondenzatoru i time potpomaže proces liofilizacije.
- Sistem za cirkulaciju, koji čine dve cirkulacione pumpe, sud za *fluid*, grejač i hladnjak. Kroz ovaj sistem se vrši protok *fluida* za transfer toplote.
- Hidraulični sistem se sastoji od klipa glavnog ventila i klipa polica koji služi za otvaranje glavnog ventila između komore i kondenzatora, kao i za spuštanje polica prilikom zatvaranja bočica na kraju procesa liofilizacije.

1.5 Kvalitet gotovog proizvoda – Stabilnost

Kvalitet gotovog proizvoda definiše se njegovim dizajnom, a specificira se tokom njegovog razvoja i samog procesa proizvodnje. Specifikacija finalnog proizvoda se definiše na osnovu svih rezultata i znanja stečenih tokom razvoja. U zavisnosti od farmaceutskog oblika o kojem je reč, izbor testova i koncept definisanja specifikacije je propisan smernicom Q6A [71]. Specifični testovi koji se moraju primeniti kod parenteralnih proizvoda su: merenje pH vrednosti, ispitivanje sterilnosti i bakterijskih endotoksina, određivanje konzervansa (ako je prisutan), određivanje vode (za proizvode čije su komponente osetljive na prisustvo vlage), ispitivanje migracije sastojaka (engl. *extractibles*), ali i testiranje funkcionalnosti sistema za aplikaciju (engl. *delivery system*).

Zahtevi da proizvod sačuva kvalitet u što dužem vremenskom periodu nameću potrebu za što detaljnijim ispitivanjem stabilnosti proizvoda i definisanjem dve različite specifikacije:

- Specifikacije za puštanje proizvoda na tržište (engl. *release specification*), odmah nakon proizvodnje,
- Specifikacije tokom roka upotrebe (engl. *shelf life specification*) [71].

Već u ranoj fazi razvoja kreće se sa ispitivanjem stabilnosti proizvoda. Kao deo preliminarnih ispitivanja izvodi se studija forsirane degradacije API, ispitivanje kompatibilnosti API sa pomoćnim supstancama i kontaktnom ambalažom. Na kraju se sprovodi i tzv. *stres* studija koja služi za odabir formulacije i utiče na dalji proizvodni proces [72-76]. Kako bi se potvrdio pravilan odabir kritičnih faktora koji utiču na stabilnost proizvoda, ispitivanje stabilnosti se dalje sprovodi na pilot seriji.

1.5.1 Tipovi ispitivanja stabilnosti

U ranim fazama razvoja sprovodi se preliminarno ispitivanje stabilnosti (stress studije) u kome nisu detaljno definisani zahtevi za postupke ispitivanja koji se sprovode. Stres studija ima za cilj da ukaže na osnovne degradacione mehanizme kojima mogu podleći API i pomoćne supstance u proizvodu [77]. Dizajn studije treba da bude takav da se hemijska degradacija ubrza i/ili izazovu fizičke promene. U zavisnosti od osobina same API, kao i specifičnosti određenog farmaceutskog oblika, proveravaju se uticaji:

- temperature (obično se povećava za 10 °C—npr. sa 40 °C na 50 °C, 60 °C),
- vlage (75% RH i više),
- kiselina i baza,
- kiseonika (oksidacionih sredstava),
- svetlosti i slično.

Ono što je izuzetno važno jeste da uslovi koji se primenjuju u okviru ovog ispitivanja obezbede ubrzanje samog procesa, ali ne i promenu puta degradacije. Stres studija zahteva naučni pristup i procenu dobijenih rezultata i u mnogome zavisi od prethodnog znanja samog istraživača koji je sprovodi.

Za razliku od stres studije za koju ne postoje jasno definisane smernice i direktive, klasično ispitivanje stabilnosti, detaljno je definisano u smernicama [72, 73, 75].

Kod određenih proizvoda je potrebno ispitati i potencijalne promene tokom upotrebe preparata (engl. *in-use* ispitivanje). Smernica „*Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products*“ daje osnovne preporuke za ispitivanje roka za koji se sterilni proizvodi mogu upotrebljavati nakon prvog otvaranja, odnosno nakon rekonstitucije [78]. Ono što je izuzetno važno jeste da je korisnik odgovoran za očuvanje kvaliteta proizvoda pre njegove primene, odnosno mora slediti uslove čuvanja propisane od strane proizvođača, a na osnovu smernice „*Note for guidance on*

maximum shelf-life for sterile products for human use after first opening or following reconstitution“ [79].

1.5.2 Poreklo i ispitivanje nečistoća

Od izuzetne važnosti za procenu kvaliteta proizvoda jeste ispitivanje načina i brzine degradacije API i određivanje sadržaja degradacionih proizvoda u gotovom proizvodu. Postoji nekoliko osnovnih kategorija nečistoća, a to su: organske nečistoće, neorganske nečistoće i zaostali rastvarači. Organske nečistoće mogu nastati tokom procesa proizvodnje i/ili čuvanja API, odnosno gotovog proizvoda. Nečistoće mogu biti strukturno okarakterisane (poznate, identifikovane) i strukturno neokarakterisane (nepoznate, neidentifikovane), isparljive ili neisparljive i uključuju: polazna jedinjenja u sintezi, intermedijerna jedinjenja nastala tokom procesa sinteze, degradacione proizvode, reagense (ligande i katalizatore) [80].

Nečistoće se još mogu klasifikovati i sa stanovišta bezbedonosnog aspekta (komparativne studije i genotoksični testovi) [80, 81]. Smernicama su jasno definisani testovi, način prikazivanja dobijenih rezultata i postavljanje specifikacijskih granica za nečistoće kada je u pitanju API, tj. odgovarajući gotov proizvod [81-83].

Specifikacija API i odgovarajućeg gotovog proizvoda, sadrže listu nečistoća (profil nečistoća), koja se definiše na osnovu rezultata zabeleženih tokom studije stabilnosti [81]. Profil nečistoća odgovara degradacionim proizvodima čija se pojava očekuje tokom proizvodnje i/ili čuvanja proizvoda pod definisanim uslovima. Ovaj spisak se bazira na poznavanju osobina API/proizvoda, potencijalnih puteva degradacije, kao i predviđenim interakcijama u formulaciji. Prema ICH smernici Q3B (R2), za svaku nečistoću u okviru specifikacije se definiše limit prihvatljivosti, a zavisno od maksimalne dnevne doze leka to mogu biti: limit detekcije i limit kvantifikacije [81].

U toku studije stabilnosti potrebno je definisati profil degradacije i uslove degradacije kako bi se definisala formulacija i uslovi čuvanja koji će omogućiti potpunu stabilnost proizvoda (API). Ukoliko to nije moguće ostvariti, potrebno je definisati i detaljno izanalizirati sve degradacione proizvode, što podrazumeva ispitivanje kinetike degradacije i definisanje maksimalno dozvoljene količine degradacionih proizvoda koja se očekuje pri propisanim uslovima čuvanja. Od količine degradacionog proizvoda koja nastaje zavisi da li će se data nečistoća okarakterisati (identifikovati) ili samo detektovati (neokarakterisan, neidentifikovan degradacioni proizvod). Kada je količina određenih nečistoća iznad limita detekcije, njegova hemijska struktura se mora identifikovati (specificiran, identifikovan degradacioni proizvod). Da bi se specificirale granice za degradacioni proizvod iznad limita kvantifikacije, a ispod limita detekcije, važno je identifikovati i poznavati osobine degradacionog proizvoda. Kada se radi o degradacionim proizvodima koji su prisutni u količini iznad limita kvantifikacije, njihovo ispitivanje se vrši kako bi se dokazala biološka inaktivnost. Dodatno, određena klinička ispitivanja su neophodna sa ciljem da se potvrdi da očekivana količina degradacionog proizvoda ne utiče na aktivnost, niti dovodi do toksičnih neželjenih efekata. U tom slučaju se kriterijum prihvatljivosti postavlja iznad granice za limit kvantifikacije ispitivane nečistoće [83, 84].

Imajući u vidu sve što je prethodno navedeno, profil nečistoća u okviru specifikacije treba da definiše sledeće:

- svaku specificiranu, identifikovanu nečistoću,
- svaku specificiranu, neidentifikovanu nečistoću,
- bilo koju nespecificiranu nečistoću, čiji je nivo prihvatljivosti iznad limita kvantifikacije,
- ukupne nečistoće.

1.6 Optimizacija procesa proizvodnje i *scale-up*

Optimizacija procesa proizvodnje ima za cilj istraživanje i definisanje kritičnih parametara procesa, čije promene unutar limita definisanih specifikacijom, uspostavljaju granice u okviru kojih se može dobiti proizvod odgovarajućih karakteristika. U zavisnosti od toga koji se proizvod razvija i od vrste postupka proizvodnje, može biti neophodno da se izvedu studije izvodljivosti, pre postupka optimizacije procesa. Proces optimizacije se može sprovesti korišćenjem postojećih podataka i znanja, primenom procene rizika i alatki upravljanja rizicima i primenjivanjem statističkog eksperimentalnog dizajna, kako bi se definisali prihvatljivi operativni okviri za kritične i nekritične parametre procesa [85].

Pogodan pristup optimizaciji procesa je identifikacija svih kritičnih parametara procesa (CPP) koji bi mogli potencijalno uticati na kvalitet proizvoda. Definicija i koncept "kritičnosti" sa uvažavanjem procesnih promenljivih parametara, osobina materijala i uslova proizvodnje su aktuelna tema debata u farmaceutskoj industriji. Regulatorna definicija za "kritičan procesni parametar" je: "*Input procesa koji, kada varira izvan ograničenog prostora, ima direktan i značajan uticaj na CQA (kritični atribut kvaliteta), gde je CQA količinsko svojstvo poluproizvoda ili finalnog proizvoda koji se smatra kritičnim za uspostavljanje nameravanog kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti proizvoda. Rizik se kontroliše za CQA, tj. uspostavljanje specifikacije proizvoda na koji se odnosi*" [85].

Iz perspektive poslovanja, parametri procesa mogu imati implikacije za optimizaciju prinosa, redukciju troškova ili poboljšanje efikasnosti procesa, ali ovo ne bi trebalo da bude ocenjeno kao kritično iz perspektive regulatornih tela. Podaci korišćeni za identifikaciju CPP se prikupljaju iz laboratorijskih i pilot-*scale* serija i ne treba da budu potvrđeni u proizvodnim serijama, izuzevši kontrolu određenog parametra, koji se jedino može oceniti na ovaj način, a koji je kritični faktor za dostizanje željenog kvaliteta proizvoda. Proizvodnja od probnih serija do serija koje se koriste u fazi III kliničkih studija, kao finalnog mesta proizvodnje, treba da svede na minimum pitanja inspekcija za davanje dozvole za stavljanje leka u promet, o mogućim razlikama između postupaka primenjenih u fazi istraživanja i razvoja i korišćenih u procesu proizvodnje.

Protokol procesa optimizacije treba da skicira zahtevan program rada potreban da oceni efekat promene kritičnih parametara procesa na kvalitet proizvoda. Protokol definiše radna ograničenja procesa proizvodnje koji rezultuju proizvodom koji zadovoljava CQA i CPP i može uključiti:

- definisanje nabavke lekovitih supstanci i ekscipijenasa;
- definisanje optimalnih parametara rada opreme, na primer, brzina mešanja tokom pripreme injekcionog rastvora;
- optimizaciju procesnih parametara zavisnih od vremena, na primer vremena mešanja;
- definisanje optimuma temperaturnog opsega;
- ocenjivanje efekata različitih serija ekscipijenasa/aktivnih supstanci (unutar specifikacijih granica);
- postavljanje ciljeva unutar procesa i kontrole procesa.

Po završetku procesa optimizacije, potrebno je da se napiše izveštaj u kojem se sumiraju svi rezultati i obrazloženja operativnih ograničenja procesa i kritičnih parametara koji utiču na kvalitet i karakteristike proizvoda. Izveštaj takođe treba da sadrži sve CQA, uključujući i specifikacije za ekscipijense i međuproizvode u procesu proizvodnje, a finalni proizvod treba da bude u zadatim specifikacijskim granicama [85].

U praksi, proizvod i razvoj procesa i *scale-up* treba da se odvijaju paralelno kako bi zadovoljili zahteve za upotrebu proizvoda kako u fazi I i II kliničkih ispitivanja, tako i za upotrebu i bezbednost proizvoda tokom roka upotrebe. Proces korišćen za početnu proizvodnju serija namenjenih za

ključna ispitivanja lekova je najčešće laboratorijskog obima. Kada je lekovita supstanca dostupna i povećavaju se zahtevi za količinom potrebnog proizvoda u kliničkim ispitivanjima, veličina proizvodne serije se povećava na veličinu pilot serije, a proces mora biti modifikovan u toku *scale-up*-a (transfera proizvoda sa laboratorijske, preko pilot, do proizvodne serije). Ako je lekovita supstanca raspoloživa, a predviđen je veliki obim faze III kliničkih ispitivanja, preporuka je da se što pre započne sa *scale-up*-om, tj. transferom procesa proizvodnje do veličine komercijalne serije [85].

Cilj *scale-up*-a je da osigura transfer procesa koji će obezbediti proizvod koji odgovara specifikaciji i CQA. *Scale-up* može obuhvatiti promene u procesnoj opremi i operacijama, kako bi se uvećala proizvodna serija, na primer, u sledećim situacijama:

- povećanje veličine serije 10 ili više puta na identičnoj opremi;
- korišćenje veće opreme ili iste opreme koja koristi velike brzine u radu;
- povećanje produktivnosti iste opreme za više od 50% za dati procesni korak.

Svaki put kada se izvodi *scale-up*, strogo je preporučeno da se eksperimentalna serija proizvede kako bi se pokazalo da je proces još uvek prihvatljiv i da se proizvod može proizvesti u povećanom obimu. Proizvod mora zadovoljiti kriterijume za sve in-procesne parametre i propisane specifikacijske granice [85].

1.7 Farmaceutski razvoj

Farmaceutski razvoj (engl. *Pharmaceutical Development*) predstavlja dizajniranje proizvoda odgovarajućeg kvaliteta i razvoj procesa proizvodnje koji će konzistentno davati proizvod odgovarajućih karakteristika [8]. Osnovni princip dizajniranja kvaliteta jeste da se kvalitet „ugrađuje“ u proizvod tokom farmaceutskog razvoja, definisanjem uticaja kritičnih atributa materijala (CMA) i kritičnih procesnih parametra (CPP) na prethodno definisane kritične attribute kvaliteta proizvoda (CQA) [86, 87].

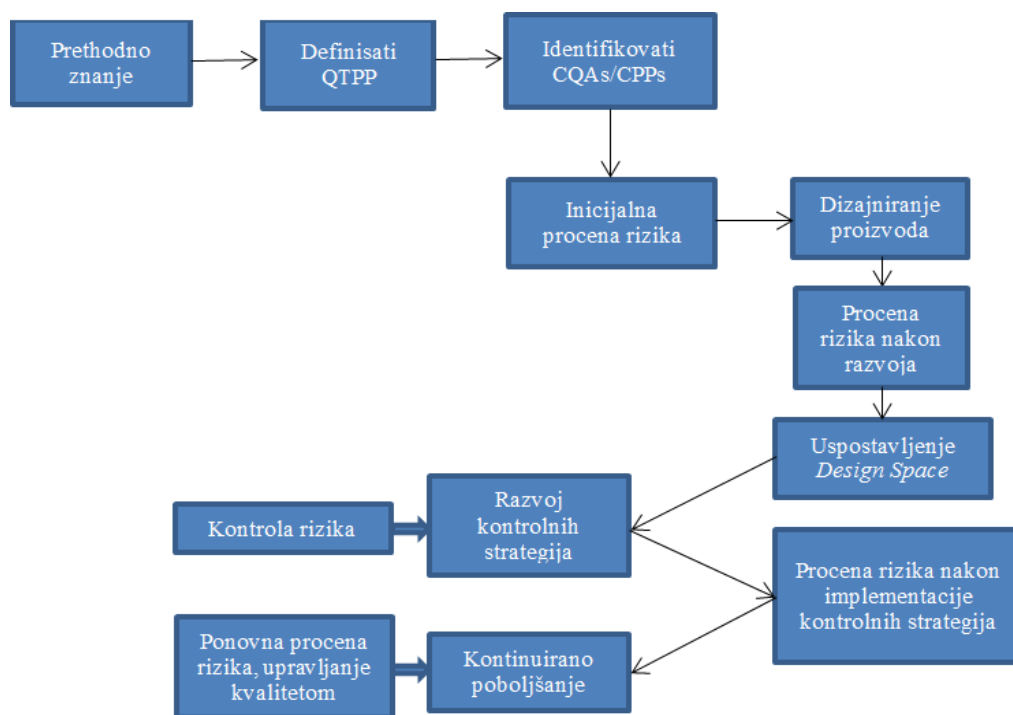
Sa ciljem obezbeđenja kvaliteta u okviru QbD koncepta, potrebno je primeniti različite alate (analiza rizika, eksperimentalni dizajn ili veštačke neuronske mreže), da bi se izvršila detaljna analiza velikog broja potencijalnih formulacionih i procesnih parametara u formulaciji ovih preparata. Kako bi se na prvom mestu identifikovali, a onda i kontrolisali faktori koji mogu uticati na kvalitet proizvoda, neophodna je detaljna analiza rizika, koju je moguće vršiti primenom različitih tehnika [88]. Neke od često korišćenih tehnika su *Ishikawa* dijagrama (dijagrama riblje kosti, engl. *Fish bone*) i Analiza efekata u slučaju neizvršenja (engl. *Failure Mode and Effects Analysis* - FMEA). *Ishikawa* dijagrama pomaže u hijerarhijskom organizovanju identifikovanih rizika, dok FMEA daje sveobuhvatnu analizu identifikovanih rizika. FMEA obuhvata analizu i rangiranje rizika povezanih sa različitim tipovima neusaglašenosti proizvoda/procesa, da bi se za one sa većim rizikom po kvalitet proizvoda dalje sprovele korektivne mere [89]. Efikasniji razvoj formulacije se postiže upotrebom statističkih metoda u planiranju eksperimenata, kao što je eksperimentalni dizajn. Eksperimentalni dizajn je skup matematičkih i statističkih tehnika koji omogućava sistematičnu i istovremenu evaluaciju uticaja više kontrolisanih ulaznih promenljivih (procesnih ili formulacionih) na određene izlazne parametre [90].

Farmaceutski razvoj započinje definisanjem ciljnog profila kvaliteta proizvoda (engl. *Quality Target Product Profile* - QTPP). QTPP uključuje karakteristike proizvoda koje, ukoliko su u zadatim specifikacijama, obezbeđuju kvalitet, bezbednost i efikasnost gotovog proizvoda. Na osnovu definisanog QTPP vrši se identifikacija kritičnih atributa kvaliteta proizvoda [8, 87].

Tradicionalni pristup farmaceutskom razvoju se odnosi na to da je kvalitet proizvoda uglavnom obezbeđen određenim ograničenjima u samom procesu proizvodnje, i testiranjem finalnog proizvoda, tzv. testiranjem kvaliteta (engl. *Quality by testing* - QbT) [91]. Sa druge strane, QbD se definiše kao naučno zasnovan, holistički i proaktivan pristup farmaceutskom razvoju sa odgovarajućim kontrolnim strategijama. Znanja stečena tokom farmaceutskog razvoja obezbeđuju naučnu zasnovanost za uspostavljanje prostora za dizajniranje kvaliteta (engl. *Design space* - DS), definisanje specifikacija i uspostavljanje sistema za kontrolu proizvodnje [8]. DS je višedimenzionalna kombinacija ulaznih varijabli i parametara procesa za koje je dokazano da pružaju garanciju kvaliteta proizvoda. Operacije unutar DS-a se ne smatraju odstupanjem, dok se rad izvan ovih okvira smatra neusaglašenošću koja dalje zahteva postregistracione izmene [8].

Osnov upravljanja rizicima predstavljaju znanja stečena tokom farmaceutskog razvoja. Sve potencijalne promene u formulaciji proizvoda i/ili procesima proizvodnje tokom životnog ciklusa leka su prilike za generisanje podataka koja će pružiti podršku uspostavljanju DS-a. Informacije prikupljene na ovaj način se pomoću alata za upravljanje rizicima sortiraju i koriste u svrhu dobijanja DS-a [8, 88]. Alati za procenu rizika potpomažu identifikaciju i rangiranje atributa materijala i procesnih parametara koji imaju uticaj na kritične attribute kvaliteta proizvoda, i to zahvaljujući prethodnom iskustvu ili eksperimentalnim podacima [88].

QbD pristup i neophodni koraci u farmaceutskom razvoju prikazani su na Slici 13.

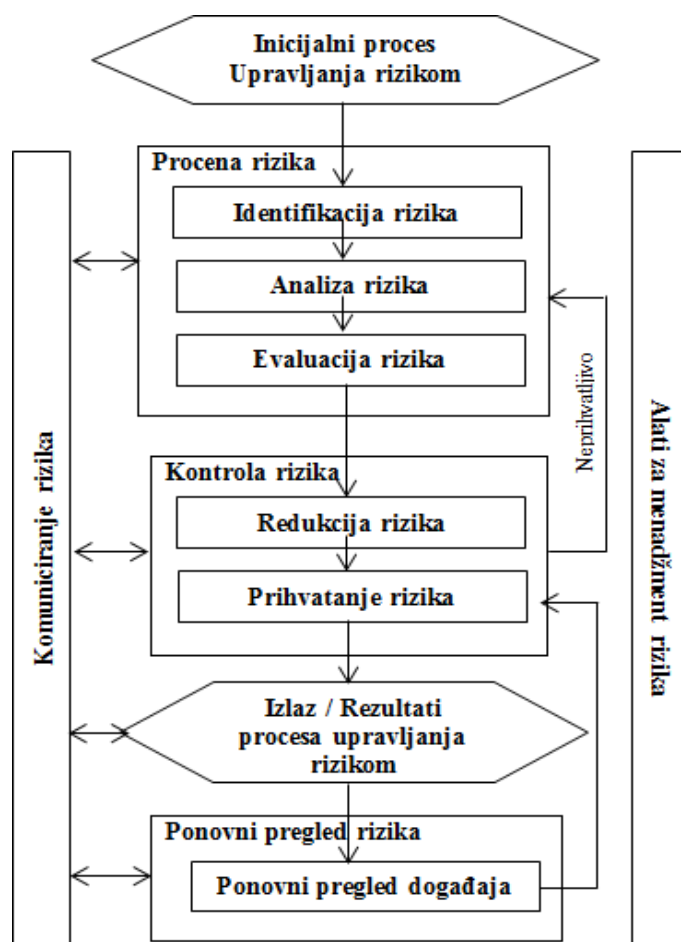


Slika 13. QbD, upravljanje rizikom i upravljanje kvalitetom u razvoju formulacije (preuzeto i prilagođeno iz *ICH Q8(R2)*, 2009)

Regulatorni zahtevi navedeni u smernicama koje opisuju QbD koncept farmaceutskog razvoja, definisani su tako da se obezbedi fleksibilnost u zahtevima za registraciju proizvoda, odnosno odobrenje izmena nakon registracije i tako osigura proces proizvodnje koji daje farmaceutski proizvod odgovarajućeg kvaliteta [8, 88, 92]. Prvi korak je definisati QTPP [8, 88, 92]. QTPP sačinjavaju odgovarajući atributi, koji moraju biti ugrađeni u farmaceutski proizvod, kako bi se postigla željena svojstva kvaliteta proizvoda. Pošto se definiše QTPP i optimalna formulacija i proces proizvodnje razvijaju, sledeći korak je identifikacija CQA. CQA predstavljaju fizičke, hemijske, biološke ili mikrobiološke karakteristike koje bi trebalo da budu u odgovarajućim granicama, kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet proizvoda. Za sterilne farmaceutske oblike, u ovom slučaju prašak za rastvor za injekciju/infuziju, karakteristike proizvoda kao što su izgled, sadržaj, srodne supstance, sterilnost i sadržaj vode mogu biti primeri CQA koji mogu uticati na kvalitet finalnog proizvoda. Glavni cilj QbD pristupa jeste da se identifikuju najznačajnije CQA i povežu sa CMA i CPP, odnosno da se objasni njihov uticaj na kvalitet proizvoda [8]. Kako bi se identifikovale i detaljnije ispitale varijable koje predstavljaju najveći rizik za kvalitet proizvoda primenjuju se postupci upravljanja rizicima [8].

1.7.1 Upravljanje rizicima

Principi procene rizika, odnosno upravljanje rizicima su dokazani kao vrlo značajna komponenta u osiguranju efikasnog sistema kvaliteta u farmaceutskoj industriji [88]. Rizik po kvalitet proizvoda predstavlja samo jednu od komponentata opšteg rizika, ako se u obzir uzme da sama proizvodnja, ali i upotreba leka, kao i API i svaki pojedinačni ekscipijens nose određeni rizik. Jedan od modela za upravljanje rizicima prikazan je na Slici 14 [88].



Slika 14. Shematski prikaz procesa upravljanja rizikom (preuzeto i prilagođeno iz ICH Q9, 2005)

Na samom početku, procena rizika započinje identifikacijom opasnosti, a zatim sledi analiza i evaluacija svih rizika povezanih sa izlaganjem tim opasnostima. Kvantifikovanje rizika povezanih sa identifikovanim opasnostima predstavlja analizu rizika. Analiza rizika uključuje opis verovatnoće dešavanja rizika, stepena ozbiljnosti posledica neusaglašenosti i mogućnosti detekcije. Kako bi se ovo izvelo, vrši se poređenje identifikovanih i analiziranih rizika u odnosu na postavljene kriterijume za verovatnoću, ozbiljnost posledica neusaglašenosti i mogućnost detekcije rizika. Izlazni podaci u proceni rizika su ili kvantitativne procene rizika (numerička verovatnoća) ili kvalitativni opis opsega rizika („visok“, „srednji“ i „nizak“) [88]. U zavisnosti od toga kakav je rizik, kontrola rizika može podrazumevati preduzimanje akcija za smanjenje ili prihvatanje rizika, ili u slučaju previsokog rizika, čak i odustajanje od aktivnosti. Kontrola rizika ima za cilj da redukuje rizike na prihvatljiv nivo, a važno je napomenuti da mere koje se preduzimaju u tu svrhu treba da budu srazmerne značaju određenog rizika [88].

1.7.2 Analiza efekata u slučaju neizvršenja

Analiza efekata u slučaju neizvršenja (engl. *Failure mode and effect analysis* - FMEA), obuhvata analizu i rangiranje rizika koji su povezani sa odstupanjima proizvoda (procesa) od prethodno specificiranih zahteva kvaliteta. Ovim rangiranjem identifikuju se rizici najvećeg prioriteta, za koje je neophodno sprovesti određene korektivne mere sa ciljem da se dovedu na odgovarajući nivo. FMEA je izuzetno korisna, kako u procesu farmaceutskog razvoja, tako i prilikom procene implementacije nekog novog procesa ili određene promene u već postojećem procesu proizvodnje u okviru optimizacije procesa [88, 93].

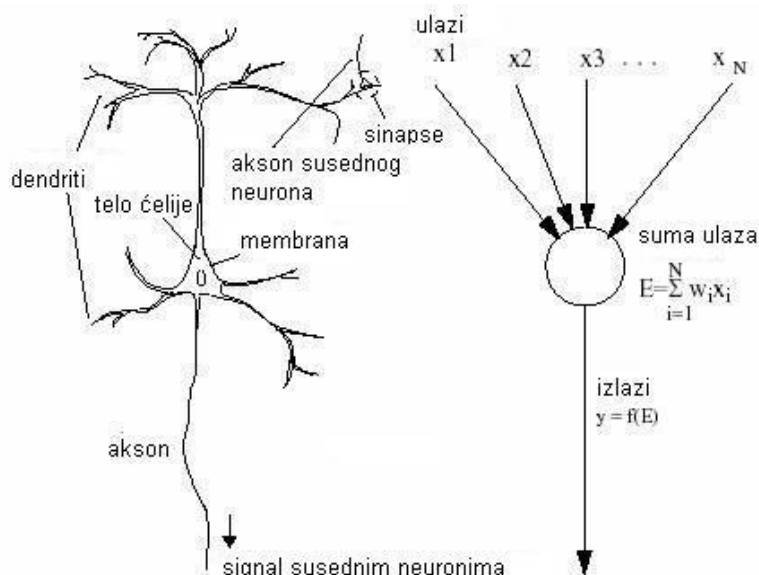
Nakon što se na samom početku FMEA identifikuju potencijalna odstupanja od postavljenih zahteva kvaliteta (pri čemu jedno odstupanje može imati više različitih uzroka, koji dalje moraju biti jasno razgraničeni i objašnjeni), dodeljuju im se odgovarajuće ocene na osnovu tri aspekta: verovatnoće događanja, odnosno pojave odstupanja/neusaglašenosti (engl. *Probability* - P), ozbiljnosti posledica neusaglašenosti (engl. *Severity* - S), i mogućnosti njene detekcije (engl. *Detectability* - D) [89]. Određena ocena se dodeljuje svakom od ovih atributa rizika na osnovu prethodno definisane skale za svaki od ova tri kriterijuma. Ozbiljnost posledica neusaglašenosti (S) procenjuje koliko bi efekti bili ozbiljni u slučaju da dođe do potencijalnog rizika, a na osnovu nivoa uticaja određene neusaglašenosti na kvalitet proizvoda i performanse procesa ili uticaja na pacijente. Verovatnoća (P) pojavljivanja neusaglašenosti procenjuje učestalost pojave potencijalnog rizika, a na osnovu istorijskih podataka do tada proizvedenih serija određenog proizvoda i iskustva sa sličnim proizvodima. Na osnovu podataka prikupljenih u trenutku pojave neusaglašenosti i njene zavisnosti o unapred uspostavljenim metodama detekcije, procenjuje se sposobnost otkrivanja potencijalne neusaglašenosti (detektabilnost (D)). Prioritetni broj rizika, tj. ocena rizika (engl. *Risk priority number* - RPN) za svaki pojedinačni proizvodni korak je proizvod vrednosti prethodno objašnjena tri parametra (jednačina 3) [94].

$$RPN = P \times D \times S \quad (3)$$

RPN vrednosti omogućavaju da se rizici porede među sobom, kako bi se prioritet u minimiziranju rizika dao odstupanjima sa najvišim rizikom [89].

1.8 Veštačke neuronske mreže

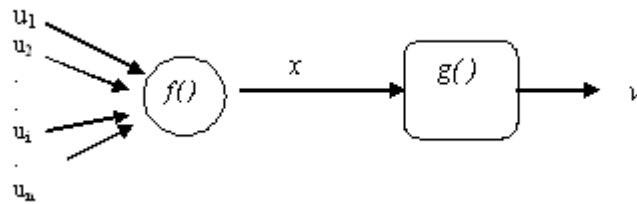
Kompjuterski program koji simulira određene osobine bioloških neuronskih mreža, kao što su učenje, donošenje zaključaka iz stečenog znanja i sposobnost generalizacije predstavlja veštačku neuronsku mrežu. Obrada informacija se obavlja uz pomoć paralelne razgranate arhitekture sastavljene od većeg broja snažno povezanih jednostavnih procesora (neurona). Kao što je već pomenuto, veštačke neuronske mreže imaju sposobnost učenja, koju stiču tako što im se predstavi određeni broj primera rešenih problema, za koji se specijalizuju [95]. Imajući u vidu strukturu veštačke neuronske mreže, na samom početku dato je poređenje između veštačkog i prirodnog neurona (Slika 15).



Slika 15. Uporedni prikaz prirodnog i veštačkog neurona (preuzeto iz *Lj. Solomun, Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012)*)

Nervnu ćeliju čine telo, dendriti i akson. Primajući signale od drugih neurona, neuron integriše svoj ulazni signal i generiše izlazni, koji sprovodi preko sinapsi do ulaza drugih neurona, ili efektoru organa. Veliki broj neurona (oko 10^{11}) koji čine centralni nervni sistem, su raspoređeni u nekoliko stotina grupa, u okviru kojih su povezani [96]. Ovo omogućava da se na ulaze jednog neurona dovode izlazi od stotinu do nekoliko hiljada neurona, a ukoliko se u obzir uzmu i povratne veze, proces prenošenja signala se dodatno usložnjava. Ovakav složeni nelinearni dinamički sistem obrađuje informaciju procesiranjem ulaznog signala, ili signala generisanog u samom sistemu.

Postoji nekoliko modela veštačkih neurona koji se međusobno razlikuju u nivou apstrakcije pojava u prirodnom neuronu, a koji se mogu podeliti u dve grupe. Prva grupa obuhvata statičke modele, u kojima su ulazni signali i izlazni signal povezani neuronima opisanim algebarskim jednačinama. Drugu grupu čine dinamički modeli, kod kojih su ulazni signali i izlazni signal neurona povezani diferencijalnim jednačinama. Drugim rečima, statički model isključuje potencijalne promene ulaznih signala u samom neuronu, smatrajući ih sporo promenljivim. Uopštena shema statičkih modela veštačkih neurona prikazana je na Slici 16.



Slika 16. Statički model neurona (preuzeto iz Lj. Solomun, *Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice*, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012))

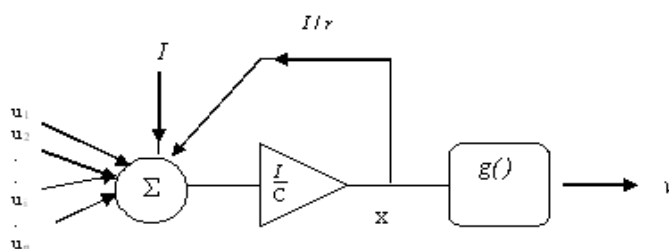
Na ulaz neurona dovodi se n signala $u = (u_1 \ u_2 \ \dots \ u_n)$. Aktivacioni signal neurona je $x = f(u)$, pa je izlazni signal $v = g(x)$ ili $v = g(f(u))$. Ovaj model odlikuju dve funkcije. Prva funkcija (f) daje zavisnost aktivacionog signala od ulaznih signala i predstavlja diskriminantu, postsinaptičku funkciju ili funkciju interakcije ulaza. Druga funkcija $g(x)$ opisuje uticaj aktivacionog signala na izlazni signal neurona i naziva se aktivacionom ili prenosnom funkcijom neurona [97, 98].

Najčešće se koristi linearna postsinaptička funkcija kod koje se aktivacioni signal izražava jednostavno kao kombinacija ulaznih aktivacionih signala (jednačina 4):

$$f(\mathbf{u}) = \sum w_i u_i \quad (4)$$

Posmatrajući mrežu koju sačinjava više ovakvih neurona, signali u_i su obično izlazni signali drugih neurona, tako da je težina veza $w_i, i=1,2,\dots,n$ u jednačini (4) opisan složenosti veza određenog neurona sa ostalim neuronima mreže. Analogija sa prirodnim neuronima je lako uočljiva. Funkcijom (jednačina 4) se simulira osobina tela nervne ćelije da sumira ulazne signale, dok w_i predstavljaju uticaj sinapsi. Ako je suma $w_i > 0$, onda je sinapsa ekscitatorna i obrnuto, ako je suma $w_i < 0$ onda je inhibitorna. Ako se u obzir uzme osobina prenosa signala prirodnog neurona, koja je nelinearna, linearna aktivaciona funkcija u statičkom modelu je loša imitacija prirodnog sistema. U literaturi se stoga mogu naći i postsinaptičke funkcije nelinearnog tipa, obično polinomskog oblika, sa ciljem da se poveća procesna moć neurona [84, 99].

Za razliku od statičkih, dinamički modeli opisuju prenos signala u toku vremena. Na Slici 17 prikazan je aditivni dinamički model neurona [100].



Slika 17. Dinamički model neurona (preuzeto iz Lj. Solomun, *Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice*, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012))

U ovom slučaju aktivacioni signal x se dobija sabiranjem ulaznih signala u_i , eksternog ulaza I i aktivacionog signala x i integracijom ovog zbira. Kao i kod statičkih modela g predstavlja aktivacionu funkciju, a v izlazni signal.

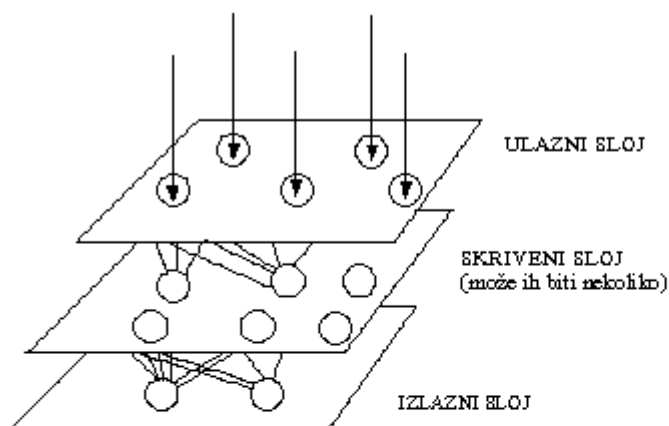
Dinamički model neurona poseduje mogućnost kratkotrajnog pamćenja usled efekta integracije, te

aktivacioni signal postoji još određeno vreme nakon prestanka delovanja ulaznih signala [99]. Sa druge strane, w_i označava dugotrajnu memoriju. Polazeći od prirodnog nervnog sistema u kojem se dugotrajne memorije menjaju tokom vremena, određeni modeli uključuju i vremensku promenljivost težine veza.

Uprkos činjenici da veštački neuroni umnogome odstupaju od prirodnih, upotrebom prethodno opisanih principa, efikasno rešavaju probleme u kojima do tada korišćene tehnike (npr. multipla regresiona analiza) nisu davale uspeh [100].

1.8.1 Arhitektura veštačkih neuronskih mreža

Određeni broj neurona koji povezuju izlaze jednih sa ulazima drugih, obrazuju veštačku neuronsku mrežu, kao što je to prikazano na Slici 18. Jedan broj neurona prihvata informacije iz radnog okruženja (ulazni neuroni), koja se dalje interno interpretira uz pomoć skrivenih neurona (nisu direktno vezani za radno okruženje), dok izlazni generišu signale za određene akcije. Opisani neuroni su raspoređeni u slojevima (ulazni, izlazni i skriveni sloj).



Slika 18. Slojevita neuronska mreža bez povratnih veza (preuzeto iz Lj. Solomun, *Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice*, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012))

Sa ciljem da se omogući njihova adekvatna primena, veštačke mreže moraju biti uređene na odgovarajući način, te stoga postoje dve klase neuronskih mreža: mreže sa povratnim vezama (rekurentne) i bez povratnih veza (nerekurentne) [101].

Slojevita mreža (engl. *Multi Layer Perceptron* - MLP), prikazana na Slici 18, predstavlja najčešće korišćenu arhitekturu nerekurentnih mreža. Neuroni od kojih je mreža sačinjena organizovani su u slojeve. Prvi, ulazni sloj čine neuroni koji imaju samo po jedan ulazni priključak i predstavljaju ulaz podataka za celu mrežu. Na ulaz jednog neurona dovode se izlazi svih neurona iz prethodnog sloja, a njegov izlaz se vodi na ulaze svih neurona u narednom sloju. Između neurona u istom sloju ne postoji povezanost. Skriveni slojeve sačinjavaju skriveni neuroni, koji nisu direktno vezani za radno okruženje ulazno/izlaznim signalima. Naposljetku, izlazni neuroni su organizovani u izlazni sloj koji predstavlja izlaz mreže. Signali se kroz ovakvu mrežu prenose samo u jednom smeru, od ulaza ka izlazu [84].

Potpuno povezana mreža je najpoznatiji primer rekurentne klase neuronskih mreža, kod koje izlaz jednog neurona vodi na ulaze svih, pa i na ulaz tog istog neurona, a uz to, svaki neuron mreže može da prima ulazne signale. Imajući ovo u vidu, struktura rekurentnih mreža više podseća na prirodni nervni sistem i ima veće procesne mogućnosti. Ipak, slojevite mreže daju uspešne rezultate u

rešavanju najrazličitijih problema, a procedure za njihovo učenje su brže i jednostavnije. Negativnu stranu rekurentnih mreža predstavljaju moguće oscilacije u rezultatima usled postojanja povratnih veza, te su u tom pogledu slojevite mreže mnogo stabilnije [84].

1.8.2 Učenje/trening veštačkih neuronskih mreža

Najznačajniji faktori za izgradnju i primenu neuronskih mreža jesu procedure za učenje, koje za cilj imaju da razliku između stvarnog izlaza i onog predviđenog mrežom, svedu na minimum. Procedure učenja odvijaju se promenom težine veze u odabranoj mrežnoj arhitekturi, što rezultira promenom sinapsi mreže i generisanjem odgovarajućeg izlaznog signala koji se vraća u određenu radnu sredinu. Na ovaj način, naučene neuronske mreže stiču sposobnost da na određenu pobudu reaguju korektno, odnosno na prihvatljiv/željeni način. Samo učenje mreže može biti nadgledano (engl. *supervised*) ili nenadgledano (engl. *unsupervised*).

Osnovna razlika između nadgledanog i nenadgledanog učenja mreže jeste u postojanju takozvanog učitelja ili supervizora, koji ukazuje na željeni, tj. tačni odziv koji se od mreže očekuje. Samim tim, kod nadgledanog učenja mreži se prezentuju pobuda i željeni odziv, a eventualna odstupanja stvarnog od željenog odziva utiču na promenu parametara mreže i time minimiziraju razlike među njima u budućem radu. Kod nenadgledanog učenja ne postoji supervizor te se promena težina veza sprovodi samo na osnovu poznavanja pravilnosti u ulaznim podacima i izlazima mreže, što za krajnji rezultat ima korektan odziv [84, 102].

Obučene neuronske mreže takođe poseduju sposobnost generalizovanja problema, te je u slučaju da se pobude ulazom koji nije bio u trening skupu, moguće očekivati tačan odziv dobijen upravo zahvaljujući ovoj sposobnosti [102].

Pored prethodno objašnjenih procedura učenja koje utiču samo na težinu veza, ali ne i na njihovu arhitekturu (statičke), postoje i dinamičke procedure za učenje.

1.8.3 Algoritmi za učenje veštačkih neuronskih mreža

Algoritmi nadgledanog učenje uglavnom koriste sličnu metodologiju za promenu težina veza u neuronskoj mreži. Inicijalne vrednosti, obično izabrane slučajno sa uniformnom raspodelom oko nule, dodeljuju se vektoru nepoznatih težina $w = (w_1 \ w_2 \ \dots \ w_N)$. Na ulaz mreže se potom uzastopno dovode uzorci iz trening skupa $p = (p_1, p_2, \dots, p_N)$, a paralelno se obavlja proces korekcije težina, koji se obično svodi na gradijentni spust niz površinu koja je u prostoru težina definisana funkcijom greške. Funkcija greške je zapravo mera razlike između željenog i stvarnog odziva neuronske mreže. Postoje dva načina za promenu težine: kod prvog težina se modifikuje nakon prezentacije svakog uzorka (takozvani engl. *Error Correction Rules*), a kod drugog načina se prezentuje ceo trening skup pre modifikacije težina (takozvani engl. *Gradient Rules*). U jednom ciklusu učenja (epohi), mreži se prezentuje ceo trening skup. Vrsta i arhitektura mreže diktiraju izbor algoritma za učenje [84].

1.8.3.1 Algoritam za propagaciju unatrag

Ideja algoritma za propagaciju unatrag (engl. *back-propagation*) je da se, na osnovu izračunate greške (ili gubitka), ponovo preračuna niz težina veza w u svakom sloju mreže. Povratno širenje greške, dobijene od strane mreže, započinje od poslednjeg neuronskog sloja i dalje se nastavlja za sve težine veza w u svakom sloju, od poslednjeg do dostizanja ulaznog sloja mreže. Drugim rečima, izračunava se greška između onoga što je mreža predvidela i onoga što se zaista desilo, a zatim preračunavaju sve vrednosti težina, od poslednjeg sloja do prvog, uvek sa namerom da se smanji greška neuronske

mreže [103]. Prevođeci tu ideju u matematičke termine, propagacija unazad se sastoji od sledećih koraka:

- definisanje inicijalnih vrednosti svih težina sa malim slučajnim vrednostima;
- unos podataka u mrežu i definisanje vrednosti funkcije greške, dobijene poređenjem sa očekivanom izlaznom vrednošću; pošto se proces učenja nadgleda, unapred je poznata vrednost tačnog odgovora; važno je da se funkcija greške može razlikovati;
- da bi se greška svela na minimum, izračunavaju se gradijenti funkcije greške u odnosu na svaku težinu; vektor gradijenta ukazuje na smer najvećeg povećanja funkcije, te kako bi se pomerile težine u pravcu najvećeg smanjenja funkcije greške, posmatra se suprotan smer vektora gradijenta.

Nakon izračunavanja vektora gradijenta, svaka težina se ažurira na isti način, a gradijenti se ponovo izračunavaju na početku svakog koraka ponovljenog treninga, sve dok greška ne postane niža od određenog utvrđenog praga ili dok se postigne maksimalni broj ponavljanja, kada je algoritam završen, a mreža adekvatno obučena [103].

Opšta formula za ažuriranje težina je prikazana u sledećem obliku (jednačina 5):

$$w \leftarrow w - \frac{\eta \partial E}{\partial w} \quad (5)$$

Vrednost težine u trenutnoj iteraciji predstavlja njenu vrednost na prethodnoj iteraciji od koje je oduzeta vrednost koja je proporcionalna gradijentu. Negativan predznak ukazuje na suprotan smer vektora gradijenta, kao što je prethodno pomenuto. Parametar η predstavlja brzinu učenja mreže i kontroliše veličinu koraka koji se uzima prilikom ažuriranja težina. Ključni korak u prethodnoj jednačini (5) je određivanje izraza $\partial E / \partial w$, koji se sastoji u izračunavanju parcijalnih izvoda funkcije greške E u odnosu na svaku težinu niza w [103].

Prethodno opisani složeni modeli su sposobni da pronađu skrivene obrasce koji su ljudima, teško uočljivi.

2.0 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja obuhvata definisanje kritičnih parametara proizvodnje i optimizaciju procesa liofilizacije u procesu proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, koji će osigurati kvalitet proizvoda uvećane serije tokom definisanog roka upotrebe.

Istraživanje je sprovedeno kroz tri faze čiji su ciljevi:

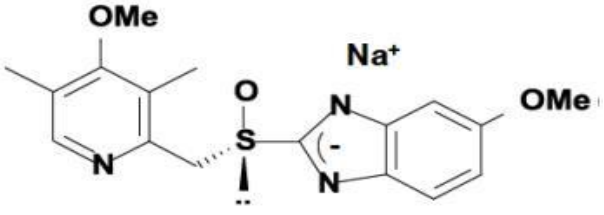
- 1) Ispitivanje kinetike degradacije lekovite supstance esomeprazol-natrijum u farmaceutskom obliku prašak za rastvor za injekciju/infuziju, identifikacija nečistoća koje su posledica degradacije lekovite supstance i ispitivanje stabilnosti rekonstituisanog proizvoda, kako bi se definisao uticaj faktora formulacije, kritičnih proizvodnih koraka i kritičnih delova opreme/sistema na mogućnost dobijanja stabilnog gotovog proizvoda uvećane serije (*scale-up* sa 17.000 na 33.000 bočica).
- 2) Polazeći od željenog profila kvaliteta proizvoda, primenom *QbD* koncepta, definisanog zajedno sa svim potencijalnim kritičnim parametrima procesa i kritičnim atributima materijala koji mogu uticati na proces i proizvod, sprovedena je FMEA analiza (analiza efekata u slučaju neizvršenja) i definisana je strategija kontrole za identifikovane kritične parametre procesa i kritične attribute kvaliteta materijala u proizvodnji. Konačno, izgrađena je i obučena veštačka neuronska mreža kako bi se definisao *design space* procesa liofilizacije opisan granicama temperature liofilizatora, u kojima pH rastvora esomeprazola ostaje stabilan za definisano vreme čuvanja napunjenih delimično zatvorenih bočica od momenta punjenja do momenta početka liofilizacije.
- 3) Primena algoritma učenja za predviđanje stabilnosti esomeprazola u liofiliziranom proizvodu i određivanje granica pH vrednosti za rekonstituisani rastvor finalnog liofiliziranog proizvoda, koje obezbeđuju željeni kvaliteta proizvoda (sadržaj esomeprazola i srodne supstance u okviru specifikacijskih granica), tokom roka upotrebe od 36 meseci.

3.0 Eksperimentalni deo

3.1 Materijali

U eksperimentalnom radu kao aktivna supstanca korišćen je esomeprazol-natrijum (proizvođača *Uquifa*, Španija i *Jubilant Life Sciences*, Indija). Karakteristike API su predstavljene u Tabeli 3.1:

Tabela 3.1. Karakteristike API esomeprazol-natrijum

| | |
|---------------------------|---|
| INN | ESOMEPRAZOL-NATRIJUM |
| CAS | [161796-78-7] |
| Hemijski naziv | (S)-5-Metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulpfinil]-1H-benzimidazol, natrijum so |
| Ostala imena | Nema |
| Molekulska formula | C₁₇H₁₈N₃NaO₃S |
| Relativna molekulska masa | 367,41 |
| Farmakološko dejstvo | Inhibitor protonske pumpe |
| Izgled | Bela do žućkasto bela čvrsta supstanca |
| Rastvorljivost | Lako rastvorljiv u vodi i gotovo nerastvorljiv u etru |
| Strukturna formula |  |

Kao pomoćne supstance korišćeni su: kompleksirajuće sredstvo dinatrijum-edetat (*Merck KGaA*, Darmstadt, Nemačka), sredstvo za podešavanje pH vrednosti natrijum-hidroksid (*Merck KGaA*, Darmstadt, Nemačka) i rastvarač voda za injekcije (*in-house* pripremljena destilacijom od prečišćene vode). Predmet ispitivanja ove doktorske disertacije je bio esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju sa rastvaračem za parenteralnu primenu, proizvođača Hemofarm, Vršac. U sledećoj tabeli (Tabela 3.2) prikazan je sastav proizvoda:

Tabela 3.2. Sastav esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

| Supstance koje ulaze u sastav proizvoda | Količina po bočici (mg) | Količina po seriji (kg) |
|---|--|-------------------------------|
| Esomeprazol-natrijum | 43,78* (41,20) | 1,445 (1,360) |
| Dinatrijum-edetat | 1,55 | 0,051 |
| Natrijum-hidroksid | q.s. (lat. <i>quantum satis</i> – koliko je dovoljno) | 0,048 |
| Voda za injekcije** | do 2,06 ml | do 67,980 l*** (do 68,456) |

Napomene: *Količina od 42,50 mg esomeprazol-natrijuma odgovara 40,00 mg esomeprazola. Ovo je teoretska količina aktivne supstance, a potrebna količina se preračunava na osnovu sadržaja aktivne komponente u sirovini; **Nestaje tokom procesa liofilizacije; ***Potrebna količina vode za injekcije se preračunava na osnovu gustine rastvora: $\rho=1,007 \text{ kg/l}$ ($67,980 \text{ l} \times 1,007 \text{ kg/l} = 68.456 \text{ kg}$)

Rekonstitucijaesomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju se vrši dodavanjem 5,2 ml natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% u bočicu. Rekonstituisani rastvor za injekcije je bistar i bezbojan do sasvim bledo žut.

Sve ostale upotrebljene supstance i reagensi bili su farmakopejskog kvaliteta [28]. Sledeći reagensi su korišćeni u analitičkim metodama za ispitivanje gotovog proizvoda: trinatrijum-fosfat, dodekahidrat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) stepena čistoće p.a. (latin. *Pro analysis*-p.a., uobičajeno korišćen stepen čistoće u toku izvođenja analitičkih metoda); dinatrijum-hidrogen-fosfat, dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), p.a.; destilovana voda; dinatrijum-edetat, dihidrat, p.a; tetrametil-amonijum-bromid, p.a.; acetonitril, p.a.; bakar-nitrat, trihidrat, p.a.; kalijum-karbonat, p.a.; kalijum-hidroksid, p.a.; kalijumheksahidroksantimonijat, p.a.; natrijum-hidroksid, p.a.; hidrazinsulfat, p.a.; natrijum-hlorid, rastvor za infuziju 0,9%; heksametilentetramin, p.a.; 1% m/v hlorovodonična kiselina; voda, HPLC (engl. *High-performance liquid chromatography* - Tečna hromatografija visokih performansi) čistoće; acetonitril, HPLC čistoće; natrijum-dihidrogen-fosfat, dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), p.a.; dinatrijum-hidrogen-fosfat, dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), p.a.; ortofosforna kiselina, p.a.; metanol, HPLC čistoće; etilalkohol bezvodni p.a.; glicin, p.a.; natrijum-borat dekahidrat, p.a; esomeprazol-natrijum, interni radni standard prema Ph. Eur. kvaliteta; omeprazol, Ph. Eur. kvaliteta. Svi reagensi od *Waters Corporation, Milford, CT, SAD*.

U eksperimentalnom radu je korišćen Nexium 40 mg, prašak za rastvor za injekciju/infuziju, *AstraZeneca UK Limited, London, Velika Britanija*, kao originatorski proizvod.

3.2 Metode

3.2.1 Ispitivanje stabilnosti

Uzorci su kondicionirani u horizontalnom položaju, kako bi se obezbedio maksimalan kontakt rastvora za rekonstituciju sa gumenim zatvaračima. Svi uzorci su kondicionirani u komorama za ispitivanje stabilnosti (*Weiss 2000, Weiss Gallenkamp, Velika Britanija, Weiss 2000, Weiss Gallenkamp, Velika Britanija, Weiss 600, Weiss Gallenkamp, Velika Britanija, Weiss Umwelttechnik 140, Weiss Umwelttechnik, Nemačka, Sanyo PSC 062, Sanyo Gallenkamp, Velika Britanija i Sanyo PSC 022* – komora za ispitivanje fotostabilnosti, *Sanyo Gallenkamp, Velika Britanija*), koje po svojim performansama odgovaraju regulativnim zahtevima [72].

Ispitivanje je imalo za cilj da se u postavljenim uzorcima izvrši: karakterizacija nečistoća, ispitivanje R-enantiomera esomeprazol-natrijuma, ispita kompatibilnost sa rastvorom za rekonstituciju, studija fotostabilnosti, kao i ispitivanje *in-use* stabilnosti [75]. Uslovi kondicioniranja uzoraka za karakterizaciju nečistoća su dati u Tabeli 3.3.

Tabela 3.3. Uslovi kondicioniranja uzoraka za karakterizaciju nečistoća

| Uslovi skladištenja | Vremenske tačke za testiranje (meseći) | | | |
|---------------------|--|---------------|------------------|---------------|
| | 0 | | 6 | |
| 40 °C/75% RH | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> |
| 30 °C/65% RH | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> |
| 25 °C/60% RH | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> | <i>ex-temp.*</i> | <i>in-use</i> |

* Napomena: *ex tempore* (lat. odmah)

Određivanje nečistoća sprovedeno je na inicijalnim i uzorcima koji su postavljeni u komore za ispitivanje stabilnosti (Tabela 3.3). Ispitivanje je vršeno metodama opisanim u poglavlju 3.2.2.

Uslovi kondicioniranja i učestalost testiranja R-enantiomera u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju /infuziju su predstavljeni u Tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Uslovi kondicioniranja i učestalost testiranja R-enantiomera

| Uslovi skladištenja | Vremenske tačke za testiranje (meseći) |
|---------------------|---|
| Ubrzane | 40 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH 0, 1, 3 i 6 |
| Intermedijarne | 30 °C ± 2 °C/65% ± 5% RH 0, 6 i 12 |
| Dugotrajne | 25 °C ± 2 °C/60% ± 5% RH 0, 6 i 12 |
| Fotostabilnost | UV/VIS U skladu sa ICH Q1B [75] |

U Tabeli 3.5 su navedeni uslovi kondicioniranja i učestalost testiranja tokom formalne studije stabilnosti. Kod kondicioniranih uzoraka u svim vremenskim tačkama je određivan izgled, sadržaj vode, vreme rekonstitucije za liofilizirani proizvod, izgled, čestice ispod granice vidljivosti, pH, sadržaj, srodne supstance, sterilnost i bakterijski endotoksini za rekonstituisani proizvod. Ispitivanja su vršena metodama opisanim u poglavlju 3.2.2.

Tabela 3.5. Uslovi kondicioniranja i učestalost testiranja tokom ispitivanja stabilnosti

| Uslovi skladištenja | | Vremenske tačke za testiranje (meseci) |
|---------------------|-----------------------------|--|
| Ubrzane | 40 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH | 0*, 3 i 6* |
| Intermedijarne | 30 °C ± 2 °C/65% ± 5% RH | 0*, 3, 6, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60* |
| Dugotrajne | 25 °C ± 2 °C/60% ± 5% RH | 0*, 3, 6, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60* |
| Drugo | 30 °C/75% RH | 0*, 3, 6*, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60 |

* Vremenske tačke testiranja za evaluaciju *in-use* stabilnosti (stabilnosti u toku upotrebe)

Tokom ispitivanja fotostabilnosti, u komori *Sanyo PSC 022*, primenjena je opcija 2 iz ICH Q1B [75]: uzorci bočica bez i sa sekundarnom ambalažom su izlagani vidljivoj i UV svetlosti do postizanja ukupnog zračenja od 1,2 miliona luks sati. Za inicijalni liofilizirani proizvod određivan je izgled, a nakon kondicioniranja određivani su izgled, čestice ispod granice vidljivosti, pH, sadržaj, srodne supstance, sterilnost i bakterijski endotoksini. Ispitivanja su vršene metodama opisanim u poglavlju 3.2.2.

In-use ispitivanje je vršeno u više tačaka. Uslovi kondicioniranja, kao i vremenske tačke na kojima je vršeno ispitivanje, su navedene u Tabeli 3.5. Ispitivani uzorci su rekonstituisani i rekonstituisani rastvor je čuvan na sobnoj temperaturi 12 h. Ispitivani su izgled, čestice ispod granice vidljivosti, pH, sadržaj, srodne supstance, sterilnost i bakterijski endotoksini, inicijalno i u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Ispitivanja su vršene metodama opisanim u poglavlju 3.2.2.

3.2.2 Analitičke metode u ispitivanju gotovog proizvoda

Analitičke metode korišćene u ispitivanju gotovog proizvoda koji je bio predmet istraživanja ove teze se mogu podeliti na metode za testiranje praška za rastvor za injekciju/infuziju i na metode za testiranje proizvoda dobijenog nakon rekonstitucije. U nastavku je dat detaljan opis postupaka primenjenih prilikom izvođenja svakog testa u okviru ovih ispitivanja.

3.2.2.1 Analitičke metode u ispitivanju liofiliziranog proizvoda

Ispitivanja primenjena na liofiliziranom proizvodu su: izgled, identifikacija, ujednačenost doziranog oblika, sadržaj vode i vreme rekonstitucije. Opis metoda primenjenih za svaki od navedenih ispitivanja sledi u nastavku:

- Ispitivanje izgleda se sprovodi vizuelnom kontrolom. Deset bočica se stavi na belu podlogu, a zatim se opišu boja i oblik liofiliziranog kolača u bočici.
- Ispitivanje identifikacije se sastoji od identifikacije esomeprazola, identifikacije edetata i identifikacije natrijuma. Identifikacija esomeprazola obuhvata primenu UV-VIS (engl. *Ultraviolet-visible spectroscopy* - Ultraljubičasto-vidljiva spektroskopija) metode na *Thermo Scientific™ Evolution™ 350 UV-Vis* spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific Inc*, Waltham, MA, SAD) i HPLC metode na hromatografu *Acquity H-Class® UPLC system* (*Waters Corporation*, Milford, SAD). Za postupak koji uključuje primenu UV-VIS metode, potrebni su rastvarač, poredbeni rastvor i ispitivani rastvor. Priprema rastvarača se sprovodi prenošenjem 1,045 g trinatrijum-fosfata dodekahidrata ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) i 3,940 g dinatrijum-hidrogen-fosfata dodekahidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) u sud od 1000 ml, koji se dalje rastvaraju u 1000 ml vode. Poredbeni rastvor se priprema prenošenjem 34,0 mg radnog standarda esomeprazol-natrijuma u odmernu tikvicu od 100 ml, rastvaranjem ove količine u 70 ml rastvarača i dopunjavanjem rastvaračem do oznake. Dobijeni rastvor se u zapremini od 5,0 ml prenosi u odmernu tikvicu od 100 ml i razblažuje rastvaračem do oznake. Za pripremu ispitivanog rastvora sakupljaju se rekonstituisani rastvori iz 5 bočica gotovog proizvoda. Uzima se 4,0 ml od zbirnog rekonstituisanog rastvora, prenosi u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjava rastvaračem do oznake. Naposljetku, 5,0 ml dobijenog rastvora se prenosi u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjava rastvaračem do oznake. Sa ciljem identifikacije esomeprazola, UV-VIS spektri poredbenog i ispitivanog rastvora u opsegu 200 - 450 nm se snimaju. Zahtev koji mora da se zadovolji jeste da UV-VIS spektri poredbenog i ispitivanog rastvora imaju maksimum na istim talasnim dužinama (plus/minus 2 nm). Za identifikaciju esomeprazola HPLC metodom, ispitivanje se vrši prilikom izvođenja testa za određivanje sadržaja (opisano u nastavku, u tački 3.2.2.2). Retenciono vreme i oblik glavnog pika na hromatogramu ispitivanog rastvora treba da odgovaraju retencionom vremenu i obliku glavnog pika na hromatogramu poredbenog rastvora. Identifikacija edetata se takođe sprovodi HPLC metodom na hromatografu *Acquity H-Class® UPLC system* (*Waters Corporation*, Milford, SAD). U tu svrhu, pripremaju se mobilne faze A i B, rastvarač, poredbeni i ispitivani rastvor. Za pripremu mobilne faze A, 2,31 g tetrametil-amonijum-bromida se prenosi u sud od 1000 ml, rastvara u 1000 ml vode i filtrira kroz 0,45 μm membranski filter, nakon čega se vrši degasiranje. Mobilnu fazu B čini acetonitril. Priprema rastvarača se sastoji od prenošenja 300 mg bakar-nitrat-trihidrata u sud od 1000 ml i rastvaranja u 1000 ml vode. Priprema poredbenog rastvora se izvodi postupkom koji uključuje prenošenje 15,3 mg dinatrijum-edetata u odmernu tikvicu od 50 ml, rastvaranje u 35 ml rastvarača i dopunjavanje rastvaračem do oznake. Dobijeni rastvor se zatim filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Ispitivan rastvor se dobija postupkom koji obuhvata rastvaranje liofiliziranog kolača u 5 ml rastvarača. Rastvor dobijen na ovaj način se dalje filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata.

Hromatografski uslovi koji se koriste prilikom identifikacije edetata su dati u Tabeli 3.6, a shema gradientnog eluiranja je prikazan u Tabeli 3.7, koje slede:

Tabela 3.6. Hromatografski uslovi za izvođenje testa identifikacije edetata (HPLC)

| | |
|-----------------------|--|
| Hromatografska kolona | Zorbax Eclipse XDB CN, 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 μm |
| Detekcija (UV/VIS) | 254 nm |
| Temperatura | 30°C |
| Zapremina injiciranja | 5 μl |
| Protok | 1,5 ml/min |
| Vreme analize | 12 min |

Tabela 3.7. Shema gradijentnog eluiranja u toku identifikacije edetata (HPLC)

| Vreme (min) | A (%) | B(%) |
|-------------|-------|------|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 95 | 5 |
| 7 | 10 | 90 |
| 8 | 10 | 90 |
| 12 | 95 | 5 |

Poredbeni i ispitivani rastvor se injektuje po jednom. Prilikom postupka identifikacije retenciono vreme i oblik glavnog pika na hromatogramu ispitivanog rastvora treba da odgovaraju retencionom vremenu i obliku glavnog pika na hromatogramu poredbenog rastvora (oko 1,0 min).

Identifikacija natrijuma se sprovodi taložnom reakcijom. Postupak obuhvata pripremu rastvora kalijum-karbonata (15 g kalijum-karbonata se rastvara u 100 ml destilovane vode), pripremu rastvora kalijum-hidroksida (2,5 g kalijum hidroksida se rastvara u 50 ml destilovane vode), pripremu rastvora natrijum-hidroksida (8,5 g natrijum hidroksida se rastvara u 100 ml destilovane vode) i pripremu rastvora kalijum-piroantimonata (2 g kalijum-piroantimonata se rastvara u 95 ml tople destilovane vode, a zatim se rastvor hladi u ledenom kupatilu i dodaju mu se rastvor kalijum-hidroksida i 1 ml rastvora natrijum-hidroksida, a nakon 24 h stajanja, rastvor se filtrira i razblažuje sa 150 ml destilovane vode). Postupak izvođenja ispitivanja obuhvata rastvaranje 0,1 g ispitivanog uzorka (liofiliziranog kolača) u 2 ml destilovane vode u bočici i dodavanje 2 ml rastvora kalijum-karbonata, nakon čega se zagreva do ključanja, pri čemu ne nastaje talog. Dobijenom rastvoru se dodaje 4 ml rastvora kalijum-piroantimonata i vrši se zagrevanje do ključanja, nakon čega se pristupa hlađenju u ledenoj vodi i, ukoliko je potrebno, unutrašnjost epruvete se struga staklenim štapićem. Kao krajnji rezultat nastaje gusti, beli talog.

- Ujednačenost doziranog oblika iz liofiliziranog proizvoda se ispituje postupkom koji se izvodi prema metodi po Ph. Eur. 2.9.40. Procenjeni sadržaj aktivne supstance iz svake bočice se izračunava prema jednačini 6.

$$x_i = w_i \times \frac{P}{W} \quad (6)$$

gde su:

x_i – sadržaj aktivne supstance u bočici (mg/ml)

w_i – masa punjenja (mg)

W – srednja vrednost pojedinačne mase punjenja (mg)

P – rezultat dobijen u testu sadržaj (metoda za ispitivanje sadržaja opisana u nastavku, u tački 3.2.2.2), predstavljena kao procenat u odnosu na deklarirani sadržaj (mg/ml)

- Postupak ispitivanja sadržaja vode se izvodi prema metodi po Ph. Eur. 2.5.12. Sadržaj vode u uzorku se određuje pomoću jednačine 7.

$$\% \text{ Voda} = \frac{V \times f \times 100}{W_s} \quad (7)$$

gde su:

V – utrošena zapremina Karl Fisher-ovog reagensa (ml)

f – faktor Karl Fisher-ovog reagensa

Ws – težina uzorka (mg)

- Vreme rekonstitucije se izvodi prema postupku koji obuhvata rekonstituciju sadržaja 6 bočica i merenje vremena rastvaranja, uz vizuelnu kontrolu kompletnosti rastvaranja. Liofilizirani kolač treba potpuno da se rastvori, bez vidljivih ostataka u vidu nerastvorenih čestica. Prosečna vrednost i svi pojedinačni rezultati treba da odgovaraju zahtevu datom u specifikaciji.

3.2.2.2 Analitičke metode u ispitivanju rekonstituisanog proizvoda

Ispitivanja primenjena na gotovom proizvodu nakon rekonstitucije su: izgled, ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti, ispitivanje ispravnosti punjenja, pH, sadržaj, srodne supstance, sterilnost i bakterijski endotoksini. Opis metoda primenjenih za svaki od navedenih ispitivanja sledi u nastavku:

- Ispitivanje izgleda se sprovodi metodom koja obuhvata pripremu bočica za analizu: sa 10 bočica se uklone oznake, izvrši se pranje bočica spolja i sušenje. Svaka bočica pojedinačno se rekonstituiše i ostavi dok se sadržaj u potpunosti ne rastvori, nakon čega se opišu boja i bistrina dobijenog rastvora. U tu svrhu je svaka bočica se lagano izvrne, pazeći da se ne pojave mehurići, i posmatra se 5 s. Prisutnost stranih čestica i pokretnih nerastvornih čestica, ne uzimajući u obzir mehuriće gasa, (staklene čestice, vlakna ili gumu) se zabeleži. Test bistrina se izvodi uz pomoć postupka prema metodi Ph. Eur. 2.2.1, za koji je zahtev da se dobije bistar rastvor. U svrhu izvođenja ovog testa sakupe se rekonstituisani rastvori iz 10 bočica gotovog proizvoda i vrši se priprema rastvora hidrazin-sulfata, priprema rastvora heksametilentetramina, priprema primarne opalescentne suspenzije, priprema poredbenog rastvora opalescencije i priprema poredbene suspenzije I. Priprema rastvora hidrazin-sulfata se izvodi rastvaranjem 1,0 g hidrazin-sulfata u vodi i dodavanjem vode do 100,0 ml, a nakon toga stajanjem rastvora u trajanju od 4 - 6 h. Priprema rastvora heksametilentetramina se izvodi u tikvici od 100 ml sa staklenim čepom u kojoj se rastvori 2,5 g heksametilentetramina u 25,0 ml vode. Prilikom pripreme primarne opalescentne suspenzije (formazin suspenzije) u tikvicu sa rastvorom heksametilentetramina se prenese 25,0 ml rastvora hidrazin-sulfata, homogenizuje se i ostavlja da stoji 24 h. Priprema poredbenog rastvora opalescencije se vrši razblaživanjem 15,0 ml primarne opalescentne suspenzije do 1000,0 ml vodom. Poredbena suspenzija I se priprema razblaživanjem 5 ml poredbenog rastvora opalescentne suspenzije destilovanom vodom do 100 ml. Identične epruvete bezbojnog, providnog neutralnog stakla, ravnog dna i unutrašnjeg prečnika 15 – 25 mm se koriste za ispitivanje bistrine, i vrši se poređenje rekonstituisanog rastvora sa fiziološkim rastvorom i sveže pripremljenom poredbenom suspenzijom. Dubina sloja je 40 mm, a poređenje rastvora se vrši na difuznom dnevnom svetlu 5 minuta nakon pripreme poredbene suspenzije, posmatranjem vertikalno prema crnoj pozadini. Dufuzija svetla treba da bude takva da se poredbena suspenzija I lako može razlikovati od fiziološkog rastvora. Rekonstituisani rastvor se smatra bistrim ako je njegova bistrina ista kao bistrina fiziološkog rastvora korišćenog za posmatranje opisanog iznad, ili ako mu opalescencija nije veća od opalescencije poredbene suspenzije I. Što se tiče ispitivanja boje, postupak se izvodi prema metodi po Ph. Eur. 2.2.2, a specifikacijski zahtev je: najviše Y5 (engl. *Yellow Colour Reference Solution* - standard žute boje prema Ph. Eur. - Y1-Y7) ili GY5 (engl. *Green/Yellow Colour Reference Solution* - standard zeleno/žute boje prema Ph. Eur. - GY1-GY7). Uzorak za ispitivanje se priprema sakupljanjem rekonstituisanih rastvora iz 10 bočica gotovog proizvoda. U zavisnosti od toga da li se test sprovodi u okviru *release* i *shelf-life* ispitivanja ili *in-use* ispitivanja, priprema rastvora se razlikuje. Za *release* i *shelf-life* ispitivanja, žuti poredbeni rastvor (Y) se priprema mešanjem sledećih rastvora u količinama prikazanim u Tabeli 3.8:

Tabela 3.8. Priprema žutog rastvora (Y)

| Žuti osnovni rastvor (ml) | Crveni osnovni rastvor (ml) | Plavi osnovni rastvor (ml) | HCl (1% m/v HCl) ml |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|
| 24 | 6 | 0 | 70 |

Za pripremu poredbenog rastvora Y5 koji se koristi u ispitivanju prenosi se 12,5 ml poredbenog rastvora Y u odmernu tikvicu od 100 ml i razblažuje se do oznake rastvorom 1% m/v HCl. Testiranje

boje rastvora u okviru *release* i *shelf-life* ispitivanja se izvodi prenošenjem rekonstituisanog rastvora u *Nesler*-ovu tubu do visine sloja od 40 mm, a zatim i prenošenja poredbenog rastvora Y5 u drugu *Nesler*-ovu tubu do visine sloja od 40 mm. Boje rastvora se porede u *Nesler*-ovim tubama, prema beloj pozadini, posmatrajući sa vrha na difuznom dnevnom svetlu. Rekonstituisani rastvor ne treba da bude obojen intenzivnije od poredbenog rastvora Y5. Za *in-use* ispitivanja, priprema zelenkastog-žutog rastvora (GY) se vrši pripremom poredbenog rastvora GY i to mešanjem sledećih rastvora u količinama prikazanim u Tabeli 3.9:

Tabela 3.9. Priprema poredbenog rastvora (GY)

| Žuti osnovni rastvor (ml) | Crveni osnovni rastvor (ml) | Plavi osnovni rastvor (ml) | HCl (1% m/v HCl) ml |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|
| 96 | 2 | 2 | 0 |

Za priprema poredbenog rastvora GY5 koji se koristi u ispitivanju prenosi se 3,0 ml poredbenog rastvora GY u odmernu tikvicu od 100 ml i razblažuje se do oznake rastvorom 1% m/v HCl. Postupak ispitivanja podrazumeva prenošenje rekonstituisanog rastvora u *Nesler*-ovu do visine sloja od 40 mm, a nakon toga i prenošenje poredbenog rastvora GY5 u drugu *Nesler*-ovu do visine sloja od 40 mm. Boje ova dva rastvora se porede u *Nesler*-ovim tubama, prema beloj pozadini, posmatrajući sa vrha na difuznom dnevnom svetlu. Rekonstituisani rastvor ne treba da bude obojen intenzivnije od poredbenog rastvora GY5.

- Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti se sprovodi postupkom koji se izvodi prema metodi po Ph. Eur. 2.9.19, Metoda I. Postupak podrazumeva rekonstituciju sadržaja 10 bočica gotovog proizvoda i sakupljanje dobijenih rastvora u čist kontejner. Mehurići gasa se uklanjaju stajanjem zbirnog rastvora u trajanju od 2 minuta, ili tretiranjem rastvora ultrazvukom. Prenese se, ne manje od 5 ml, u aparat i određuje se broj čestica jednakih ili većih od 10 μm i 25 μm . Rezultat prvog merenja se odbacuje i izračunava se srednja vrednost broja čestica ovako ispitano uzorka.
- Postupak određivanja pH vrednost rastvora se izvodi potenciometrijski, metodom po Ph. Eur. 2.2.3. Rekonstituiše se sadržaj iz 5 bočica gotovog proizvoda, prene u suv i čist sud, uroni elektroda pH metra (*Sartorius pH Meter PB-11, Sartorius AG, Getingen, Nemačka*) i očita dobijena pH vrednost.
- Ispitivanje ispravnosti punjenja se obavlja postupkom koji se izvodi prema metodi po Ph. Eur. 2.9.17. Na samom početku se rekonstituišu 3 bočice i sadržaj svake bočice prene u suvi špric sa odmernom iglom ne kraćom od 2,5 cm. Svaki put se uzima novi suvi špric i igla. Mehurići iz šprica i igle se uklone i sadržaj šprica se istisne, bez pražnjenja igle, u standardni graduisani suvi cilindar zapremine 10 ml.
- Sadržaj esomeprazola se određuje HPLC metodom na hromatografu *Acquity H-Class® UPLC system (Waters Corporation, Milford, SAD)*. Kao poredbena supstanca se koristi esomeprazol-natrijum, radni standard. U svrhu sprovođenja metode, priprema se pufer pH 7,60: prenosi se 1,400 g dinatrijum-hidrogen-fosfata, dodekahidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) u odmerni sud od 1000 ml. Rastvori se u 1000 ml vode i pH se podešava na $7,60 \pm 0,05$ sa 20% vodenim rastvorom ortofosforne kiseline. Priprema mobilne faze potrebne za ovo ispitivanje se vrši pripremanjem rastvora koji se sastoji od 750 ml pufera pH 7,60 i 250 ml acetonitrile. Rastvor se homogenizuje, a zatim filtrira kroz 0,45 μm membranski filter i degasira. Pored toga, potreban je i pufer pH 11,0 koji se priprema prenošenjem 0,520 g trinatrijum-fosfata dodekahidrata ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) i 1,970 g dinatrijum-hidrogen-fosfata, dodekahidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) u odmerni sud od 1000 ml i rastvaranjem u 1000 ml vode. Kao rastvarač priprema se rastvor koji se sastoji od 750 ml pufera pH 11,0 i 250 ml acetonitrile. Za poredbene rastvore pripremaju se rastvori u tri razičite koncentracije. U tu svrhu se odmerava 32,0 mg (koncentracija 1), 42,5 mg (koncentracija 2) i 53,0 mg (koncentracija 3) radnog standarda esomeprazol-natrijuma, a svaka odmerena količina se odvojeno prenosi u odmerne tikvice od 100 ml, rastvara se u 70 ml rastvarača i dopunjava rastvaračem do oznake. Dobijeni rastvori se zatim filtriraju kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Priprema ispitivanog rastvora se obavlja sakupljanjem rekonstituisanih rastvora iz 10 bočica gotovog

proizvoda, nakon čega se uzima 5,0 ml zbirnog rekonstituisanog rastvora, prenosi u odmernu tikvicu od 100ml i dopunjava rastvaračem do oznake. Dobijeni rastvor se filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata.

Za svaki uzorak pripremaju se dva ispitivana rastvora, a uslovi ispitivanja su dati u Tabeli 3.10.

Tabela 3.10. Uslovi ispitivanja sadržaja esomeprazola (HPLC metoda)

| | |
|------------------------|--|
| Hromatografska kolona | Luna C18 (2), 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 μm. |
| Detekcija: | 280 nm |
| Temperatura kolone: | 25 °C |
| Zapremina injiciranja: | 10 μl |
| Protok: | 2,0 ml/min |
| Vreme analize: | 14 min |

Poredbene rastvore injektovati po tri puta. Oba ispitivana rastvora, za svaki uzorak, injektovati po jednom. Kalibracija u tri tačke sa poredbenim rastvorima se izvodi pre injektovanja ispitivanja serija, najmanje jednom dnevno. Ispitivanje pogodnosti sistema je validno ako je vrednost faktora simetrije (Ph. Eur. 2.2.46) pika esomeprazola na hromatogramu poredbenog rastvora između 0,8 i 1,5 i koeficijent varijacije površina pikova esomeprazola dobijenih iz tri uzastopna injektovanja poredbenog rastvora koncentracije 2, nije veći od 1,0%. Sadržaj esomeprazola u millilitru rekonstituisanog rastvora izračunava se pomoću jednačine 8.

$$C_x = \frac{W_x \times c \times 0,937}{100} \quad (8)$$

gde su:

C_x – sadržaj esomeprazola (mg/ml)

w_x – odmerena masa radnog standarda korišćenog za pripremu poredbenog rastvora, koncentracije x (mg)

c – sadržaj radnog standarda (mg/mg)

0,937 – korekcionni faktor esomeprazol-natrijuma u esomeprazol

Nakon injektovanja poredbenih rastvora i integracije pikova, izvrši se linearna regresiona analiza metodom najmanjih kvadrata (jednačina 9).

$$A = a + b \times C \quad (9)$$

gde su:

A – površina pika

C – koncentracija esomeprazola (mg/ml)

b – nagib prave koji se može izračunati prema jednačini 10:
$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (C_x - \bar{C}) \times (A_x - \bar{A})}{\sum_{i=1}^n (C_x - \bar{C})^2} \quad (10)$$

a – odsečak se izračunava prema jednačini 11:
$$a = \bar{A} - b \times \bar{C} \quad (11)$$

Za izračunavanje teorijske količine uzorka esomeprazola po millilitru u ispitivanim rastvorima koristi se sledeća jednačina (12).

$$Količina\ uzorka = \frac{40}{100} = 0,4 \quad (12)$$

Nakon injektovanja ispitivanih rastvora i integracije pika (A) procenat od deklarisanog sadržaja (P)

se izračunava prema jednačini koja sledi (13).

$$P = \frac{(A-a) \times 100}{\text{Količina uzorka} \times b} \quad (13)$$

Za izračunavanje količine esomeprazola u 5 ml rekonstituisanog rastvora, koristi se sledeća jednačina 14.

$$\text{mg}/5\text{ml} = \frac{P \times 40}{100} \quad (14)$$

- Srodne supstance se određuju HPLC metodom na hromatografu *Acquity H-Class® UPLC system* (Waters Corporation, Milford, SAD). Kao poredbena supstanca se koristi esomeprazol-natrijum, radni standard. Priprema mobilne faze A se obavlja prenošenjem 3,00 g glicina u odmerni sud od 1000 ml, rastvaranjem u 1000 ml vode i podešavanjem pH na $9,00 \pm 0,05$ sa 50% vodenim rastvorom natrijum-hidroksida. Nakon homogenizovanja, dobijeni rastvor se filtrira kroz 0,45 μm membranski filter i degasira.

Mobilna faza B se priprema mešanjem 850 ml acetonitrile i 150 ml of metanola, nakon čega se dobijeni rastvor filtrira kroz 0,45 μm membranski filter i degasira.

Za pripremu rastvarača 7,6 g natrijum-borata dekahidrata se rastvara u 800 ml vode, dodaje se 1,0 g dinatrijum-edetata i podešava se pH na $11,0 \pm 0,1$ 50% rastvorom natrijum-hidroksida. Dobijeni rastvor se prenosi u odmerni sud od 2000 ml, dodaje mu se 400 ml bezvodnog alkohola i razblažuje se vodom do 2000 ml.

Priprema poredbenog rastvora se vrši prenošenjem 17,00 mg radnog standarda esomeprazol-natrijuma u odmernu tikvicu od 50 ml, rastvaranjem u 30 ml rastvarača i dopunjavanjem rastvaračem do oznake. Nakon toga se prenosi 5,0 ml dobijenog rastvora u odmernu tikvicu od 50 ml i razblažuje se rastvaračem do oznake. Ponovo se prenosi 5,0 ml dobijenog rastvora u odmernu tikvicu od 50 ml i razblažuje rastvaračem do oznake (0,2%), nakon čega se rastvor filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata.

Priprema ispitivanog rastvora se odvija sakupljanjem rekonstituisanih rastvora iz 10 bočica gotovog proizvoda, od kojih se uzima 5,0 ml i prenosi u odmernu tikvicu od 25 ml. Rastvor se dalje filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Ovaj rastvor je potrebno injektovati odmah nakon pripreme.

Za svaki uzorak se pripremaju po dva ispitivana rastvora. Uslovi ispitivanja su dati u Tabeli 3.11, a gradijent je prikazan u Tabeli 3.12.

Tabela 3.11. Uslovi ispitivanja Srodnih supstanci (HPLC metoda)

| | |
|------------------------|--|
| Hromatografska kolona: | Luna C18, 250 x 4,6 mm, veličine čestica 5 μm |
| Detekcija: | 280 nm |
| Temperatura kolone: | 35 °C |
| Zapremina injiciranja: | 20 μl |
| Protok: | 1,0 ml/min |
| Vreme analize: | 40 min |

Tabela 3.12. Shema gradijentnog eluiranja u toku ispitivanja srodnih supstanci

| t (min) | % A | % B |
|---------|------|------|
| 0 | 88,0 | 12,0 |
| 35 | 32,0 | 68,0 |
| 36 | 88,0 | 12,0 |
| 40 | 88,0 | 12,0 |

U kondicionirani hromatografski sistem injektovati rastvarač dva puta, a poredbeni rastvor tri puta, ispitivane rastvore po jednom. Pre određivanja srodnih supstanci izvršiti kalibraciju (opisano kod

određivanja sadržaja). Ispitivanje pogodnosti sistema je validno ako je vrednost faktor simetrije (Ph. Eur. 2.2.46) pika esomeprazola na hromatogramu poredbenog rastvora između 0,8 i 1,5 i koeficijent varijacije površina pikova esomeprazola dobijenih uzastopnim injektovanjem poredbenog rastvora nije veći od 3,0%. Ukoliko je postignuta pogodnost sistema ispituje se prisustvo i sadržaj srodnih supstanci. Prilikom određivanja srodnih supstanci sa hromatograma ispitivanog rastvora odbacuju se pikovi koji potiču od rastvarača i pik esomeprazola. Prisustvo specificiranih nečistoća na hromatogramu ispitivanog rastvora potvrđuje se na osnovu relativnog retencionog vremena (Tabela 3.13), a kvantifikacija na osnovu površine pika esomeprazola na hromatogramu poredbenog rastvora. Pikovi čija je površina manja od 0,1%, tj. limit za kvantifikacije se odbacuju. Nespecificirane nečistoće se kvantifikuju na osnovu površine pika esomeprazola na hromatogramu poredbenog rastvora. Pikove čija je površina manja od 0,1% nečistoće u odnosu na koncentraciju esomeprazola u ispitivanom rastvoru, se odbacuju. Relativna retencionna vremena i korekcionni faktori za specificirane nečistoće navedeni su u Tabeli 3.13.

Tabela 3.13. Pregled relativnih retencionih vremena za esomeprazol i specificirane nečistoće

| Naziv supstance | *RT (min) | **RRT (/) | ***RRF (/) |
|--------------------------------|-----------|-----------|------------|
| Esomeprazol | 21,5 | 1,0 | 1,0 |
| Specificirane nečistoće | | | |
| 4-Hidroksi sulfonska nečistoća | 9,1 | 0,42 | 1,00 |
| 4-Hidroksi nečistoća | 9,8 | 0,46 | 1,00 |
| Sulfonska nečistoća | 16,7 | 0,78 | 1,00 |
| 4-Hidroksi sulfidna nečistoća | 17,5 | 0,81 | 1,80 |
| N-Metil izomeri | 25,0 | 1,16 | 1,00 |

Napomena: *RT – retenciono vreme; **RRT – relativno retenciono vreme, izračunato prema retencionom vremenu esomeprazola; ***RRF – korekcionni faktor

Za izračunavanje procentnog sadržaja nečistoća u odnosu na deklarisan sadržaj esomeprazola, koristi se sledeća jednačina 15 za specificirane nečistoće, odnosno jednačina 16 za nespecificirane nečistoće:

$$\% \text{ Specificirane nečistoće} = \frac{Pa \times Wst \times c \times 0,937 \times CF}{Pst \times 80} \quad (15)$$

gde su:

Pa – površina pika pojedinačne nečistoće na hromatogramu ispitivanog rastvora

Pst – površina pika esomeprazola na hromatogramu poredbenog rastvora

Wst – odmerena masa radnog standarda esomeprazola za pripremu poredbenog rastvora (mg)

c – sadržaj radnog standarda (mg/mg)

0,937 – faktor konverzije esomeprazol-natrijuma u esomeprazol

CF – korekcionni faktor = $\frac{1}{RRF}$

$$\% \text{ Nespecificirane nečistoće} = \frac{Pa \times Wst \times c \times 0,937}{Pst \times 80} \quad (16)$$

gde su:

Pa – površina pika pojedinačne nečistoće na hromatogramu ispitivanog rastvora

Pst – površina pika na hromatogramu poredbenog rastvora

Wst – težina radnog standarda iskorišćena za pripremu poredbenog rastvora (mg)

c – sadržaj radnog standarda (mg/mg)

0,937 – faktor konverzije esomeprazol-natrijuma u esomeprazol

- Sterilnost se ispituje metodom membranske filtracije, prema Ph. Eur. 2.6.1. Prilikom postupka

ispitivanja, svaka bočica se rekonstituiše sa 5,2 ml natrijum-hlorid, rastvorom za infuziju 0,9%. Aparatura koja se koristi uključuje: *Steritest Eqiunox* pumpu, *Millipore Steritest* zatvoreni sistem za praškove u bočicama *TZHA DV210*, sterilne pincete i makaze i *Bunsenov* plamenik. Medijumi koji se koriste prilikom ispitivanja sterilnosti su: *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Fluid Thioglycollate Medium* (FTM), Peptonska voda oficinalna prema USP (engl. *United States Pharmacopeia* - Farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država) (mesni pepton: 5 g/l; mesni ekstrakt: 3 g/l; polisorbit 80: 1 g/l) za vlaženje i ispiranje filtera, natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% za rastvaranje proizvoda. Priprema medijuma se vrši u skladu sa uputstvom proizvođača. Postupak izvođenja testa uključuje: pripremu aparature za rad, dezinfikovanje spoljašnjosti ampula proizvodom, bočica medijumom, *fluidom* za ispiranje i fiziološkim rastvorom, a zatim njihovo unošenje u laminar. Svaki filter se navlaži sa 50 ml peptonske vode, uoci se rastvora pod aseptičnim uslovima, bočice snažno promućkaju, a rekonstituisani sadržaj se filtrira kroz oba membranska filtera. Svaki filter se ispira tri puta sa po 50 ml natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% (tri puta sa po 100 ml natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% za oba filtera). Nakon toga, 100 ml TSB medijuma se dodaje u jedan kontejner i 100 ml FTM medijuma u drugi. Kontejner sa FTM medijumom se inkubira 14 dana na 30-35 °C, a kontejner sa TSB medijumom 14 dana na 20-25 °C. Kontejneri se nakon toga posmatraju svakog dana u toku perioda inkubacije, u cilju uočavanja makroskopskog mikrobiološkog rasta. Kao negativna kontrola svaki filter se navlaži sa 50 ml peptonske vode. Nakon vlaženja filtera, simulira se otvaranje 40 bočica (simulacija manipulacije koja je potrebna da se rekonstituiše liofilizirani kolač, sadržaj se propusti kroz oba filtera *Millipore Steritest* pumpe), kao kontrola aseptičnih tehnika operatera. Svaki filter se ispira sa tri puta po 50 ml natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% (tri puta sa po 100 ml natrijum-hlorid, rastvora za infuziju 0,9% za oba filtera). Nakon toga, 100 ml TSB medijuma se dodaje u jedan kontejner i 100 ml medijuma FTM se dodaje u drugi. Kontejner sa FTM medijumom se inkubira 14 dana na 30-35 °C, a kontejner sa TSB medijumom 14 dana na 20-25 °C. Kontejneri se posmatraju svakog dana u toku perioda inkubacije, radi evidencije makroskopskog mikrobiološkog rasta. Ako nije evidentiran mikrobiološki rast u ispitivanom uzorku, proizvod se smatra sterilnim. U slučaju da je evidentiran mikrobiološki rast u ispitivanom uzorku, smatra se da proizvod nije sterilan, osim ako se sa sigurnošću ne utvrdi da test nije bio validan. Test nije validan ako je ispunjen jedan ili više sledećih uslova: rezultati mikrobiološkog monitoringa u prostoriji u kojoj je izveden test, nisu bili odgovarajući, pregledom korišćenih test procedura se utvrdi greška, ili se potvrdi da je mikrobiološki rast u negativnoj kontroli. Posle identifikacije izolovanih mikroorganizama, može se jasno dokazati da je pozitivan test sterilnosti, rezultat laboratorijske greške. Ako test nije validan, test sa istim brojem uzoraka se ponavlja. Ako se mikrobiološki rast ne dokaže u ponovljenom testu, proizvod se smatra sterilnim. Ako se mikrobiološki rast dokaže u ponovljenom testu, smatra se da proizvod nije sterilan.

- Bakterijski endotoksini se ispituju postupkom koji se izvodi metodom prema Ph. Eur. 2.6.14, *metoda C*.

3.2.3 Ispitivanje prisustva R-enantiomera API esomeprazol

Optička čistoća se ispituje kod uzoraka esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju sa ciljem da se odredi prisustvo R-enantiomer, koji može nastati u toku proizvodnje ili roka upotrebe, metodom koja je opisana u nastavku. Kao poredbene supstance u ovom ispitivanju se koriste radni standard esomeprazol-natrijum i omeprazol prema Ph. Eur. (racemska smeša R i S omeprazol izomeri: natrijum 5-metoksi-2-[(RS)-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol monohidrat), a detaljni opis postupka je dat u nastavku. U okviru postupka koji je korišćen, priprema se pufer pH 6,0, prenošenjem 2,730 g natrijum-dihidrogen-fosfat, dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) u 1000 ml laboratorijsku čašu i rastvaranjem u 1000 ml vode, nakon čega se pH podešava na $6,00 \pm 0,05$ koristeći 1M vodeni rastvor natrijum-hidroksida. Pored toga, priprema se mobilna faza, odnosno rastvor koji se sastoji od 750 ml pufera pH 6,0 i 250 ml metanola, koji se nakon homogenizacije filtrira kroz 0,45 μm membranski filter i degasira. Takođe, priprema se i pufer pH 11,0, rastvaranjem 1,045 g trinatrijum-fosfat dodekahidrata ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) i 3,940 g dinatrijum-hidrogen-fosfat, dodekahidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) u 1000 ml vode u laboratorijskoj čaši od 1000 ml. Kao rastvarač koristi se rastvor koji se sastoji od 750 ml pufera pH 11,0 i 250 ml metanola. Za pripremu poredbenog rastvora A, 17,0 mg esomeprazol-natrijuma, internog radnog standarda se rastvara u 70 ml rastvarača u volumetrijskom erlenmajeru od 100 ml, nakon čega se isti rastvarač dodaje do oznake. Dobijeni rastvor (4,0 ml) se prenosi u volumetrijski erlenmajer od 50 ml i rastvara rastvaračem do oznake, a nakon toga se 5,0 ml ovog rastvora prenosi u volumetrijski erlenmajer od 50 ml i rastvara u rastvaraču dodavanjem do oznake (0,2%). Dobijeni rastvor se filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Poredbeni rastvor B se dobija rastvaranjem 3,40 mg omeprazola prema Ph. Eur., u 70 ml rastvarača u volumetrijskom erlenmajeru od 100 ml, i dodavanjem rastvarača do oznake. Dobijeni rastvor se filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Priprema ispitivanog rastvora se sprovodi pripremom rastvora iz 10 bočica leka, od kojih se 4,0 ml prebacuje u volumetrijski erlenmajer od 50 ml i dodaje rastvarač do oznake. Dobijeni rastvor se filtrira kroz 0,45 μm membranski filter odbacujući prva 2 ml filtrata. Za svaki uzorak se priprema dva rastvora za ispitivanje. Uslovi ispitivanja su dati u Tabeli 3.14:

Tabela 3.14. Uslovi ispitivanja prisustva R-enantiomera API esomeprazol

| | |
|------------------------|--|
| Hromatografska kolona: | Luna C18 (2), 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 μm |
| Detekcija: | 302 nm |
| Temperatura kolone: | 25 °C |
| Zapremina injiciranja: | 10 μl |
| Protok: | 0,4 ml/min |
| Vreme analize: | 20 min |

U kondicioniran hromatografski sistem injektuje se poredbeni rastvor A tri puta, poredbeni rastvor B dva puta, a oba ispitivana rastvora, za svaki uzorak po jednom. Pogodnost sistem je validna ukoliko koeficijent varijacije površina pikova esomeprazola dobijenih uzastopnim injektovanjem poredbenog rastvora A nije veći od 3,0% i na hromatogramu poredbenog rastvora B rezolucija između pikova R-omeprazola i esomeprazola nije manja od 2,0. Za izračunavanje sadržaja R-omeprazola u procentima u odnosu na deklarisan sadržaj esomeprazola koristi se jednačina 17.

$$\%(\text{R}) - \text{omeprazol natrijuma} = \frac{y-a}{b} \times \frac{1}{c} \times 100 \quad (17)$$

gde su:

y - Površina (R)-omeprazol natrijuma WS u ispitivanom rastvoru

a - Y-odsečak na kalibracionom grafiku dobijen sa standardnim rastvorima

b - Nagib na kalibracionom grafiku dobijen sa standardnim rastvorima

C - Koncentracija uzorka ($\mu\text{g/mL}$)

3.2.4 Procena rizika

3.2.4.1 Preliminarna analiza rizika

Inicijalna procena rizika obuhvata pregled svih potencijalnih faktora koji mogu uticati na kvalitet proizvoda i njihovo grupisanje u određene kategorije. Analiza je izvršena na osnovu literaturnih podataka, znanja i iskustva sa ispitivanim proizvodom i njemu sličnim proizvodima i na osnovu raspoloživih rezultata. Hijerarhijsko organizovanje identifikovanih rizika je izvršeno u formi *Ishikawa* dijagrama (dijagrama riblje kosti, engl. *Fish bone*) kao alata za rizik analizu.

3.2.4.2 Analiza efekata u slučaju neizvršenja

Procena rizika je sprovedena kako bi se identifikovali svi mogući rizici potencijalnih neizvršenja tj. odstupanja (engl. *failure*) povezani sa formulacijom proizvoda, kritičnim proizvodnim koracima ili kritičnim delovima opreme/sistema, a zatim opisali efekti rizika i procenila ozbiljnost svakog od ovih rizika na proizvod ili proces proizvodnje. Analizirani su svi potencijalni CMA, CPP i CQA. Za svaki pobrojani atribut materijala ili procesni parametar su najpre definisana potencijalna odstupanja/neusaglašenosti u odnosu na CQA proizvoda. Za kvalitativnu i kvantitativnu procenu rizika u FMEA evaluaciji korišćeni su verovatnoća pojave odstupanja (engl. *Probability* - P), ozbiljnost posledica neusaglašenosti (engl. *Severity* - S), i mogućnost detekcije (engl. *Detectability* - D). Svaki od ovih atributa profila rizika je opisan na skali od pet poena koja je prikazana u Tabeli 3.14. Ozbiljnost posledica neusaglašenosti (S) procenjuje koliko bi efekti bili ozbiljni u slučaju da dođe do potencijalnog rizika na osnovu nivoa uticaja neizvršenja tj. odstupanja na kvalitet proizvoda i performanse procesa ili efekat na pacijente. Verovatnoća (P) pojave procenjuje učestalost pojave potencijalnog rizika, na osnovu podataka iz rezultata prethodno proizvedenih serija i iskustva sa sličnim proizvodima. Na osnovu podataka prikupljenih u trenutku kada postoji svesnost o pojavi neusaglašenosti i njegove zavisnosti o utvrđenoj metodi detekcije, procenjuje se sposobnost otkrivanja potencijalnog neizvršenja tj. odstupanja (detektabilnost (D)). RPN za svaki proizvodni korak je proizvod njegove tri pojedinačne ocene za prethodno objašnjene komponente, ozbiljnost posledica neusaglašenosti, verovatnoću i detektabilnost. Na osnovu dobijenog RPN-a, rizik se smatra malim za vrednosti manje od 40, za RPN-ove od 40 do 99 srednjim, a za RPN jednake 100 i više - visokim rizikom (RPN granice interno definisane).

Tabela 3.15. Kvalitativna i kvantitativna skala za procenu parametara rizika (S, P, D) u FMEA

| Ozbilnost posledica neusaglašenosti (S) | |
|--|--|
| 5 | Veoma visoka Serija neodgovarajućeg kvaliteta, veliki uticaj na kvalitet proizvoda, moguća reklamacija, proizvod nije u skladu sa specifikacijom, uticaj na više od jednog CQA i /ili veliki uticaj na karakteristike procesa (za više od jedne procesne faze nemoguće je podešavanje procesnih parametara u uobičajenom opsegu specifikacije mašine za dobijanje međuproizvoda/proizvoda željene specifikacije, ali je moguće prevazići podešavanjem blizu limita tehničkih specifikacija mašine alternativnom opremom, procedurom, itd.). |
| 4 | Visoka Uticaj na kvalitet proizvoda, moguće neslaganje proizvoda sa specifikacijom, uticaj na ne više od jednog CQA i/ili veći uticaj na karakteristike procesa (za jednu procesnu fazu nemoguće je podesiti procesne parametre u uobičajenom opsegu specifikacije mašine za dobijanje međuproizvoda/proizvoda željenog kvaliteta, ali moguće je prevazilaženje podešavanjem blizu limita tehničkih specifikacija mašine ili sa alternativnom opremom, procedurom, itd.). |
| 3 | Srednja Rezultat van specifikacije kod više od jednog parametra kvaliteta osim CQA i/ili srednji uticaj na karakteristike procesa (za više od jedne proizvodne faze je neophodno podešavanje procesnih parametara u uskom opsegu, da bi se dobio međuproizvod/proizvod željenih karakteristika). |
| 2 | Niska Malo odstupanje u parametru kvaliteta osim CQA i/ili nizak uticaj na karakteristike procesa (samo za jednu proizvodnu fazu je neophodno podešavanje procesnih parametara u uskom intervalu za dobijanje međuproizvoda željenih karakteristika). Bez uticaja na kvalitet proizvoda. |
| 1 | Veoma niska Bez rezultata van specifikacije i odstupanja i/ili nizak uticaj na karakteristike procesa (moguće podešavanje procesnih parametara u širem opsegu za sve proizvodne faze u cilju dobijanja međuproizvoda/proizvoda željenog kvaliteta). Bez uticaja na kvalitet proizvoda i robustnost procesa. |
| Verovatnoća (P) | |
| 5 | Veoma visoka Veoma visoka verovatnoća odstupanja/neusaglašenosti Odstupanje/neusaglašenost je neizbežna i ponoviće se kod svake serije. |
| 4 | Visoka Visoka verovatnoća odstupanja/neusaglašenosti Pojava odstupanja/neusaglašenosti je sigurna i dokazana relevantnim iskustvom sa proizvodom (<i>scale-up</i> serije/probe/validacija/prethodno proizvedene serije) ili povezana sa iskustvom ponovljenih neuspeha sa sličnim proizvodima. |
| 3 | Srednja Srednja verovatnoća pojave odstupanja/neusaglašenosti Verovatnoća pojave odstupanja/neusaglašenosti je primećena tokom <i>scale-up</i> serije/proba/validacije/prethodno proizvedenih serija na drugim proizvodnim lokacijama ili drugoj proizvodnoj opremi i sa sličnim proizvodima. Ako se ispoštuju procedure, mogućnost odstupanja/neusaglašenosti je minimalna. |
| 2 | Niska Niska verovatnoća pojave odstupanja/neusaglašenosti Verovatnoća pojave odstupanja/neusaglašenosti je primećena kod jedne ili nekoliko <i>scale-up</i> serija/proba/validacija/prethodno proizvedenih serija na drugim proizvodnim lokacijama ili drugoj proizvodnoj opremi i sa sličnim proizvodima, sumnja na povremeno odstupanje/neusaglašenost. |
| 1 | Veoma niska Nema verovatnoće ili izrazito niska verovatnoća pojave odstupanja/neusaglašenosti Nije bilo pojave serije neodgovarajućeg kvaliteta ranije sa istim ili sličnim proizvodom, bez očekivane verovatnoće događaja. |
| Detektabilnost (D) | |
| 1 | Veoma niska Nema mogućnosti detekcije odstupanja/neusaglašenosti. Reklamacija proizvoda posle puštanja serije ili tokom/posle studije stabilnosti. |
| 2 | Niska Nevalidirana (manuelna ili automatska) detekcija (npr. vizuelna inspekcija sudova posle operacije). Detekcija tokom finalnog testiranja. |
| 3 | Srednja Jedan manuelni operativni validirani sistem detekcije, koji nije direktna mera odstupanja/neusaglašenosti (npr. in-procesni parametri (IPC) nisu direktno povezani sa odstupanjem/neusaglašenošću). Detekcija posle operacije procesa i tokom sledećih operacija procesa. |

Tabela 3.15. Kvalitativna i kvantitativna skala za procenu parametara rizika (S, P, D) u FMEA (nastavak)

| Detektabilnost (D) | |
|---------------------------|--|
| 4 | Visoka Manuelni operativni validirani sistem detekcije je direktna mera odstupanja/neusaglašenosti (npr. IPC odstupanje). Detekcija tokom operacije procesa. |
| 5 | Veoma visoka Validirani automatski sistem detekcije koji je direktna mera odstupanja/neusaglašenosti. Dva ili više manualnih operativnih validiranih sistema, direktnih ili indirektnih (npr.opseg i IPC). Detekcija pre operacije procesa. |

3.2.5 Uspostavljanje *design space*-a

Uticaj kritičnih parametara procesa izabranih putem FMEA, na kritične atribute kvaliteta proizvoda, analiziran je korišćenjem veštačkih neuronskih mreža pomoću softvera *TIBCO Statistica® Software 13.5.0 (StatSoft Inc.)*. Podaci iz 32 eksperimentalna ciklusa su podeljeni u set za trening, validaciju i testiranje (25:5:2). Mreža višeslojnih perceptrona (MLP) je obučena korišćenjem algoritma povratnog širenja. Najbolja mreža je izabrana na osnovu najmanjih RMS vrednosti (engl. *Root Mean Square* - kvadrat aritmetičke sredine) za skup podataka o treningu, validaciji i testiranju. Validirani model je iskorišćen za definisanje *design space*-a za proces liofilizacije.

3.2.6 Izgradnja i primena veštačke neuronske mreže

Veštačka neuronska mreža je izgrađena korišćenjem softvera: *TIBCO Statistica® Software 13.5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD)*. Ulazni podaci za mrežu su bili pH vrednosti rekonstituisanog rastvora iz 9 serija (5 serija čuvanih na temperaturi od 20 °C i 4 serije na temperaturi od -30 °C) i vreme (u mesecima) tokom ispitivanja stabilnosti (0 meseci – inicijalno, 3 meseca, 6 meseci, 9 meseci, 12 meseci, 18 meseci, 24 meseca, 30 meseci, 36 meseci). Pet mrežnih izlaza su odgovarali sadržajuesomeprazola i četiri nečistoće (nečistoća 4-hidroksi sulfida, nečistoća sulfona, 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinska kiselina, 4-hidroksi nečistoća). Podaci iz 81 eksperimentalne serije su podeljeni na skupove za trening, validaciju i testiranje mreža (64:13:4). Mreža višeslojnih perceptrona (MLP) je obučena korišćenjem algoritma povratnog širenja (*back-propagation* algoritma). Najbolja mreža je izabrana na osnovu najmanjih RMS vrednosti za skup podataka o obuci, validaciji i testiranju. Validirani model je iskorišćen za uspostavljanje *design space*-a procesa liofilizacije.

4.0 Rezultati i diskusija

4.1 Ispitivanje kinetike degradacije API, studija stabilnosti i analiza uticaja faktora kritičnih za dobijanje stabilnog gotovog proizvoda

4.1.1 Proizvodnja i ispitivanje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

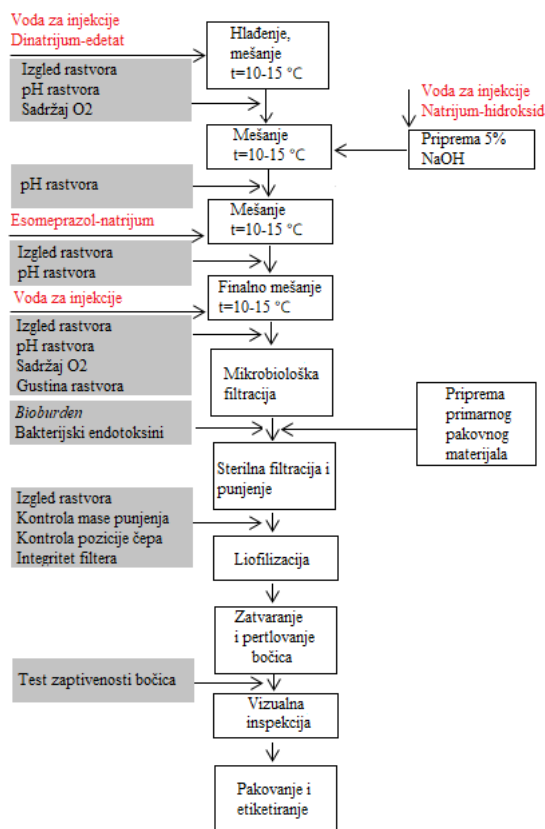
Esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju sadrži 40 mg esomeprazola u obliku esomeprazol-natrijum, koji je korišćen kao aktivna supstanca tokom proizvodnje. Veličina serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju je 35,265 kg (35,020 l), odnosno 17.000 bočica. Formulacija esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju prikazana je u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Proizvodna formula esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju

| Naziv sirovine | Uloga |
|----------------------|--------------------------------------|
| Esomeprazol-natrijum | Aktivna supstanca (API) |
| Dinatrijum-edetat | Kompleksirajuće sredstvo |
| Natrijum-hidroksid | Sredstvo za podešavanje pH vrednosti |
| Voda za injekcije* | Rastvarač |

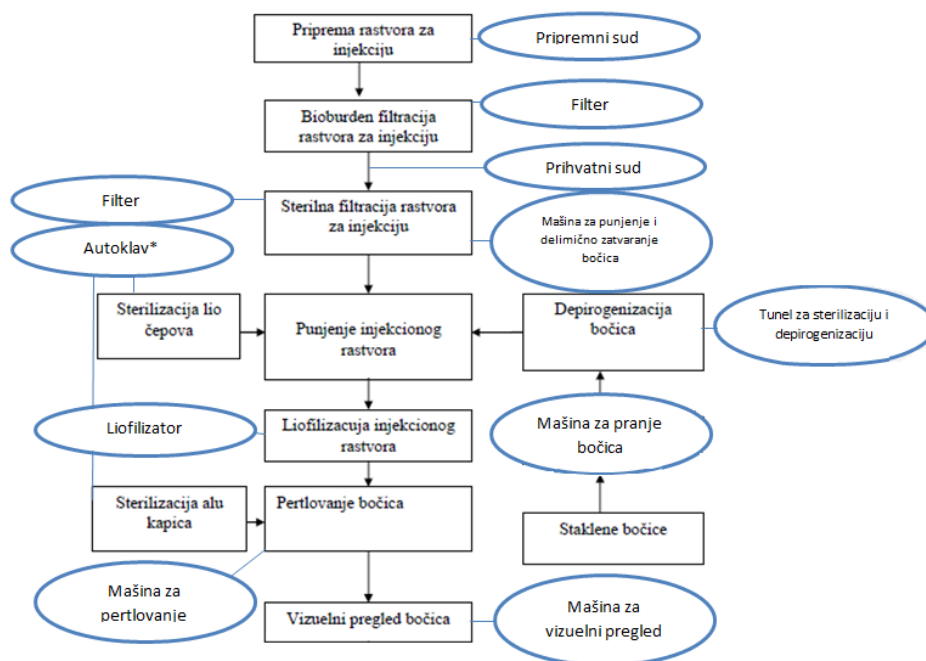
* Uklanja se tokom procesa liofilizacije.

Prvi korak u proizvodnji esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg je podrazumevao pripremu *bulk* rastvora, koji je dobijen jednostavnim rastvaranjem čvrstih, lako rastvorljivih polaznih sirovina u vodi za injekcije (engl. *Water for injections* - WFI), podešavanjem pH vrednosti rastvora (na pH 10,8-11,8) i dodavanjem rastvarača (WFI) do propisane finalne zapremine. Sistem za aseptičnu pripremu rastvora i prvu filtraciju (filtracija smanjenja bioopterećenja) se sastoji od pripremnog suda, filterske jedinice i prihvatnog suda (*Lurgi TPS AG*, Bubendorf, Švajcarska). Priprema *bulk* rastvora je praćena sterilnom filtracijom i punjenjem rastvora u staklene bočice, koje su dalje delimično zatvorene utiskivanjem gumenog čepa na mašini *Sterifill F200* (*IMA*, Fairfield, CT, SAD). Da bi se efikasno izvršio proces liofilizacije koji sledi u liofilizatoru *Lyomax 16* (*BOC Edwards Pharmaceuticals Systems*, Tonawanda, NY, SAD) bočice su samo delimično zatvorene. Na samom kraju procesa proizvodnje, vrši se inspekcija potpuno zatvorenih i zapertlovanih bočica (na poluatomatskoj mašini za vizuelnu inspekciju *V90+*, *Seidenader*, Markt Sewaben, Nemačka). Sve proizvodne faze su predstavljene u dijagramu toka procesa (Slika 19), gde je prikazan pregled svih procesnih i in-procesnih parametara za svaku proizvodnu fazu.



Slika 19. Dijagram toka procesa proizvodnje esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju; sirovine su prikazane crvenim slovima; IPC uokviren sivom bojom

Pregled opreme koja se koristi u svakoj od proizvodnih faza tokom procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju prikazan je na Slici 20.



* Autoklav za sterilizaciju opreme, gumenih zatvarača i alukapica

Slika 20. Spisak opreme za proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

Sve serije API esomeprazol-natrijum koje su korišćene u proizvodnji su prethodno ispitane. Rezultati celokupnog fizičko-hemijskog ispitivanja su bili u okviru propisanih specifikacija (specifikacije odobrenih proizvođača API - *Jubilant Life Sciences*, Indija i *Uquifa*, Španija su prikazane u Tabeli 4.2).

Tabela 4.2. Specifikacija ispitivanja esomeprazol-natrijuma

| Test | Deklarisana vrednost | Metoda |
|--|---|---------------------|
| Osobine - Jubilant - Uquifa | Beo, skoro beo ili svetlo krem prašak Bela do žućkasto bela čvrsta supstanca | Vizuelna |
| Rastvorljivost | Lako rastvorljiv u vodi i gotovo nerastvorljiv u etru. | Ph. Eur. 1.01. |
| pH (Uquifa) | 10,3-11,3 | Ph. Eur. 2.2.3 |
| - IR (Jubilant i Uquifa) | Pozitivna | Ph. Eur. 2.2.24. |
| - HPLC (Jubilant) | Pozitivna | DMF* |
| - Test za Natrijum (Jubilant i Uquifa) | Odgovara zahtevima za natrium | Ph. Eur. 2.3.1.a |
| Voda - Jubilant - Uquifa | Između 8,0% i 12,0% Max 6,0% | Ph. Eur. 2.5.12. |
| Teški metali | Manje od 20 ppm | USP <231> metod II |
| Srodne supstance HPLC - Jubilant Nečistoća A (MBT) Nečistoća B (Desmetoksi) Nečistoća C (Sulfid) Nečistoća D (Sulfon) Nečistoća E (N-oksidi) Nepoznata pojedinačna nečistoća Ukupne nečistoće - Uquifa Nečistoća A Nečistoća B Nečistoća C Nečistoća D Nečistoća E Nečistoća F Nečistoća G Nečistoća H Nečistoća I Maksimalno nepoznatih Ukupne nečistoće | Najviše 0,10% Najviše 0,10% Najviše 0,10% Najviše 0,20% Najviše 0,10% Najviše 0,10% Najviše 0,50% | DMF*,** |
| Optička čistoća HPLC - R-izomer (Nečistoća F) | Najviše 0,20% | Interna HPLC metoda |
| Optička nečistoća R-omeprazol | Najviše 0,2% | DMF** |
| Sadržaj HPLC (anhidrovana baza) | Ne manje od 98,0% i ne više od 102,0% m/m | DMF*,** |

Napomene: * DMF (engl. *Drug master file* – glavni dokument o sirovini) DMF OMN/[O]/050-13.04.12 od proizvođača Jubilant Life Sciences, Indija, **DMF AP/04/2015-09-30 od proizvođača Uquifa, Španija

Tabela 4.2. Specifikacija ispitivanja esomeprazol-natrijuma (nastavak)

| Test | Deklarisana vrednost | Metoda |
|-------------------------------|----------------------|--------|
| Zaostali rastvarači GC | | |
| - Jubilant: | | |
| Metanol | Najviše 3000 ppm | DMF** |
| Toluen | Najviše 890 ppm | |
| Metil izobutil keton | Najviše 5000 ppm | |
| Metil etil keton | Najviše 5000 ppm | |
| Cikloheksan | Najviše 3880 ppm | |
| Mezitol oksid | Najviše 40 ppm | |
| - Jubilant i Uquifa | | |
| Dihlrometan | Najviše 600 ppm | |
| - Uquifa: | | |
| Etanol | Najviše 1000 ppm | |

Napomene: * DMF (engl. *Drug master file* – glavni dokument o sirovini) DMF OMN/[O]/050-13.04.12 od proizvođača Jubilant Life Sciences, Indija, **DMF AP/04/2015-09-30 od proizvođača Uquifa, Španija

Sve serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju proizvedene su u skladu sa GMP zahtevima i specifikacijama utvrđenim za ovaj proizvod.

Finalni proizvod esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju je ispitan u skladu sa testovima, metodama i kriterijumima prihvatljivosti koji su opisani u Specifikaciji gotovog proizvoda (Tabela 4.3), dok je obrazloženje za svaki od testova dato u Tabeli 4.4. Specifikacija esomeprazol praška za injekciju/infuziju sastoji se od zahteva važeće Ph. Eur. i dodatnih, interno propisanih testova za ovaj farmaceutski oblik.

Tabela 4.3. Specifikacija gotovog proizvoda (esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg)

| R.b. | Test | Metoda | Deklarisana vrednost |
|---------------------------------|---|--|---|
| LIOFILIZIRANI PROIZVOD | | | |
| 1. | Izgled | Vizuelno, interni propis* | Beo do skoro beo porozni kolač ili prašak |
| 2. | Identifikacija Esomeprazol Edetat Natrijum | UV, interni propis* HPLC, interni propis* HPLC, interni propis* Taložna reakcija, interni propis* | Pozitivna Pozitivna Pozitivna Pozitivna |
| 3. | Ujednačenost doziranog oblika (preko Variranja mase) | Ph. Eur. 2.9.40 | L1: AV ≤ 15 L2: ni jedan pojedinačni sadržaj nije manji od 0,75 M ni veći od 1,25 M |
| 4. | Voda | Potenciometrijski, Ph. Eur. 2.5.12 | <i>Release</i> : Najviše 3,0% <i>Shelf-life</i> : Najviše 5,0% |
| 5. | Vreme rekonstitucije | Interni propis* | Najviše 60 s |
| REKONSTITUISANI PROIZVOD | | | |
| 6. | Izgled Bistrina rastvora Boja rastvora | Vizuelno, interni propis* Ph. Eur. 2.2.1 Ph. Eur. 2.2.2 | Bistar, bezbojan do slabo žuti rastvor, praktično bez vidljivih čestica Bistar Najviše Y ₅ ili GY ₅ |
| 7. | Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti Čestice ≥ 10 μm Čestice ≥ 25 μm | Ph. Eur. 2.9.19, Metoda I | Najviše 6000 čestica/bočica Najviše 600 čestica/bočica |
| 8. | pH | Potenciometrijski, Ph. Eur. 2.2.3 | 9,0 – 11,0 |
| 9. | Ispitivanje ispravnosti punjenja | Ph. Eur. 2.9.17 | Ne manje od 5,0 ml |
| 10. | Sadržaj esomeprazola | HPLC, interni propis* | 95 - 105% (38,0 – 42,0 mg/5 ml) |

* Napomena: metoda detaljno objašnjena u poglavlju 3.2.2

Tabela 4.3. Specifikacija gotovog proizvoda (esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg) (nastavak)

| R.b. | Test | Metoda | Deklarisana vrednost |
|----------|---|--------------------------|--|
| 11. | Srodne supstance: | HPLC, interni propis* | |
| | - Sulfonska nečistoća | | <i>Release</i> : Najviše 0.25% <i>Shelf-life</i> : Najviše 0,4% |
| | - 4-Hidroksi sulfonska nečistoća | | <i>Release</i> : Najviše 0,2% <i>Shelf-life</i> : Najviše 0,6% |
| | - 4-Hidroksi nečistoća | | <i>Release</i> : Najviše 0,2% <i>Shelf-life</i> : Najviše 0,9% |
| | - 4-Hidroksi sulfidna nečistoća | | <i>Release</i> : Najviše 0,2% <i>Shelf-life</i> : Najviše 0,4% |
| | - N-Metil izomeri | | <i>Release</i> : Najviše 0,2% <i>Shelf-life</i> : Najviše 0,9% |
| | - Nespecificirane, pojedinačno | | Najviše 0,2% |
| - Ukupne | <i>Release</i> : Najviše 1,5% <i>Shelf-life</i> : Najviše 2,5% | | |
| 12. | Sterilnost | Ph. Eur. 2.6.1 | Sterilan |
| 13. | Bakterijski endotoksini | Ph. Eur. 2.6.14, Metod C | Najviše 3,125 IU/mg |

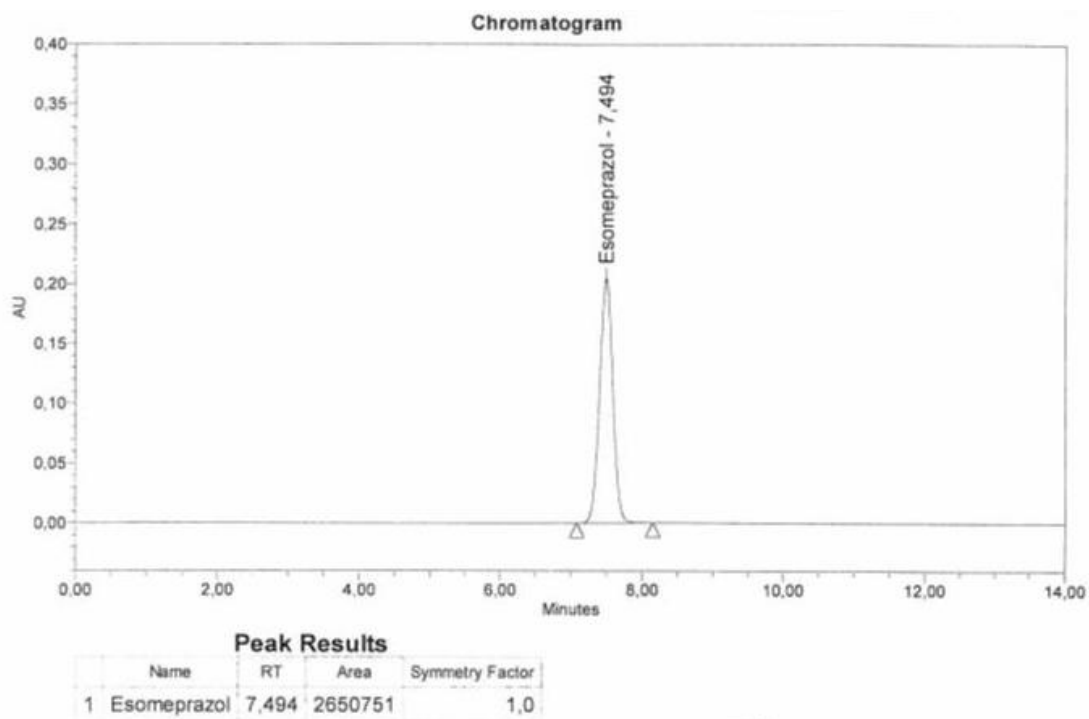
* Napomena: metoda detaljno objašnjena u poglavlju 3.2.2

Tabela 4.4. Obrazloženje specifikacije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

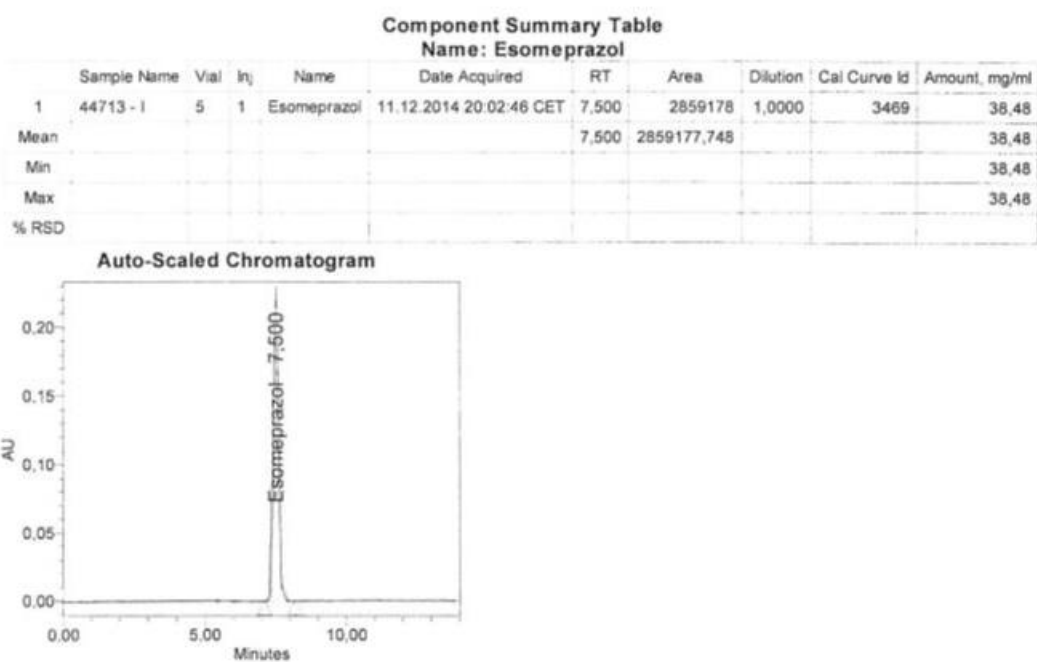
| Test | Obrazloženje kriterijuma prihvatljivosti |
|---|--|
| Liofilizirani proizvod | |
| Izgled | Test Izgled se zahteva u skladu sa ICH vodičem za specifikacije. Specifikacija potvrđuje izgled liofiliziranog proizvoda [71]. |
| Identifikacija - Esomeprazol - Edetat - Natrijum | Ispitivanje identifikacije potvrđuje da je farmaceutski proizvod pozitivan na prisustvo lekovite supstance, kao i edetata i natrijuma. Izvodi se u skladu sa trenutno važećim ICH vodičem za specifikacije, HPLC i UV metodama opisanim u poglavlju 3.2.2; HPLC metoda se koristi za esomeprazol i edetat, a reakcija precipitacije za natrijumov jon [71]. Hromatogrami poredbenog rastvora i ispitivanog rastvora esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju dobijeni tokom identifikacije esomeprazola i ispitivanja sadržaja esomeprazola su prikazani na Slikama 21-22. Hromatogrami rastvarača, poredbenog rastvora i ispitivanog rastvora esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju dobijeni tokom identifikacije edetata prikazani su na Slikama 23-25. |
| Ujednačenost doziranog oblika (preko Variranja mase) | Ispitivanje odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.9.40 za parenteralne proizvode, praška za injekcije ili infuzije [28]. |
| Voda | Ispitivanje se zahteva na osnovu ICH vodiča za specifikacije za rekonstituciju farmaceutskih oblika za parenteralnu primenu. Granične vrednosti specifikacije su definisane na osnovu podataka dobijenih u toku razvoja formulacije i ispitivanja stabilnosti. Procedura ispitivanja je opisana u trenutno važećoj Ph. Eur. 2.5.12 [28, 71]. |

Tabela 4.4. Obrazloženje specifikacije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju (nastavak)

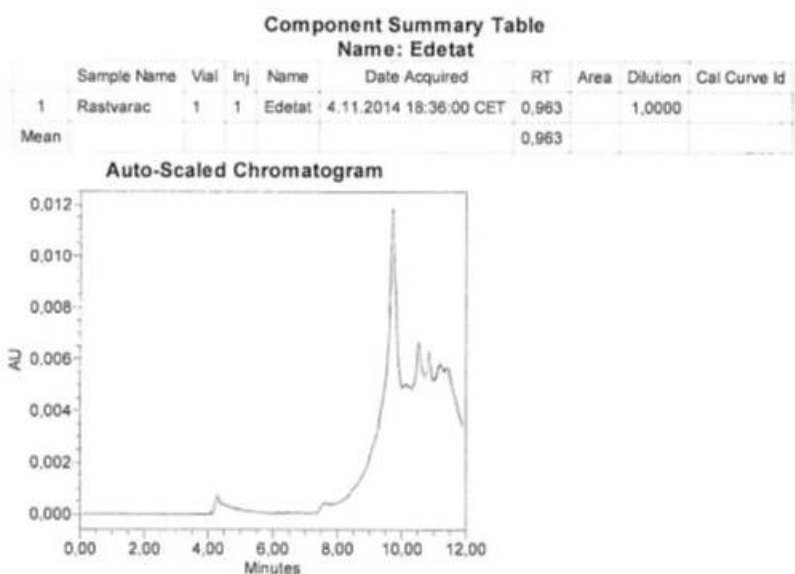
| Test | Obrazloženje kriterijuma prihvatljivosti |
|---|--|
| Rekonstituisani proizvod | |
| Vreme rekonstitucije | Ispitivanje se zahteva u skladu sa ICH vodičem za specifikaciju za rekonstituciju farmaceutskih oblika za parenteralnu primenu. Granične vrednosti specifikacije su definisane na osnovu podataka sakupljenih u toku razvoja formulacije i ispitivanja stabilnosti [71]. |
| Izgled Bistrina rastvora Boja rastvora | Test Izgled se zahteva u skladu sa ICH vodičem za specifikacije [71]. Specifikacija potvrđuje izgled rekonstituisanog proizvoda i odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.2.1 za parenteralne preparate, injekcije ili infuzije [28]. Granične vrednosti specifikacije za boju su definisane na osnovu komparativnog testiranja serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju koja je bila predmet ove doktorske disertacije i jedne proizvodne serije originatorskog leka. Procedure ispitivanja su definisane u Ph. Eur 2.2.2 [28]. |
| Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti - Čestice $\geq 10 \mu\text{m}$ - Čestice $\geq 25 \mu\text{m}$ | Odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.9.19, Metoda I za parenteralne proizvode [28]. |
| pH | Ispitivanje koje se zahteva u skladu sa važećim ICH vodičem za specifikacije parenteralnih lekova [71]. Granične vrednosti su definisane na osnovu literaturnih podataka za originatorski lek, kao i na osnovu podataka dobijenih u toku razvoja formulacije i ispitivanja stabilnosti. |
| Ispitivanje ispravnosti punjenja | Odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.9.17 za parenteralne proizvode [28]. |
| Sadržaj esomeprazola | Ispitivanje koje se zahteva u skladu sa važećim ICH vodičem za specifikacije [71]. |
| Srodne supstance: -Sulfonska nečistoća -4-Hidroksi sulfonska nečistoća -4-Hidroksi nečistoća -4-Hidroksi sulfidna nečistoća -N-Metil izomeri -Nespecificirane, pojedinačno -Ukupne | Specifikacija je u skladu sa ICH vodičem za specifikacije [71]. Granične vrednosti specifikacije za specificirane nečistoće su postavljene na prag kvantifikacije za sulfonske nečistoće i na pragu identifikacije za ostale nečistoće. Granične vrednosti specifikacije za nespecificirane nečistoće su podešene na prag identifikacije. Limiti za nečistoće u <i>release</i> i <i>shelf life</i> specifikaciji su definisani na osnovu podataka sakupljenih u toku razvoja formulacije i ispitivanja stabilnosti i poređenjem sa specifikacijom originatorskog leka, imajući u vidu da je dokazano da su količine degradacionih proizvoda slične onima u odobrenom originatorskom leku za humanu upotrebu (detaljnije objašnjeno u poglavlju 4.1.2). |
| Sterilnost | Odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.6.1 za sterilne proizvode [28]. |
| Bakterijski endotoksini | Odgovara zahtevima važeće Ph. Eur. 2.6.14, Metod C za parenteralne proizvode, prašak za injekciju/infuziju [28]. Limit za test bakterijski endotoksini definisan na osnovu podataka sakupljenih u toku razvoja formulacije i ispitivanja stabilnosti, a vodeći se smernicama definisanim u Ph. Eur. 2.6.14. |



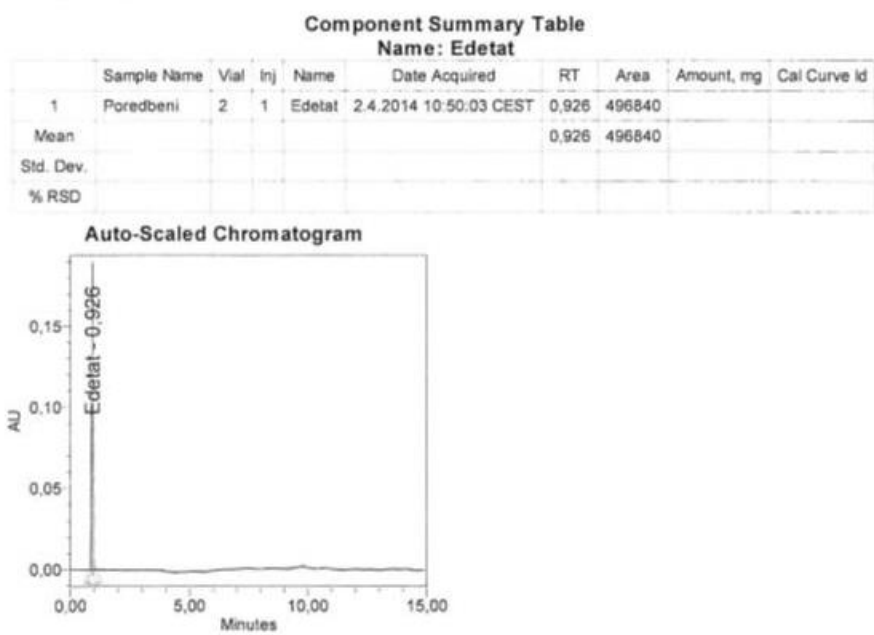
Slika 21. Hromatogram poredbenog rastvora dobijen za testove identifikacija esomeprazola i sadržaj esomeprazola



Slika 22. Hromatogram ispitivanog rastvora dobijen za testove identifikacija esomeprazola i sadržaj esomeprazola



Slika 23. Hromatogram rastvarača dobijen za test identifikacija edetata



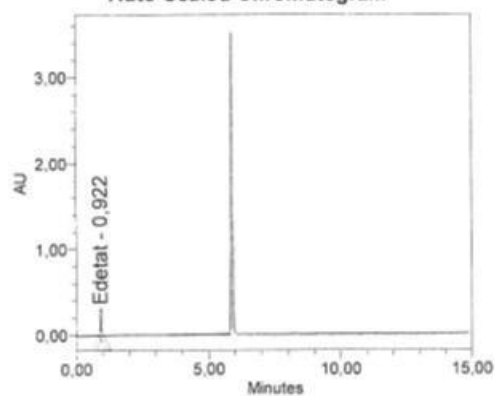
Slika 24. Hromatogram poredbenog rastvora dobijen za test identifikacija edetata

Component Summary Table

Name: Edetat

| | Sample Name | Vial | Inj | Name | Date Acquired | RT | Area | Dilution | Cal Curve Id |
|------|-------------------|------|-----|--------|------------------------|-------|------------|----------|--------------|
| 1 | Ispitivani 41301V | 3 | 1 | Edetat | 2.4.2014 11:18:05 CEST | 0,922 | 499556 | 1,0000 | 1311 |
| Mean | | | | | | 0,922 | 499556,379 | | |

Auto-Scaled Chromatogram



Slika 25. Hromatogram ispitanog rastvora dobijen za test identifikacija edetata

4.1.2 Karakterizacija nečistoća u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju

Osnovni zadatak ispitivanja stabilnosti je da se detektuju potencijalne promene koje se mogu desiti tokom roka upotrebe proizvoda, kao i uslovi koji do njih dovode. Sa aspekta tri osnovna zahteva za proizvod (bezbednost, efikasnost i kvalitet), neophodno je bilo odrediti kritične parametre koji će se ispitivati tokom studije stabilnosti. U prvom redu to se odnosilo na definisanje stabilnosti ispitivane aktivne supstance esomeprazol-natrijum.

U Tabeli 4.5, sumirani su opšti podaci o serijama esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju koje su korišćene u ispitivanjima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije. Studijom stabilnosti obuhvaćene su serije proizvedene sa API od dva proizvođača (proizvođača *Jubilant Life Sciences*, Indija i proizvođača *Uquifa*, Španija). Serije za stabilnost zadovoljavaju sve kriterijume kvaliteta propisane specifikacijom (Tabela 4.3).

Tabela 4.5. Prikaz serija gotovog proizvoda esomeprazol praška za injekciju/infuziju koje su korišćene u studiji stabilnosti

| | | |
|--|---|--|
| Naziv proizvoda (INN/doza/farmaceutska forma) | Esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju | |
| Broj serije | P-1 P-2 P-3 | P-4 P-5 P-6 |
| Veličina serije | proizvodna (35,020 l, 17.000 bočica) | proizvodna (35,020 l, 17.000 bočica) |
| Primarno pakovanje | Bezbojno staklo, tip I Bromobutil elastomerni zatvarač Alukapica flip | |
| API (INN) | Esomeprazol | |
| API proizvođač | <i>Uquifa</i> , Španija | <i>Jubilant Life Sciences</i> , Indija |
| broj serije API | 10181029003 (P-1, P-2, P-3) | 1111006 (P-4) 1111006 (P-5) 1202001 (P-6) |
| Rastvor korišćen za rekonstituciju | natrijum-hlorid, rastvor za infuziju 0,9% | natrijum-hlorid, rastvor za infuziju 0,9% |

Nečistoće koje se mogu naći u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju mogu se klasifikovati kao nečistoće koje potiču od puta sinteze API i one koje se svrstavaju u proizvode degradacije.

API esomeprazol-natrijum je S-enantiomer omeprazola, koji je mešavina S- i R- enantiomera. Proizvođači lekovite supstance, *Uquifa* i *Jubilant Life Sciences*, su identifikovali i specificirali nečistoće koje su u skladu sa monografijom u trenutno važećoj Ph. Eur. za omeprazol (*Uquifa*) i esomeprazol magnezijum trihidrat (*Jubilant*) [28]. Pregled potencijalnih nečistoća u API, kao i u gotovom proizvodu i njihova karakterizacija prikazani su u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Nečistoće u APIesomeprazol-natrijum iesomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju

| Naziv nečistoće korišćen u radu | Hemijsko ime | Naziv nečistoće (UQUIFA DMF ¹) | Naziv nečistoće (Jubilant DMF ²) | Degradacioni proizvod |
|---|---|--|--|-----------------------|
| Tiol nečistoća | 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-tiol | Omeprazol Nečistoća A (Metmerkazol) | Omeprazol Nečistoća A (MBT) | Ne |
| Desmetoksi piridin nečistoća | 2-[(RS)-[(3,5-dimetilpiridin-2-il)methyl]sulfinil]-5-metoksi-1H-benzimidazol | Omeprazol Nečistoća B (Desmetoksi) | Omeprazol Nečistoća B (Desmetoksi) | Ne |
| Sulfidna nečistoća | 5-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)-metil]sulfinil]-1H-benzimidazol (ufiprazol) | Omeprazol Nečistoća C (Tioetar) | Omeprazol Nečistoća C (Sulfid) | Ne |
| Sulfonska nečistoća | 5-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfonyl]-1H-benzimidazol (omeprazol sulfon) | Omeprazol Nečistoća D (Sulfon) | Omeprazol Nečistoća D (Sulfon) | Da |
| N-oksid nečistoća | 4-metoksi-2-[(RS)-(5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfinil]metil]-3,5-dimetilpiridin 1-oksid | Omeprazol Nečistoća E (N-oksid) | Omeprazol Nečistoća E (N-oksid) | Ne |
| 8-Metoksi-tiokso nečistoća | 8-metoksi-1,3-dimetil-12-tioksopirido [1',2':3,4]imidazo[1,2-a] benzimidazol-2(12H)-on | Omeprazol Nečistoća F | - | Ne |
| 9-Metoksi-tiokso nečistoća | 9-metoksi-1,3-dimetil-12-tioksopirido [1',2':3,4]imidazo[1,2-a]-benzimidazol-2(12H)-on | Omeprazol Nečistoća G | - | Ne |
| Hloro nečistoća | 2-[(RS)-[(4-hloro-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-5-metoksi-1H-benzimidazol | Omeprazol Nečistoća H (Hloro derivat) | - | Ne |
| Sulfon N-Oksid nečistoća | 4-metoksi-2-[[5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il)sulfonyl]metil]-3,5-dimetilpiridin 1-oksid | Omeprazol Nečistoća I (Sulfon N-oksid) | (Sulfon N-oksid) | Ne |
| 4-Hidroksi sulfonska nečistoća | 2-[[5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il) sulfonyl]metil]-3,5-dimetil-4-piridinol | - | - | Da |
| 4-Hidroksi nečistoća | 2-[[5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il) sulfinil]metil]-3,5-dimetil-4-piridinol | - | - | Da |
| 4-Hidroksi sulfidna nečistoća | 2-[[5-metoksi-1H-benzimidazol-2-il)tio]methyl]-3,5-dimetil-4-piridinol | - | - | Da |
| N-Metil izomeri (Mešavina izomera sa metiliranim azotom imidazola) | 5-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]sulfinil]-1-metil-1H-benzimidazol i 5-metoksi-2-[[4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil]metil]sulfinil]-1-metil-1H-benzimidazol | - | - | Da |
| R-enantiomer | 5-metoksi-2-[(R)- [4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol ((R)-omeprazol) | (R)-Omeprazol natrijum) | Nečistoća F (R-izomer) | Ne |

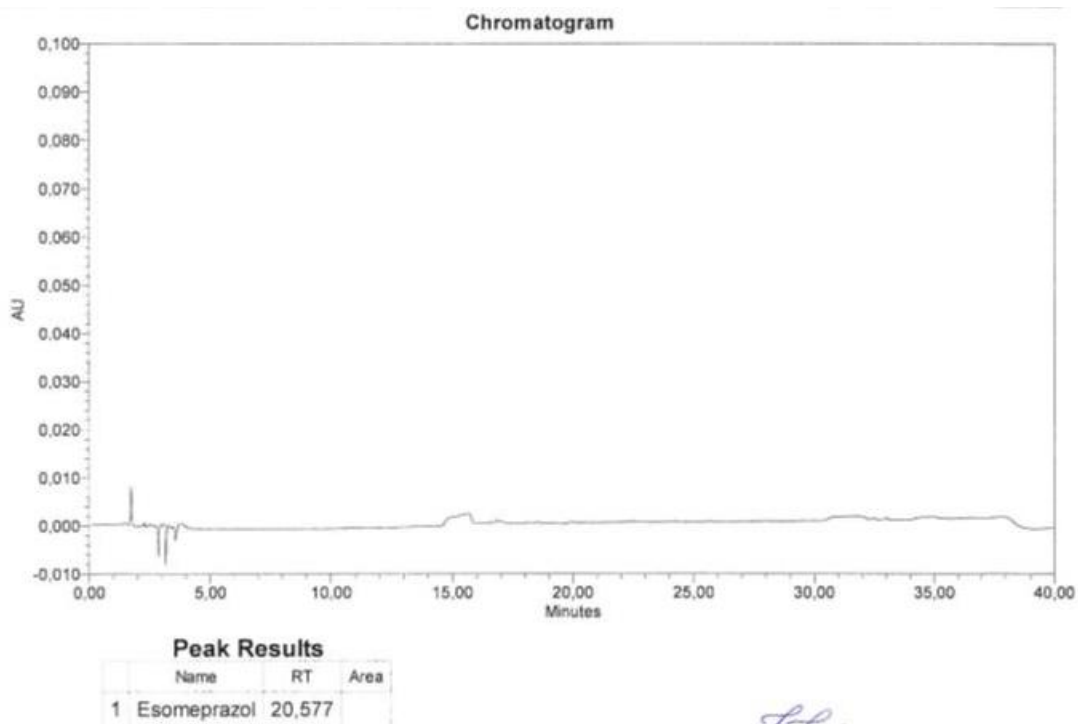
Napomena: ¹Prema Ph. Eur. Monografijom Omeprazol (07/2010:9420) izuzev za R-Omeprazol natrijum; ² prema Ph. Eur. Monografijom Eesomeprazol magnezijum trihidrat (01/2009:2372) izuzev za Sulfon N-oksid

Da bi se definisao put razgradnje leka, uzorci esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju su bili podvrgnuti stres studiji, kao i testiranju u ICH studiji stabilnosti.

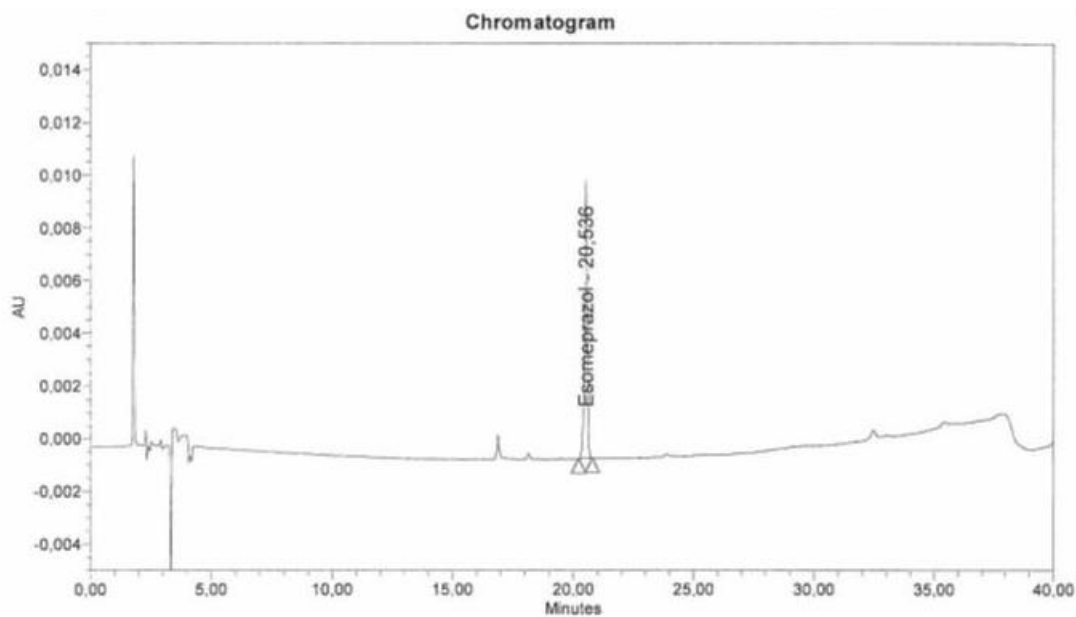
Tokom studije stabilnosti, definisano je pet potencijalnih degradacionih proizvoda čiji sadržaji su prelazili granice definisane u ICH smernicama. Detektovani degradacioni proizvodi su:

- Sulfonska nečistoća;
- 4-Hidroksi sulfonska nečistoća;
- 4-Hidroksi nečistoća;
- 4-Hidroksi sulfidna nečistoća;
- N-Metil izomeri.

Hromatogrami rastvarača, poredbenog rastvora i ispitivanog rastvora esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju dobijeni tokom ispitivanja srodnih supstanci su dati na Slikama 26-28.



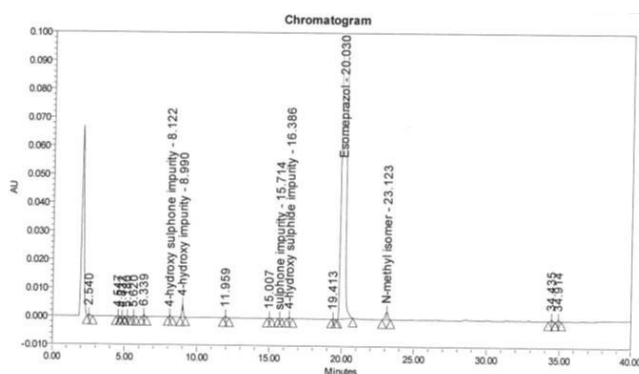
Slika 26. Hromatogram rastvarača dobijen za test srodne supstance



Peak Results

| Name | RT | Area | Symmetry Factor |
|---------------|--------|-------|-----------------|
| 1 Esomeprazol | 20,536 | 83900 | 0,9 |

Slika 27. Hromatogram poredbenog rastvora dobijen za test srodne supstance



Peak Results

| Name | RT | Area | |
|------|-----------------------------|-------|-------|
| 1 | 2.540 | 4279 | |
| 2 | 4.547 | 1606 | |
| 3 | 4.832 | 490 | |
| 4 | 5.180 | 1063 | |
| 5 | 5.620 | 1868 | |
| 6 | 6.339 | 4797 | |
| 7 | 4-hydroxy sulphone impurity | 8.122 | 4361 |
| 8 | 4-hydroxy impurity | 8.990 | 32956 |
| 9 | 11.959 | 5484 | |

Peak Results

| Name | RT | Area | |
|------|-----------------------------|--------|----------|
| 10 | 15.007 | 2033 | |
| 11 | sulphone impurity | 15.714 | 626 |
| 12 | 4-hydroxy sulphide impurity | 16.386 | 3927 |
| 13 | 19.413 | 1625 | |
| 14 | Esomeprazol | 20.030 | 35305240 |
| 15 | N-methyl isomer | 23.123 | 40573 |
| 16 | 34.435 | 7281 | |
| 17 | 34.914 | 6422 | |

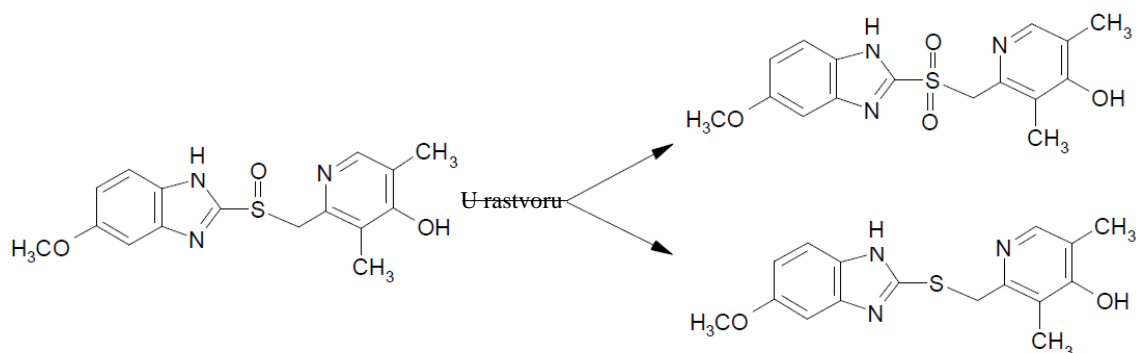
Wardlaw
08.02.2016

Wardlaw
08.02.2016

Slika 28. Hromatogram ispitivanog rastvora dobijen za test srodne supstance

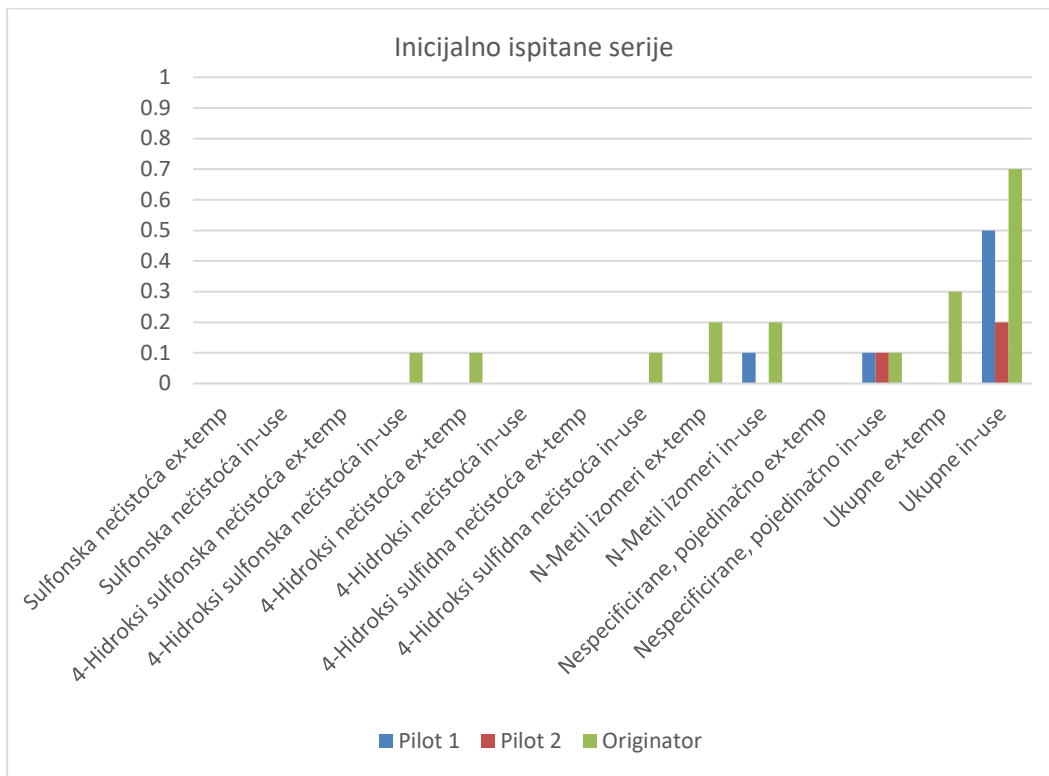
Esomeprazol-natrijum je veoma osetljiv na uticaj temperature, vlage, svetlosti i oksidacije. Dodatno, njegova stabilnost u vodenom rastvoru je pH zavisna. Brzina njegove degradacije raste kako se snižava pH vrednost rastvora. Zbog toga, pH rekonstituisanog rastvora je u opsegu pH 9-11 [24-27].

Esomeprazol u prašku za rastvor za injekciju/infuziju se prevodi u sulfonsku nečistoću kada dođe do S-oksidacije, a reakcijom oksidativnog O-dealkilovanja prelazi u 4-hidroksi nečistoću. Eksperimentalni podaci su pokazali da sulfonska nečistoća i 4-hidroksi nečistoća nastaju pod uticajem temperature. Porast nivoa sulfonske nečistoće je zabeležen tokom stres studije stabilnosti, dok pri uslovima kondicioniranja primenjenim tokom ICH studije stabilnosti, njen porast nije detektovan. Sa druge strane, 4-hidroksi nečistoća nastaje pri uslovima kondicioniranja kako tokom stres studije stabilnosti, tako i tokom ICH studije, ali pošto su ove reakcije temperaturno zavisne, one se odvijaju značajno sporije kada se uzorci čuvaju na nižim temperaturama. 4-hidroksi nečistoća je izuzetno nestabilna u vodenom rastvoru i dalje se razgrađuje na 4-hidroksi sulfonsku nečistoću i 4-hidroksi sulfidnu nečistoću (Slika 29). Količina ove dve nečistoće se povećava u rekonstituisanom rastvoru tokom perioda upotrebe (*in-use*).

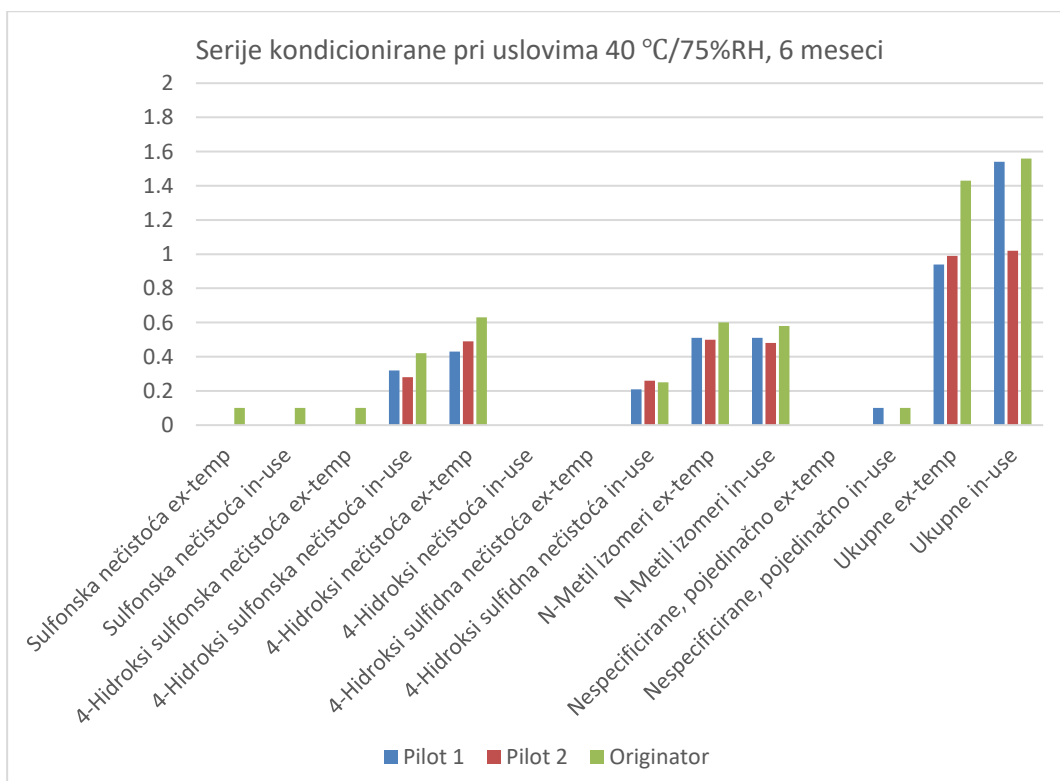


Slika 29. Degradacija 4-Hidroksi nečistoće u vodenom rastvoru esomeprazola

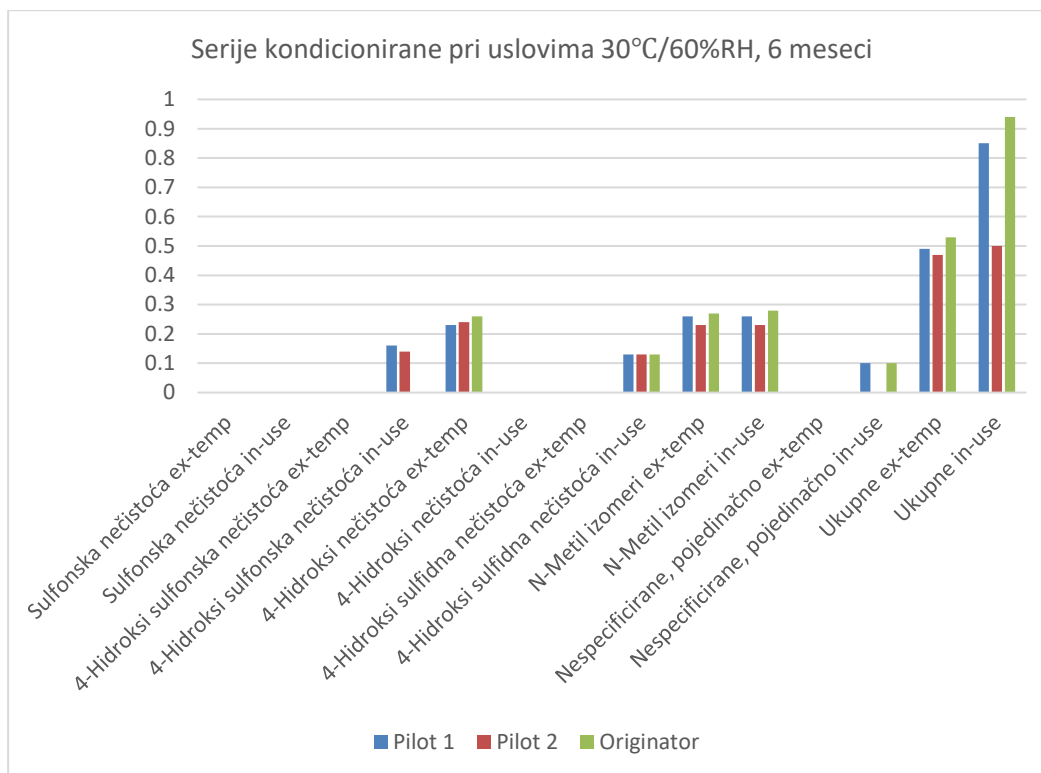
Prema relevantnim smernicama, predloženi kriterijumi prihvatljivosti za proizvode degradacije u ispitivanom farmaceutskom proizvodu mogu biti opravdani ako je količina produkta degradacije slična nivou koji je pokazan u odobrenom originatorskom leku za humanu upotrebu. Degradacioni proizvodi u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju definisani su upoređivanjem kvalitativnog i kvantitativnog profila nečistoća dve pilot serije ispitivanog leka sa jednom proizvodnom serijom originatorskog proizvoda. Primenjena je ista analitička procedura za ispitivanje stabilnosti. Rezultati su pokazali da su profili nečistoća dva testirana proizvoda slični (Slika 30-33).



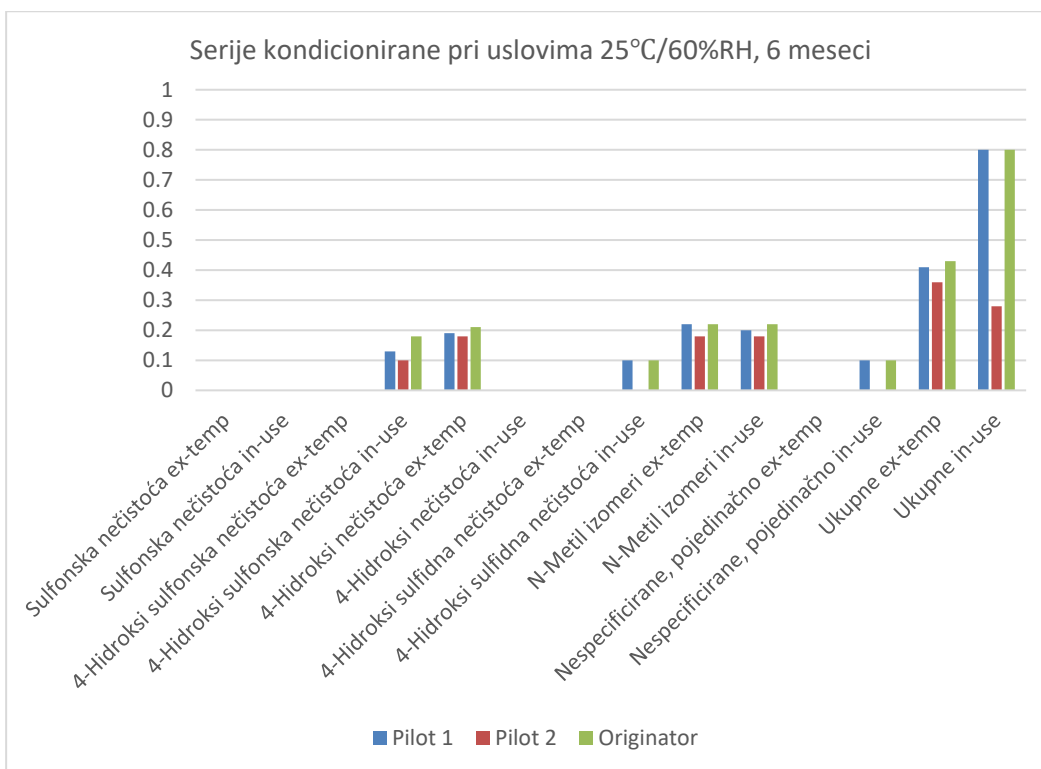
Slika 30. Poređenje profila nečistoća ispitivanog proizvoda i proizvoda originatora (inicijalno ispitane)



Slika 31. Poređenje profila nečistoća ispitivanog proizvoda i proizvoda originatora (40°C/75% RH, 6 meseci)



Slika 32. Poređenje profila nečistoća ispitivanog proizvoda i proizvoda originatora (30°C/65% RH, 6 meseci)



Slika 33. Poređenje profila nečistoća ispitivanog proizvoda i proizvoda originatora (25°C/60% RH, 6 meseci)

U skladu sa relevantnom naučnom literaturom [71], predloženi kriterijumi prihvatljivosti se mogu smatrati pouzdanim, jer hemijska struktura detektovanih nečistoća ne ukazuje na njihovu potencijalnu genotoksičnost.

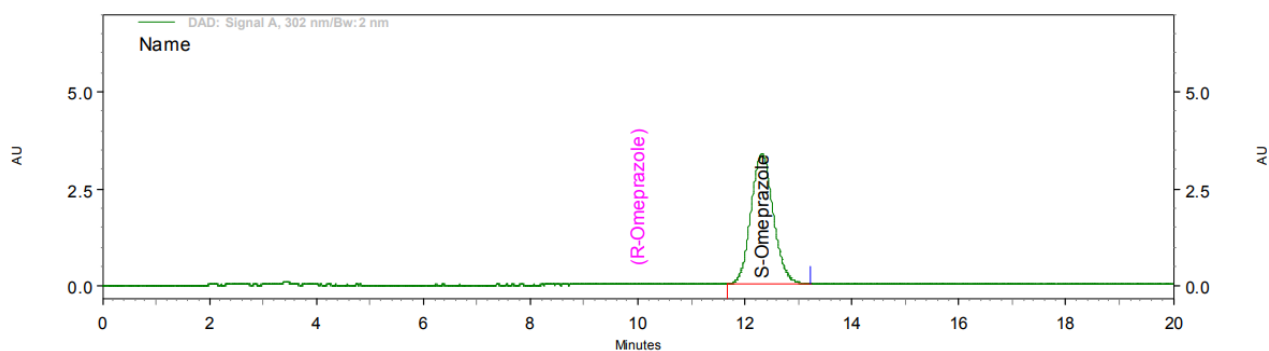
Kao što je već pomenuto, API esomeprazol-natrijum je prisutna u predloženoj formulaciji kao S-enantiomer omeprazola. Upravo iz tog razloga sprovedeno je ispitivanje prisustva R-enantiomer. Ispitivanje je izvedeno na serijama navedenim u Tabeli 4.5, sa API od dva proizvođača.

Dizajn studije stabilnosti za ispitivanje R-enantiomera je prikazan u Tabeli 4.7. Uslovi kondicioniranja i trajanje studije su odabrani tako da budu dovoljni da pokažu da li može doći do izomerizacije S-enantiomera u R-enantiomer u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju.

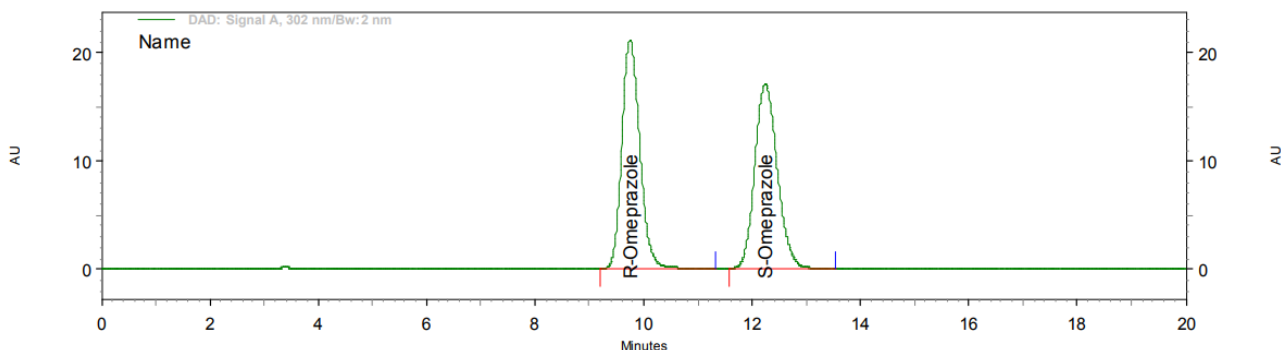
Tabela 4.7. Uslovi kondicioniranja i učestalost testiranja R-enantiomera

| Uslovi skladištenja | | Vremenske tačke za testiranje (meseci) |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| Ubrzana studija stabilnosti | 40 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH | 0, 1, 3 i 6 |
| Intermedijarna studija stabilnosti | 30 °C ± 2 °C/65% ± 5% RH | 0, 6 i 12 |
| Dugotrajna studija stabilnosti | 25 °C ± 2 °C/60% ± 5% RH | 0, 6 i 12 |
| Ispitivanje fotostabilnosti | UV/VIS | U skladu sa ICH Q1B |

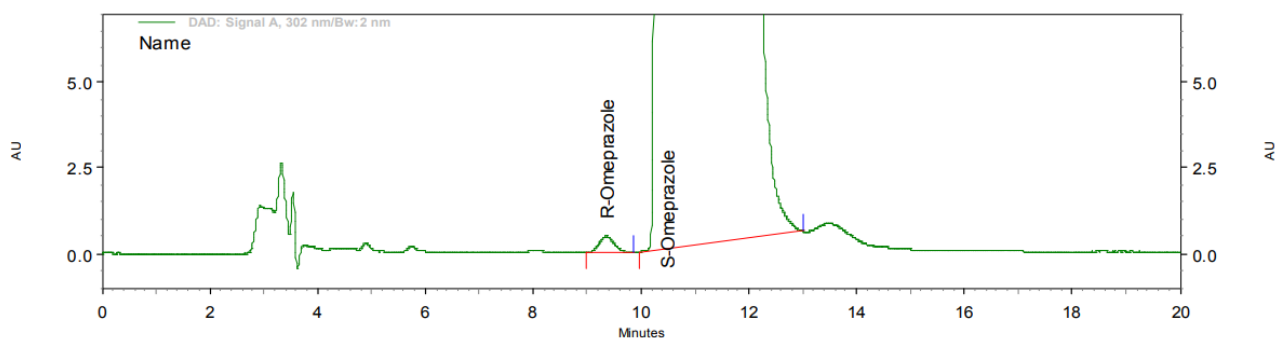
Hromatogrami ispitivanog rastvora A, ispitivanog rastvora B i ispitivanog rastvora esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju za seriju broj L1-3247/1 korišćenju kao primer, su dati na Slikama 34, 35 i 36, redom.



Slika 34: Hromatogram ispitivanog rastvora A



Slika 35: Hromatogram ispitivanog rastvora B



Slika 36: Hromatogram ispitivanog rastvora esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju na primeru serije broj L1-3247/1

Rezultati ispitivanja R-enantiomera u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju su dati u Tabeli 4.8, a rezultati fotostabilnosti R-enantiomera u Tabeli 4.9.

Tabela 4.8. Rezultati ispitivanja R-enantiomera u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju

| | | Vremenske tačke ispitivanja | | | | | | |
|-------------|------------|-----------------------------|----------|----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
| | | 40 °C/75% RH | | | 30 °C/65% RH | | 25 °C/60% RH | |
| Broj serije | Inicijalno | 1 mesec | 3 meseca | 6 meseci | 6 meseci | 12 meseci | 6 meseci | 12 meseci |
| P-1 | 0,20% | 0,19% | 0,20% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% |
| P-2 | 0,20% | 0,19% | 0,20% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% |
| P-3 | 0,20% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% | 0,19% |
| P-4 | <0,10% | n.d. | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% |
| P-5 | <0,10% | n.d. | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | n.d. |
| P-6 | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | <0,10% | 0,11% | <0,10% | 0,10% |

Napomena: n.d. – nije detektovano

Tabela 4.9. Rezultati ispitivanja fotostabilnosti R-enantiomera u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju

| | | Tip pakovanja | |
|-------------|------------|--------------------------|----------------------|
| Broj serije | Inicijalno | Direktno izložene bočice | U spoljašnjoj kutiji |
| P-1 | 0.20% | 0,61% | 0,19% |
| P-5 | <0.10% | 0,51% | <0,10% |

Rezultati su pokazali da pod uticajem temperature ne dolazi do izomerizacije i nastanka R-enantiomera. Ipak, rezultati ispitivanja fotostabilnosti su ukazali na to da svetlost katalizuje izomerizaciju i da se R-enantiomer formira u uzorcima koji su bili direktno izloženi svetlosti. U uzorcima koji su bili zaštićeni od svetlosti nije uočen porast sadržaja R-enantiomer. Na osnovu dobijenih rezultata i preporučenih uslova čuvanja, opravdano je da ispitivanje optičke čistoće ne bude deo specifikacije ispitivanja gotovog proizvoda.

Kriterijumi prihvatljivosti za proizvode degradacije u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju utvrđeni su uzimajući u obzir kriterijume prihvatljivosti nečistoća u polaznoj API, njihovo povećanje tokom studija stabilnosti leka u razvojnoj fazi i originatorskom proizvodu, kao i predloženi rok upotrebe i preporučene uslove skladištenja za ispitivani proizvod.

4.1.3 Formalna studija stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

Dizajn formalne ICH studije stabilnosti uključuje uslove skladištenja i učestalost testiranja datu u Tabeli 4.10. Uslovi skladištenja i trajanje studije su odabrani tako da budu dovoljni da obuhvate uslove čuvanja i kasnije upotrebe esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju. Studija stabilnosti je sprovedena za šest proizvedenih serija (Tabela 4.5).

Tabela 4.10. Uslovi čuvanja i učestalost testiranja u toku formalne studije stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

| Uslovi skladištenja | | Vremenske tačke za testiranje (meseći) |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| Ubrzana studija stabilnosti | 40 °C ± 2 °C/75% ± 5% RH | 0*, 3 i 6* |
| Intermedijarna studija stabilnosti | 30 °C ± 2 °C/65% ± 5% RH | 0*, 3, 6, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60* |
| Dugotrajna studija stabilnosti | 25 °C ± 2 °C/60% ± 5% RH | 0*, 3, 6, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60* |
| Drugo** | 30 °C/75% RH | 0*, 3, 6*, 9, 12*, 18, 24*, 36*, 48 i 60 |

Napomene:

* Vremenske tačke testiranja za evaluaciju *in-use* stabilnosti (stabilnosti u toku upotrebe)

** Samo za serije broj P-4, P-5 i P-6

In-use studija stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju je izvedena u skladu sa smernicama ‘*Note for Guidance on In-use Stability Testing of Human Medicinal Products and Note for Guidance on Maximum Shelf-life for Sterile Products for Human Use after First Opening or Following Reconstitution*’ [78, 79]. Studija je sprovedena kako bi se obezbedile informacije vezane za označavanje adekvatnog roka upotrebe na etiketama proizvoda, definisanje uslova skladištenja i *in-use* perioda za rekonstituisani proizvod. Rekonstitucija esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju je izvedena sa natrijum-hlorid, rastvorom za infuziju 0,9%.

In-use studija je izvedena na dve proizvedene serije, po jednoj od svakog proizvođača API, inicijalno i na po jednoj seriji API od oba proizvođača u definisanim intervalima ispitivanja, prikazanim u Tabeli 4.5. Kritični parametri kvaliteta ispitivanog farmaceutskog proizvoda, podložni promenama, su evaluirani na kraju predloženog *in-use* roka upotrebe (12 sati nakon rekonstitucije, kada se rastvor čuva na 30°C). Sa ciljem da se proceni kompatibilnost u upotrebi, bočice sa rekonstituisanim rastvorom su čuvane u horizontalnom položaju.

Ispitivanje fotostabilnosti je izvedeno na dve proizvedene serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, po jednoj od svakog proizvođača API. Uslovi ispitivanja fotostabilnosti su u skladu sa ICH Q1B, a izvor svetlosti odgovara Opciji 2. Uzorci su bili izloženi svetlosti koja je omogućila ukupno osvetljenje, ne manje od 1,2 miliona luks sati i integrisanu ultraljubičastu energiju od oko 200W po kvadratnom metru [75].

Specifikacija ispitivanja proizvoda tokom studije stabilnosti uključuje one atribute farmaceutskog proizvoda koji su ocenjeni kao podložni promenama tokom kondicioniranja i čija promena može uticati na kvalitet, bezbednost i/ili efikasnost leka. Sva ispitivanja i kriterijumi prihvatljivosti za gotov proizvod su dati u Tabeli 4.3. Raspored ispitivanja je predstavljen u Tabeli 4.11. Procedura sprovođenja analitičkih metoda za svaki od testova je ista kao i za ispitivanje gotovog proizvoda za puštanje leka u promet. Sve metode su validirane i dokazane, a opisane su u delu materijali i metode (3.2.2).

Tabela 4.11. Raspored ispitivanja

| Test | Učestalost ispitivanja |
|---|--|
| Liofilizirani proizvod | |
| Izgled | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Voda | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Vreme rekonstitucije | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Rekonstituisani proizvod | |
| Izgled -Bistrina rastvora -Boja rastvora | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti -Čestice $\geq 10 \mu\text{m}$ -Čestice $\geq 25 \mu\text{m}$ | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| pH | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Sadržaj: -Esomeprazol | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Srodne supstance: -Sulfonska nečistoća -4-Hidroksi sulfonska nečistoća -4-Hidroksi nečistoća -4-Hidroksi sulfidna nečistoća -N-Metil izomeri -Nespecificirane, pojedinačno -Ukupne | u svakoj definisanoj vremenskoj tački |
| Sterilnost | na kraju ubrzanih uslova kondicioniranja, godišnje na intermedijarnim i dugotrajnim uslovima kondicioniranja |
| Bakterijski endotoksini | na kraju ubrzanih uslova kondicioniranja, godišnje na intermedijarnim i dugotrajnim uslovima kondicioniranja |

4.1.3.1 Procena stabilnosti

Rezultati dobijeni za ispitivanje stabilnosti na ubrzanim, intermedijarnim i dugotrajnim uslovima ispitivanja stabilnosti pokazuju sledeće:

- Za svih šest ispitivanih serija rezultati u tačkama ispitivanja – inicijalno, nakon 3 i nakon 6 meseci su u okviru specifikacijskih granica pri uslovima 40 °C/75% RH;
- Za svih šest serija rezultati u tačkama ispitivanja – inicijalno, nakon 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 i 60 meseci su u okviru specifikacijskih granica pri uslovima 25 °C/60% RH.

4.1.3.1.1 Rezultati dobijeni za uslove čuvanja 30°C/65% RH:

Rezultati zabeleženi tokom ispitivanja sprovedenih na liofiliziranom proizvodu u toku studije stabilnosti pri uslovima 30 °C/65%RH su sledeći:

- Izgled: tokom 36 i 48 meseci nije došlo do promene izgleda liofiliziranog leka u poređenju sa početnim uzorkom. U svim pregledanim uzorcima liofilizirani kolač je bio bele boje. Nakon 60 meseci promene su uočene, liofilizirani kolač je žutosmeđe boje, što je bio rezultat van specifikacije prema definisanim kriterijumima prihvatanja (specificirano: Beo do skoro beo porozni liofilizirani kolač ili prašak).

- Sadržaj vode: došlo je do povećanja vrednosti ovog parametra tokom ispitivanja stabilnosti. Rezultati su bili u rasponu od 1,7 – 5,8%. Svi dobijeni rezultati, osim rezultata nakon 60 meseci za jednu seriju (seriju broj P-5, sa rezultatom od 5,8%), bili su u skladu sa specifikacijskim granicama, najviše 5,0%.
- Vreme rekonstitucije: tokom 60 meseci nije bilo promena. Svi su rezultati bili u rasponu od 22 s do 35 s. Svi dobijeni rezultati su u skladu sa specifikacijskom granicom - najviše 60 s.

Rezultati zabeleženi tokom ispitivanja sprovedenih na rekonstituisanom proizvodu u toku studije stabilnosti pri uslovima 30 °C/65%RH su sledeći:

- Izgled: nije bilo promena u izgledu, bistrini i boji kondicioniranih rastvora u poređenju sa početnim uzorkom. Svi rastvori su bili bistri i boja rastvora bila je unutar kriterijuma prihvatljivosti (najviše Y5 ili GY5). Takođe, svi ispitivani rastvori su bili praktično bez vidljivih čestica.
- Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti: u ovoj studiji stabilnosti izvedena su ispitivanja za vidljive i čestice ispod granice vidljivosti. U svim ispitivanim uzorcima rezultati za vidljive i čestice ispod granice vidljivosti su bili u specifikacijskim granicama.
- pH: nije bilo promena pH vrednosti rastvora tokom ispitivanja stabilnosti. Svi su rezultati bili u rasponu pH 10,1-10,8. Svi dobijeni rezultati bili su u skladu sa specifikacijskim granicama (pH 9,0-11,0).

- Sadržaj: tokom studije stabilnosti došlo je do blagog pada sadržaja API. Dobijeni rezultati bili su unutar specifikacijskih granica ($\pm 5\%$ od deklarisanе vrednosti), osim za jednu seriju (broj P-6) nakon 60 meseci (37,6 mg/5 ml – 94%). Rezultati za sve ispitivane serije su se kretali u opsegu 38,1 – 40,9 mg/5 ml (95,3 – 102,3%).

- Srodne supstance: praćeno je pet specifikiranih identifikovanih nećistoća, nespecificirane i ukupne nećistoće. Sve specifikirane identifikovane nećistoće bile su u specifikacijskim granicama tokom ispitivanja stabilnosti u trajanju od 60 meseci.

Sulfonska nećistoća: neznatno povećanje sulfonske nećistoće zabeleženo je za seriju broj P-4, vrednost inicijalno $<0,10\%$, do maksimum 0,21% (vremenska tačka 60 meseci) i seriju broj P-6, vrednost inicijalno $<0,10\%$, do maksimum 0,18% (vremenske tačke 12, 36 i 60 meseci), dok su za sve ostale serije zabeleženi rezultati u opsegu $<0,10\%$ - 0,13%.

4-hidroksi sulfonska nećistoća (RRT 0,42), 4-hidroksi nećistoća (RRT 0,46), 4-hidroksi sulfidna nećistoća (RRT 0,81) i N-metil izomeri (RRT 1,16) su proizvodi razgradnje esomeprazola. Specifikacijske granice za ove nećistoće definisane su u skladu sa uporednim rezultatima za ispitivani proizvod i proizvod originatora, dobijenim tokom ispitivanja stabilnosti za 6 meseci (objašnjeno u poglavlju 4.1.2, Karakterizacija nećistoća u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju) i očekivano povećanje specifikiranih nećistoća tokom 60 meseci pri intermedijarnim uslovima skladištenja (30 °C/65%RH). Granice za ove nećistoće proširene su u specifikaciji.

Dokazano je da su 4-hidroksi sulfonska nećistoća i 4-hidroksi sulfidna nećistoća degradacioni proizvodi u rastvorima tokom upotrebe (12 sati nakon rekonstitucije, kada se rastvor čuva na sobnoj temperaturi), dok ove nećistoće nisu uočljive ili su otkrivene s malim vrednostima u sveže pripremljenim uzorcima (*ex-tempore* ispitanim uzorcima). Dobijeni rezultati tokom 60 meseci za sve tri testirane serije bili su: za 4-hidroksi sulfonsku nećistoću u rasponu od n.d. (nije detektovano) do $<0,10\%$ (inicijalno uvek $<0,10\%$), a za 4-hidroksi sulfidnu nećistoću u rasponu od n.d. do $<0,10\%$ (inicijalno nije detektovano).

Primećeno je povećanje 4-hidroksi nećistoće kao proizvoda razgradnje esomeprazol-natrijuma koji nastaje pod uticajem temperature. Dobijeni rezultati za sve serije za nećistoću 4-hidroksi su bili u rasponu 0,22-0,67% (inicijalno n.d. do $<0,10\%$), dok su specifikacijske granice najviše 0,9%.

Nespecificirane nećistoće: Tokom 60 meseci ispitivanja stabilnosti nije primećeno povećanje nespecificiranih nećistoća. Nespecificirane nećistoće nisu detektovane ili su njihove vrednosti

bile do <0,10% (inicijalno uvek <0,10%).

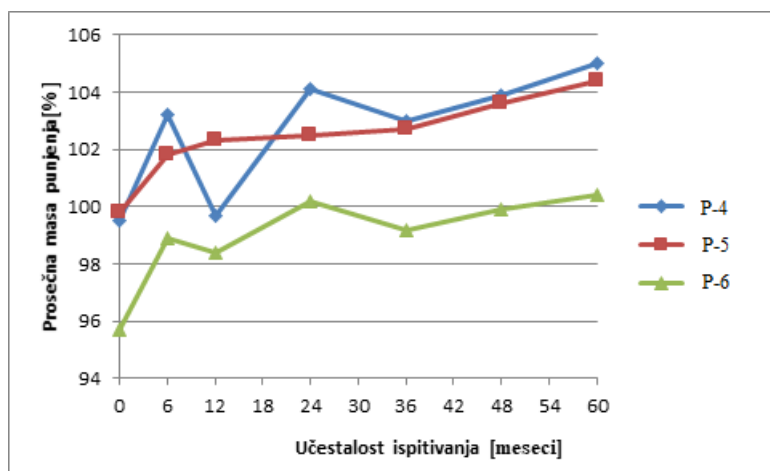
Ukupne nečistoće: povećanje ukupnih nečistoća tokom ispitivanja stabilnosti praćeno je povećanjem nivoa nečistoće 4-hidroksi i N-metil izomera. Rezultati dobijeni za sve serije bili su u rasponu 0,35-1,49% (inicijalno <0,10%-0,20%). Specifikacijske granice su najviše 2,5%.

- Sterilnost: Ovaj je test je izvršen inicijalno i godišnje tokom ispitivanja stabilnosti. Svi analizirani uzorci su sterilni.
- Bakterijski endotoksini: Ovaj je test je ispitivan inicijalno i godišnje tokom ispitivanja stabilnosti. Svi su rezultati bili u okviru specifikacijskih granica.

4.1.3.1.2 Procena stabilnosti za uslove kondicioniranja 30 °C/75%RH

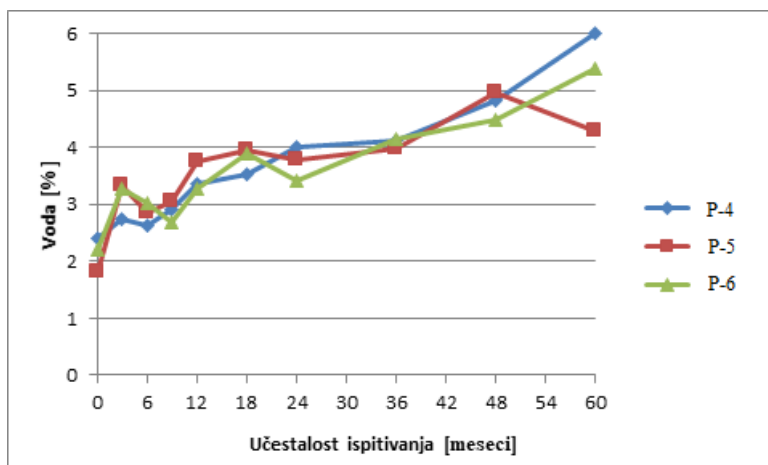
Rezultati zabeleženi tokom ispitivanja sprovedenih na liofiliziranom proizvodu u toku studije stabilnosti pri uslovima 30 °C/75%RH su sledeći:

- Izgled: tokom 36 meseci nije došlo do promene izgleda liofiliziranog leka u poređenju sa početnim uzorkom. U svim ispitivanim uzorcima liofilizirani kolač je bio bele boje. Nakon 48 i 60 meseci uočene su promene, liofilizirani kolač je žutosmeđe boje, što je bio rezultat izvan specifikacijskih granica (specificirano: beo do skoro beo porozni liofilizirani kolač ili prašak).
- Prosečna masa punjenja: tokom ispitivanja stabilnosti došlo je do neznatnog porasta ovog parametra, ali ne u proporcionalnom odnosu sa vremenom. Promena prosečne mase punjenja tokom ispitivanja stabilnosti prikazana je na Slici 37. Rezultati za sve serije, nakon 60 meseci, bili su u rasponu 45,52-47,60 mg (100,4-105,0%). Početna vrednost bila je 45,12 mg (99,5%) za prvu seriju broj P-4, 45,23 mg (99,8%), za drugu seriju broj P-5 i 43,40 mg (95,7%) treću seriju broj P-6. Dobijene vrednosti bile su unutar specifikacijskih granica, $\pm 10\%$ od deklarisanе vrednosti.



Slika 37. Promena prosečne mase punjenja tokom studije stabilnosti (30°C/65% RH)

- Sadržaj vode: došlo je do povećanja ovog parametra tokom ispitivanja stabilnosti. Promena sadržaja vode tokom studije stabilnosti prikazana je na Slici 38. Rezultati su bili u rasponu od 2,75-6,0%. Svi dobijeni rezultati, osim rezultata nakon 60 meseci za prvu seriju broj P-4 (6,0%) i treću seriju broj P-6 (5,4%), bili su u skladu sa specifikacijskim granicama, najviše 5,0%. Rezultat nakon 48 meseci za drugu seriju broj P-5 bio je 4,96%, dok je dobijena vrednost nakon 60 meseci bila 4,3%.



Slika 38. Promena u sadržaju vode tokom ispitivanja stabilnosti (30°C/65% RH)

- Vreme rekonstitucije: Tokom 60 meseci nije bilo promena. Svi su rezultati bili u rasponu od 26 do 33 s. Početna vrednost bila je 30 s za prvu seriju broj P-4 i 50 s za drugu seriju broj P-5 i treću seriju broj P-6. Svi dobijeni rezultati su u skladu sa specifikacijskim granicama - najviše 60 s.

Rezultati zabeleženi tokom ispitivanja sprovedenih na rekonstituisanom proizvodu u toku studije stabilnosti pri uslovima 30 °C/65%RH su sledeći:

- Izgled: nije bilo promena u izgledu, bistrini i boji kondicioniranih rastvora u poređenju sa početnim uzorkom. Svi rastvori su bili bistri i boja rastvora bila je unutar kriterijuma prihvatljivosti (najviše Y5 ili GY5). Takođe, svi ispitivani rastvori su bili praktično bez vidljivih čestica.
- Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti: u ovoj studiji stabilnosti izvedena su ispitivanja za vidljive i čestice ispod granice vidljivosti. U svim ispitivanim uzorcima rezultati za vidljive i čestice ispod granice vidljivosti su bili u specifikacijskim granicama.
- pH: nije bilo promena pH vrednosti rastvora tokom ispitivanja stabilnosti. Svi su rezultati bili u rasponu pH 10,14-10,72. Početna vrednost bila je pH 10,4 za prvu (broj P-4) i treću seriju (broj P-6) i pH 10,5 za drugu seriju (broj P-5). Svi dobijeni rezultati bili su u skladu sa specifikacijskim granicama (pH 9,0-11,0).
- Sadržaj: tokom studije stabilnosti došlo je do blagog pada sadržaja API, ali neznačajnog sa stanovišta stabilnosti. Dobijeni rezultati bili su unutar specifikacijskih granica ($\pm 5\%$ od deklarisanе vrednosti), osim za treću seriju (broj P-6). Rezultati nakon 48 i 60 meseci za treću seriju bili su izvan specifikacijskih granica. Početne vrednosti i vrednosti dobijene nakon 48. i 60. meseca izražene su u procentima od deklarisanе količine i prikazane u Tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Inicijalni i vrednosti sadržaja API dobijeni nakon 48 i 60 meseci

| Broj serije | Inicijalna vrednost | Vrednost dobijena nakon 48 meseci | Vrednost dobijena nakon 60 meseci |
|---|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| P-4 | 99,5% | 95,5% | 96,7% |
| P-5 | 99,3% | 96,3% | 96,1% |
| P-6 | 98,8% | 92,0%/94,2% * | 92,5% |
| Napomena: * ispitivanje/ponovno ispitivanje | | | |

- Srodne supstance: pet specificiranih identifikovanih nečistoća, nespecificirane i ukupne nečistoće su praćeni. Prijavljene su sve nečistoće čiji je sadržaj bio veći od 0,01%. Specificirane identifikovane nečistoće: sve navedene identifikovane nečistoće bile su u definisanim granicama tokom ispitivanja stabilnosti u trajanju od 60 meseci.

Sulfonske nečistoće: blago povećanje sulfonske nečistoće zabeleženo je za prvu seriju (broj P-4), dok je za drugu (broj P-5) i treću seriju (P-6) porast ove nečistoće bio zanemarljiv. Dobijene vrednosti bile su u rasponu 0,05-0,21% (u početku od 0,04% do 0,10%). Specifikacijska granica za ovu nečistoću bila je najviše 0,25%. Ta nečistoća označena je kao produkt razgradnje i neaktivni metabolit esomeprazola, tako da su limiti za tu nečistoću u specifikaciji prošireni na najviše 0,4%.

Nije bilo povećanja zbiru nečistoća 8-metoksi-tiokso i 9-metoksi-tiokso. Svi rezultati bili su u rasponu od n.d.-0,04% (početna vrednost je bila 0,01%). Stoga se smatra da ova nečistoća nije produkt razgradnje API. 4-hidroksi sulfonska nečistoća (RRT 0,42), 4-hidroksi nečistoća (RRT 0,46), 4-hidroksi sulfidna nečistoća (RRT 0,81) i N-metil izomeri (RRT 1,16) su proizvodi razgradnje esomeprazola, a specifikacijske granice za ove nečistoće definisane su u skladu sa uporednim rezultatima za ispitivani proizvod i proizvod originatora, dobijenim tokom ispitivanja stabilnosti za 6 meseci (objašnjeno u delu 4.1.2, Karakterizacija nečistoća u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju) i očekivano povećanje specifikiranih nečistoća tokom 60 meseci pri intermedijarnim uslovima skladištenja (30 °C/65%RH). Granice za ove nečistoće proširene su u specifikaciji.

4-hidroksi sulfonska nečistoća i 4-hidroksi sulfidna nečistoća su proizvodi razgradnje u rastvorima tokom upotrebe, stoga ove nečistoće nisu uočljive ili su otkrivene s malim vrednostima u uzorcima *ex-tempore*. Dobijeni rezultati tokom 60 meseci za sve tri testirane serije bili su: za 4-hidroksi sulfonsku nečistoću u rasponu od n.d. do 0,09% (inicijalno n.d. do 0,02%), a za 4-hidroksi sulfidnu nečistoću u rasponu od n.d. do 0,02% (inicijalno nije detektovano).

Primećeno je povećanje 4-hidroksi nečistoće i N-metil izomera. Ove nečistoće su produkti razgradnje esomeprazol-natrijuma koji nastaju pod uticajem temperature. Dobijeni rezultati za sve tri serije za nečistoću 4-hidroksi su bili u rasponu 0,16-0,72% (inicijalno n.d.-0,02%), a specifikacijske granice su najviše 0,9%. Dobijeni rezultati za N-metil izomere za sve tri serije bili su u rasponu od 0,17-0,85% (inicijalno 0,02%), a specifikacijske granice su najviše 0,9%.

Nespecificirane nečistoće: tokom 60 meseci ispitivanja stabilnosti nije primećeno povećanje nespecificiranih nečistoća. Nespecificirane nečistoće nisu detektovane ili su njihove vrednosti bile do 0,08% (inicijalno nisu bile detektovane, a specifikacijske granice su najviše 0,2%).

Ukupne nečistoće: povećanje ukupnih nečistoća tokom ispitivanja stabilnosti praćeno je povećanjem nivoa nečistoća 4-hidroksi i N-metil izomera. Rezultati dobijeni za sve serije bili su u rasponu od 0,48-2,01% (inicijalno 0,09-0,12%). Specifikacijske granice su najviše 2,5%.

- Optička čistoća: ispitivanje je izvršeno nakon 6, 12 i 36 meseci. Početna vrednost R-enantiomera bila je 0,01% za prvu i drugu seriju (brojevi P-4 i P-5, redom) i 0,07% za treću seriju (broj P-6). Nakon 36 meseci, R-enantiomer nije otkriven u sve tri serije. Prema dobijenim rezultatima zaključeno je da R-enantiomer nije produkt razgradnje API pod uticajem temperature, što je ukazivalo na to da ovo ispitivanje treba isključiti iz specifikacije ispitivanja leka.
- Sterilnost: ovaj test je izvršen inicijalno i godišnje tokom ispitivanja stabilnosti. Svi analizirani uzorci su bili sterilni.
- Bakterijski endotoksini: ovaj test je ispitivan inicijalno i godišnje tokom ispitivanja stabilnosti. Svi su rezultati bili u okviru specifikacijskih granica.

4.1.3.1.3 *In-use* studija stabilnosti

Ispitivanje *in-use* stabilnosti izvršeno je nakon 6, 12, 24, 36 i 60 meseci na dve proizvedene serije (broj P-1 i P-5). Tokom perioda upotrebe uzorci su čuvani pri uslovima 40 °C/75%RH, 25 °C/60%RH, 30 °C/65%RH i 30 °C/75%RH, u toku 12 h. Bočice su držane u horizontalnom položaju. Tokom *in-use* ispitivanja stabilnosti, promene boje rastvora i povećanje u rezultatima srodnih supstanci (nečistoće na RRT 0,42 i RRT 0,81, zbir 8-metoksi-tiokso i 9-metoksi-tiokso nečistoća i

nekoliko nespecificiranih nečistoća) uočeni su kada su uzorci stabilnosti poređeni sa odgovarajućim uzorcima *ex-tempore*. Svi dobijeni rezultati su bili u okviru specifikacijskih granica.

- Rezultati ispitivanja izgleda:

Za vreme *in-use* ispitivanja stabilnosti, boja rastvora je bila u rasponu od <Y5 do <GY5. Boja njihovih odgovarajućih uzoraka *ex-tempore* je bila od Y7 do <Y5. Prema rezultatima stabilnosti potvrđena je specificirana boja za rastvor: najviše Y5 ili GY5.

Bistrina rastvora tokom *in-use* studije stabilnosti nije promenjena, osim za uzorke nakon 60 meseci gde je dobijen opalescentan rastvor pri uslovima kondicioniranja 40 °C/75%RH i 30 °C/75%RH.

- Rezultati ispitivanja srodnih supstanci:

Specificirane identifikovane nečistoće: nije bilo promena u nivou sulfonske nečistoće poređenju sa rezultatima *ex-tempore*. Zabeleženo je neznatno povećanje nečistoće 8-metoksi-tiokso i nečistoće 9-metoksi-tiokso u uzorcima koji su bili u upotrebi, a koji su prethodno kondicionirani 36 meseci. Dobijena je vrednost od 0,14%, koja je bila u okviru definisanih specifikacijskih granica (najviše 0,25%).

4-hidroksi sulfonska nečistoća i 4-hidroksi sulfidna nečistoća su kritični faktori stabilnosti leka tokom upotrebe. Rezultati za oba uslova kondicioniranja nakon 36 i 60 meseci, za 4-hidroksi sulfonsku nečistoću, za koju je specifikacijska granica najviše 0,6% i rezultati za 4-hidroksi sulfidnu nečistoću za koju je specifikacijska granica najviše 0,4%, zadovoljili su propisane specifikacije.

Došlo je do smanjenja nivoa nečistoće 4-hidroksi tokom perioda upotrebe. 4-hidroksi nečistoća bila je nestabilna u rastvoru i degradirala se na ostale dve nečistoće, 4-hidroksi sulfonsku nečistoću i 4-hidroksi sulfidnu nečistoću. N-metil izomeri su stabilni u rastvorima i nije bilo promena tokom perioda upotrebe.

Nespecificirane nečistoće: tokom perioda upotrebe primećeno je bago povećanje nekoliko nespecificiranih nečistoća. Svi rezultati su bili u specifikacijskim granicama od najviše 0,2%. Najviši dobijeni rezultat bio je 0,08% (RRT 0,27, nakon 6 i 24 meseca), dok su svi ostali dobijeni rezultati za testiranu seriju bili u rasponu od n.d - 0,07%.

Ukupne nečistoće: zapaženo je povećanje ukupnih nečistoća. Najveća vrednost primećena je u uzorcima koji su prethodno bili kondicionirani 36 meseci pri uslovima 30 °C/75%RH - 2,04%, dok je specifikacijska granica najviše 2,5% (*ex-tempore* rezultat je bio 1,50%).

4.1.3.2 Zaključak formalnih studija stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

Ubrzana, intermedijarna i dugotrajna studija stabilnosti su izvedene na šest proizvedenih serija, dok je studija fotostabilnosti izvedena na dve proizvedene serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, po jednoj od svakog proizvođača API (Uquifa i Jubilant).

Sistemske pristup je primenjen u evaluaciji informacija o stabilnosti prikupljenih tokom ispitivanja stabilnosti, koje pokrivaju fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike kvaliteta.

Rezultati formalne studije stabilnosti esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju su pokazali da tokom 36 meseci ispitivanja na intermedijarnim i dugotrajnim uslovima kondicioniranja nisu uočene značajne promene u bilo kojem od analiziranih uzoraka. Svi kritični atributi kvaliteta, kao što su izgled liofiliziranog proizvoda, sadržaj vode, vreme rekonstitucije, izgled rastvora, čestice ispod granice vidljivosti, pH, sadržaj esomeprazola i srodnih supstanci, su bili u okviru specifikacijskih granica. Značajna promena sadržaja vode u liofiliziranom proizvodu i sadržaju esomeprazola je zabeležena nakon 60 meseci na intermedijarnim uslovima kondicioniranja u serijama sa *Jubilant*-ovom API. Iako su svi rezultati za izgled rastvora i srodnih supstanci ostali unutar specifikacijskih granica nakon 48 i 60 meseci u intermedijarnim i dugotrajnim uslovima kondicioniranja, uočene promene se mogu smatrati značajnim. Na ubrzanim uslovima kondicioniranja, rezultati su bili unutar

propisanih specifikacijskih granica. Međutim, nakon šest meseci skladištenja zabeleženo je najveće povećanje u rezultatu za specificirane nečistoće. Pored toga, tokom formalne i *in-use* studije stabilnosti, primećene su promene u izgledu rastvora (od <Y7 do Y5 ili GY5).

Sterilnost i sadržaj bakterijskih endotoksina proizvedenih serija su ispitivani inicijalno i u finalnoj tački studije stabilnosti na ubrzanim uslovima kondicioniranja i jednom godišnje na intermedijarnim i dugotrajnim uslovima kondicioniranja. Svi rezultati su ispunili kriterijume propisane specifikacijom.

Ispitivanje fotostabilnosti ispitivanog proizvoda uključuje ispitivanje bočica koje su bile direktno izložene svetlu, kao i ispitivanje bočica u originalnom pakovanju. Rezultati su pokazali da bočice treba čuvati zaštićene od svetlosti zbog neprihvatljive promene u izgledu liofiliziranog proizvoda i rezultata za srodne supstance koji su dobijeni izvan specifikacijskih granica. Svi rezultati ispitivanja bočica u originalnom pakovanju dobijeni su u okviru specifikacijskih granica.

Kompatibilnost esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju za odabranim sistemom zatvorenog kontejnera je potvrđena kroz rezultate prikupljene tokom studije stabilnosti.

Na osnovu rezultata intermedijarne i dugotrajne studije stabilnosti koji su zadovoljili specifikacije, predložene su sledeće preporuke za čuvanje proizvoda:

Tip primarnog pakovnog materijala: -bočica: bezbojno borosilikatno staklo, tip I,

-čep: bromobutil elastomer, FM 257/2,

-kapica: flip kapica.

Uslovi čuvanja: Čuvati ispod 30°C.

Bočice čuvati u originalnom pakovanju radi zaštite od svetlosti.

Rok upotrebe: 3 godine (3 godine pri uslovima 30 °C/65%RH i pri uslovima 30 °C/75%RH)

Rok upotrebe nakon rekonstitucije: Hemijska i fizička *in-use* stabilnost rekonstituisanog rastvora je dokazana tokom 12 h čuvanja na 30°C.

Sa mikrobiološke tačke gledišta, osim ako metoda rekonstitucije isključuje rizik od mikrobiološke kontaminacije, proizvod treba odmah koristiti. Ako se ne koristi odmah, vreme i uslovi čuvanja u toku upotrebe su odgovornost korisnika.

4.1.4 Analiza uticaja kritičnih faktora na dobijanje stabilnog gotovog proizvoda uvećane serije

Sa ciljem da se dobije stabilan finalni proizvod gotovo dvostruko uvećane serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju (*scale-up* sa 17.000 na 33.000 bočica), razmotreni su celokupan proizvodni proces, kritični proizvodni koraci, kritični delovi opreme/sistema i faktori formulacije, a polazeći od API esomeprazol-natrijum. Esomeprazol-natrijum je nestabilna supstanca, osetljiva na toplotu, oksidaciju i izuzetno osetljiva na kiselu hidrolizu, sa pojavom velikog broja degradacionih proizvoda. Glavni proizvodi degradacije esomeprazola dešavaju se u uslovima termalne i oksidativne degradacije [27]. Ova nestabilnost lekovite supstance utiče na nestabilnost gotovog proizvoda, koja se ogleda u brzom padu pH vrednosti usled direktnog kontakta rastvora lekovite supstance sa vazduhom. Tokom procesa proizvodnje, esomeprazol rastvor je konstantno u struji azota. Počevši od pripremnog suda gde se API prvi put i dodaje, preko sistema zatvorenih cevi koje rastvor dalje vode ka filtraciji smanjenja bioopterećenja, a nakon toga i do sterilne filtracije i linije za punjenje, gde se bočice napunjene rastvorom takođe nalaze u struji azota, nakon čega bivaju delimično zatvorene gumenim zatvaračem. Ovakav proces proizvodnje osigurava da su direktna izloženost rastvora vazduhu, a samim tim i uticaju kiseonika izbegnuti. Ipak, rastvor u delimično zatvorenim napunjenim bočicama je konstantno izložen kiseoniku iz vazduha i to od momenta kada su napunjene do trenutka započinjanja liofilizacije (čepovi bočica su pozicionirani tako da obezbede neometanu liofilizaciju). Dijagram toka procesa proizvodnje esomeprazol, praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg sa opisom svakog proizvodnog koraka i svih materijala koji se u njima koriste, kao i CMA, CPP i CQA i kriterijumi prihvatljivosti za svaki korak proizvodnje, dati su u Tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Dijagram toka procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju sa definisanim CPP, CMA, CQA i kriterijumima prihvatljivosti

| PROIZVODNI KORAK | PROCESNI PARAMETRI (CPP podebljani) | KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA PROCESNE PARAMETRE (CPP) ^a | KRITIČNI ATRIBUTI KVALITETA (CQA podebljani) | KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA KRITIČNE ATRIBUTE KVALITETA (CQA) |
|---|---|--|--|--|
| PRIPREMA RASTVORA <u>Voda za injekcije</u> <u>Dinatrijum-edetat</u> <u>Esomeprazol-natrijum^b</u> <u>Voda za injekcije</u> | Brzina gasiranja azotom | min. 160 l/h | pH | 11,6 – 11,8 |
| | Brzina mešanja | 70-90% nakon svake dodate sirovine, a 40 – 60% između | | |
| | Trajanje mešanja | min. 15 minuta nakon dodatka svake sirovine | | |
| | Temperatura rastvora | 10 – 15 °C | | |
| | Sadržaj kiseonika | max. 0,5 mg/l | | |
| | Podešavanje pH | 11,6 – 11,8 | | |
| FILTRACIJA SMANJENJA BIOOPTEREĆENJA | Pritisak filtracije | 1,0 – 1,5 bar | N/P | N/P |
| | Trajanje filtracije | max. 60 min | | |
| | Test ispitivanja integriteta filtera (IT) pre filtracije | max. <i>forward flow</i> (FF)=Odgovara min. <i>Buble Point Test</i> (BP)=Odgovara | | |
| | IT posle filtracije | max. FF=Odgovara min. BP=Odgovara | | |
| STERILNA FILTRACIJA | Pritisak azota | max. 0,6 bar | N/P | N/P |
| | IT pre filtracije | max. FF=Odgovara min. BP=Odgovara | | |
| | IT posle filtracije | max. FF=Odgovara min. BP=Odgovara | | |
| PUNJENJE BOČICA | Brzina mašine | 140 ± 20 bočica/min | pH | 10,8 – 11,8 |
| | Masa punjenja | 2,074 g (2,054 g – 2,094 g) | | |
| | Kontrola pozicije čepa | DA | | |
| LIOFILIZACIJA | Temperatura, pritisak i vreme trajanja faza tokom liofilizacije | Zamrzavanje: - 30 ± 1 °C/1000 mbar/2,5 h Primarno sušenje: - 5 ± 1 °C → 20 ± 1 °C/0,220 mbar/10 h → 3 h Sekundarno sušenje: 40 ± 1 °C/0,220 mbar → 0,01 mbar/4 h → 6 h | Voda | Najviše 3,0% |
| | Test rasta pritiska | max 0,01 mbar/180 s | Sadržaj esomeprazola | 95 - 105% |
| | | | Srodne supstance | Ukupne: Najviše 1,5% |

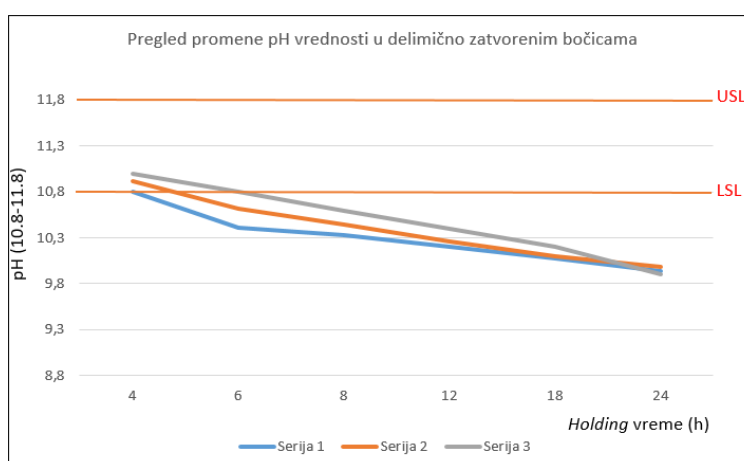
Napomene: ^a - Primeri procesnih parametara; ^b – Kritični atributi materijala (CMA): Sadržaj API; N/P – nije primenjivo

Tabela 4.13. Dijagram toka procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju sa definisanim CPP, CMA, CQA i kriterijumima prihvatljivosti (nastavak)

| PROIZVODNI KORAK | PROCESNI PARAMETRI (CPP podebljani) | KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA PROCESNE PARAMETRE (CPP) ^a | KRITIČNI ATRIBUTI KVALITETA (CQA podebljani) | KRITERIJUMI PRIHVATLJIVOSTI ZA KRITIČNE ATRIBUTE KVALITETA (CQA) |
|---------------------------------|--|--|---|---|
| ZATVARANJE I PERTLOVANJE BOČICA | Brzina mašine za zatvaranje i pertlovanje bočica | 160 ± 10 bočica/min | N/P | N/P |
| VIZUELNA INSPEKCIJA | Optička vizuelna inspekcija od strane operatera | Odgovara zahtevima | Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti | ≥ 10 µm: Najviše 6000 čestice/bočica ≥ 25 µm: Najviše 600 čestice/bočica |

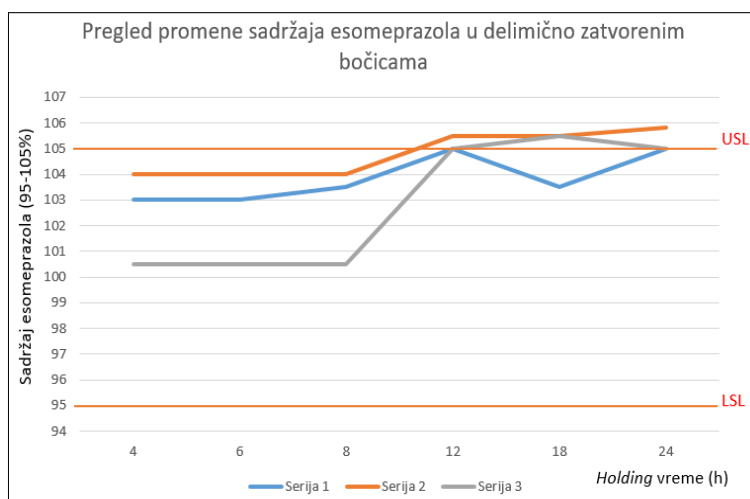
Napomene: ^a - Primeri procesnih parametara

Bočice napunjene na samom početku procesa sterilne filtracije i punjenja, kao i one koje bivaju dalje napunjene kako ovaj proces kontinuirano odmiče, čuvaju se ispod laminara, a zatim i na policama liofilizatora, čekajući da se ostatak celokupne veličine serije napuni u bočice i poređa u liofilizator, odnosno da program liofilizacije započne. Imajući to u vidu, uslovi okruženja kojima je rastvor u bočicama izložen vazduhu (na prvom mestu temperatura, koja može ubrzati proces oksidativne degradacije API), kao i vreme koje bočice provedu (engl. *holding* vreme – vreme zadržavanja), od momenta njihovog punjenja do momenta početka liofilizacije, su od najveće važnosti za stabilnost proizvoda. Temperatura koja se održava u laminaru, kao i temperatura polica, odgovara 20 °C, dok sa druge strane, rastvor lekovite supstance postaje inertan i kao takav neosetljiv na potencijalne dalje promene, na temperaturi zamrzavanja proizvoda od -30 °C (što je i temperatura prvog koraka liofilizacije). pH vrednost rastvora delimično zatvorenih bočica izloženih vazduhu pri temperaturi od 20 °C ostaje stabilan tokom samo 4 h, nakon čega dostiže vrednost koja je ispod specifikacijskih granica (specifikacija: pH 10,8-11,8). Na Slici 39 prikazan je trend promene pH vrednosti rastvora u napunjenim, delimično zatvorenim bočicama, prilikom čuvanja na temperaturi od 20 °C u uspostavljenom proizvodnom postupku.



Slika 39. Promena pH vrednosti rastvora u rastvoru esomeprazola bočica delimično zatvorenih koje su čuvane na 20 °C

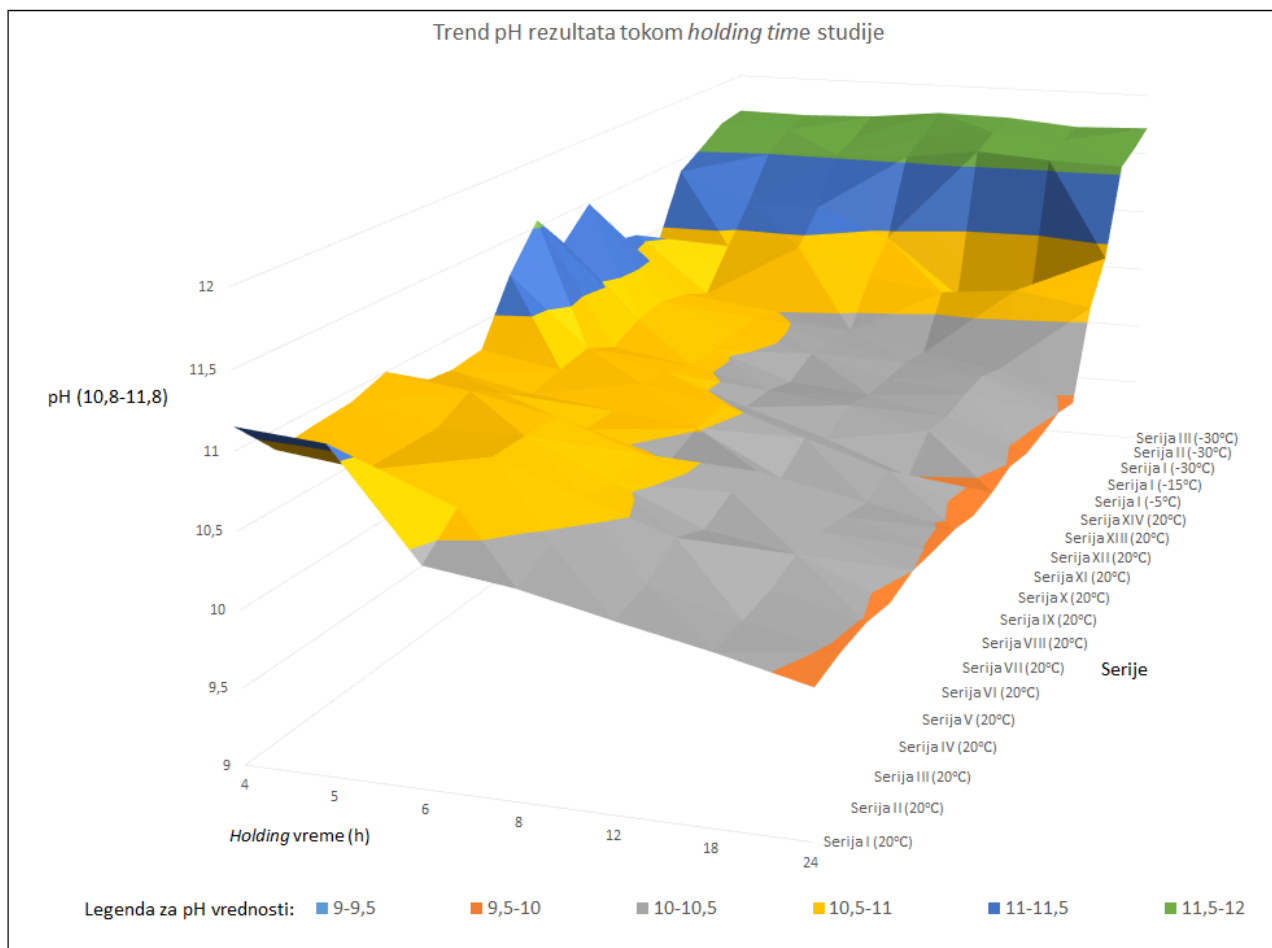
Izuzev promene u pH vrednosti rastvora esomeprazola u bočicama koje su čuvane na ovaj način, uočena je i promena u sadržaju esomeprazola (Slika 40).



Slika 40. Promena sadržaja esomeprazola u rastvoru delimično zatvorenih bočica čuvanih na 20 °C

Usled ove nestabilnosti, maksimalno vreme za koje delimično zatvorene bočice smeju biti izložene vazduhu je značajno smanjeno, a time i maksimalno vreme za koje cela serija rastvora mora biti napunjena, a da se ne ugrozi kvalitet gotovog proizvoda. Skraćeno vreme trajanja procesa punjenja, ograničava kapacitet liofilizatora i posledično smanjuje broj "dobrih" bočica gotovog proizvoda koje su u skladu sa specifikacijama. Vreme od 4 h, za koje je potrebno završiti punjenje celokupne serije kako bi se maksimizirao prinos, ugrožava punjenje "male" serije, čime se proizvodnja uvećane serije od 33.000 bočica na ovaj način, čini gotovo nemogućom. Ovakav nerobustan proces proizvodnje, prvenstveno sa aspekta faze punjenja koja nije reproducibilna, predstavlja ozbiljnu prepreku za *scale-up* esomeprazol praška sa veličine serije od 17.000 na 33.000 bočica.

Sa ciljem da se dobije stabilna pH vrednost rastvora koja će omogućiti punjenje celokupne serije veličine 33.000 bočica, uveden je korak direktnog zamrzavanja (pre-zamrzavanje), kako bi se rastvor učinio inertnim i time sprečio dalji pad pH vrednosti, odnosno stabilizovao rastvor esomeprazol-natrijuma. Tokom proizvodnje, osim temperature od 20 °C koja je do tada korišćena, napunjene delimično zatvorene bočice su podvrgavane pre-zamrzavanju na temperaturama polica liofilizatora od -5 °C, -15 °C i -30 °C nakon punjenja, a pre započinjanja procesa liofilizacije. Za sve uzorke napunjenih bočica koje su čuvane na različitim temperaturama polica (20 °C, -5 °C, -15 °C i -30 °C), izvršeno je celokupno fizičko-hemijsko i mikrobiološko ispitivanje. Imajući u vidu da su sve serije kod kojih su varirane temperature pre-zamrzavanja proizvedene na isti način, validiranim proizvodnim postupkom i da su osnovni zahtevi ispitivanja gotovog proizvoda zadovoljeni, akcenat je bio na takozvanoj *holding time* (vreme zadržavanja) studiji. Ispitivano je maksimalno vreme koje delimično zatvorene napunjene bočice rasvorom esomeprazol-natrijuma mogu da provedu od trenutka punjenja do momenta početka liofilizacije na ovako zadatim temperaturama, sa ciljem da se odabere najbolja temperatura koraka pre-zamrzavanja sa ovog aspekta. Trend promene pH vrednosti rastvora esomeprazol-natrijuma zabeleženih tokom *holding time* studije predstavljen je na Slici 41.



Slika 41. Trend promene pH vrednosti tokom *holding time* studije na temperaturama 20 °C, -5 °C, -15 °C i -30 °C, za rastvore esomeprazol-natrijuma u delimično zatvorenim bočicama

Na osnovu zabeleženih rezultata, punjenje liofilizatora na temperaturi polica od -30 °C u poređenju sa temperaturom od 20 °C, značajno produžava vreme za koje rastvor esomeprazola ostaje stabilan i bez promena njegovih fizičko-hemijskih i mikrobioloških karakteristika (4 h na temperaturi od 20 °C, u poređenju sa 24 h na -30 °C, nakon kojih pH i dalje ostaje u specifikacijskim granicama). Pored toga, prethodno zamrzavanje na temperaturi koja odgovara onoj u prvom koraku programa liofilizacije (zamrzavanje, temperatura od -30 °C) dovoljno je da obezbedi direktno zamrzavanje rastvora u svim bočicama, pri čemu rastvor postaje inertan i sprečava se smanjenje pH vrednosti usled izlaganja kiseoniku. Ovim bi se osiguralo da je kvalitet rastvora u napunjenim bočicama i do samog kraja proizvodnog procesa isti kao i za finalni *bulk* rastvor na kraju pripreme. Vreme držanja bočica u fazi punjenja produženo na ovaj način bi bilo dovoljno za *scale-up* do skoro dvostruko veće veličine serije.

Uvođenjem koraka pre-zamrzavanja, rešen je problem kratkog trajanja procesa punjenja, odnosno omogućeno je da se celokupna veličina uvećane serije napuni, bez ugrožavanja kvaliteta gotovog proizvoda.

Sa ciljem da se razvije strategija kontrole za sve kritične parametre procesa i kritične attribute kvaliteta materijala u procesu proizvodnje *scale-up* serija esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, primenjen je *Quality by design* koncept.

4.2 Primena Quality by design koncepta u optimizaciji procesa proizvodnje esomeprazol praška za injekciju/infuziju

4.2.1 Analiza rizika i razvoj strategije kontrole kritičnih faktora za dobijanje stabilnog proizvoda

Detaljna analiza svih kritičnih faktora za dobijanje stabilnog gotovog proizvoda sprovedena je analizom rizika, sa ciljem da se razvije strategija kontrole za kritične parametre procesa i kritične attribute kvaliteta materijala i time osigura optimizovan proces proizvodnje gotovo dvostruko uvećane veličine serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju.

Polazeći od QTPP, definisanog zajedno sa svim potencijalnim CPP i CMA, koji mogu da utiču na proces proizvodnje ili proizvod, izvedena je FMEA, sa ciljem da se definiše kontrolna strategija za identifikovane CPP i CMA u proizvodnji.

Kako bi se izvršila FMEA analiza esomeprazol praška za injekciju/infuziju, 40 mg pažljivo je definisan QTPP (Tabela 4.14).

Tabela 4.14. QTPP esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

| QTPP element | Cilj | Obrazloženje |
|--------------------|---|--|
| Farmaceutski oblik | Prašak za rastvor za injekciju/infuziju | Gastrična antisekretorna terapija kada oralni put primene nije moguć. |
| Put primene | Intravenski | Doza koja je dizajnirana da se primeni intravenski. |
| Doza | 40 mg | Uobičajena jačina leka. |
| CQAs | Izgled Sadržaj API Srodne supstance pH Bakterijski endotoksini <i>Bioburden</i> Sterilnost Ispitivanje ispravnosti punjenja Ujednačenost doziranog oblika Voda Ispitivanje čestica ispod granice vidljivosti: Čestice $\geq 10 \mu\text{m}$ Čestice $\geq 25 \mu\text{m}$ | CQAs u skladu sa specifikacijom: Bistar, bezbojan do slabo žuti rastvor, praktično bez vidljivih čestica 95–105% Ukupne: Najviše 1.5% 10,8–11,8 Najviše 3,125 IU/mg <10 cfu/100 ml Sterilno Najmanje 5,0 ml Odgovara Ph. Eur. 2.9.40 Najviše 3,0% Najviše 6000 čestice/bočica Najviše 600 čestice/bočica |

CQA, CPP i CMA, kao i RPN koji su rezultat detaljne analize rizika predstavljeni su u Tabeli 4.15.

Tabela 4.15. Rizik analiza za proizvodni proces esomeprazol praška za injekciju/infuziju

| CILJANI PROFIL KVALITETA PROIZVODA | CMA/ CPP | Efekat odstupanja/neusaglašenosti | Ozbiljnost posledica neusaglašenosti (S) | Verovatnoća (P) | Detekcija (D) | RPN | OCENA RIZIKA | | |
|---|-------------|--|--|---|---------------|-----|--------------|----|---|
| Izgled | CPP | Brzina mešanja Trajanje mešanja | Potencijalni rizik od nekompletnog rastvaranja API i ekscipijenasa | 3 | 1 | 1 | 3 | L | |
| | CPP | Temperatura, pritisak i vreme trajanja faza tokom liofilizacije Test rasta pritiska | Test rasta pritiska nije zadovoljio zahteve nakon sekundarnog sušenja Povećan sadržaj vode liofilizata uzrokuje povećane srodne supstance i posledično manji sadržaj | 5 | 2 | 3 | 30 | L | |
| | CMA | Sadržaj API | Neogovarajući sadržaj API | 4 | 2 | 1 | 8 | L | |
| | Sadržaj API | CPP | Sadržaj kiseonika u rastvoru | Potencijalni rizik povećanog sadržaja kiseonika u rastvoru iznad maksimalnog dozvoljenog i posledično oksidacija API, što dovodi do manjeg sadržaja | 5 | 3 | 3 | 45 | M |
| | | CPP | Brzina mešanja Trajanje mešanja | Potencijalni rizik od nekompletnog rastvaranja API, što dalje vodi ka rezultatima u sadržaju koji odstupaju od specifikacije | 4 | 1 | 3 | 12 | L |
| Srodne supstance | CPP | Temperatura, pritisak i vreme trajanja faza tokom liofilizacije Test rasta pritiska | Test rasta pritiska nije zadovoljio zahteve nakon sekundarnog sušenja. Povećan sadržaj vode liofilizata uzrokuje povećane srodne supstance i posledično manji sadržaj | 5 | 2 | 3 | 30 | L | |
| | CMA | Srodne supstance svih sirovina | Potencijalni uticaj na srodne supstance gotovog proizvoda | 4 | 2 | 1 | 8 | L | |
| pH | CPP | Sadržaj kiseonika u rastvoru | Potencijalni rizik povećanog sadržaja kiseonika u rastvoru iznad maksimalne dozvoljene i posledično oksidacija API, što dovodi do rasta srodnih supstanci | 5 | 3 | 3 | 45 | M | |
| | CPP | Količina rastvora natrijum-hidroksida Brzina dodavanja rastvora Brzina mešanja | Degradacija API usled pH izvan specifikacije | 4 | 2 | 3 | 24 | L | |
| | | CPP | Sadržaj kiseonika u rastvoru | Potencijalni rizik povećanog sadržaja kiseonika u rastvoru, usled izlaganja vazduhu, uzrokuje brz pad pH i posledično rezultate izvan specifikacije | 5 | 3 | 3 | 45 | M |

Napomena: L- nizak rizik (engl. *Low*); M – srednji rizik (engl. *Medium*)

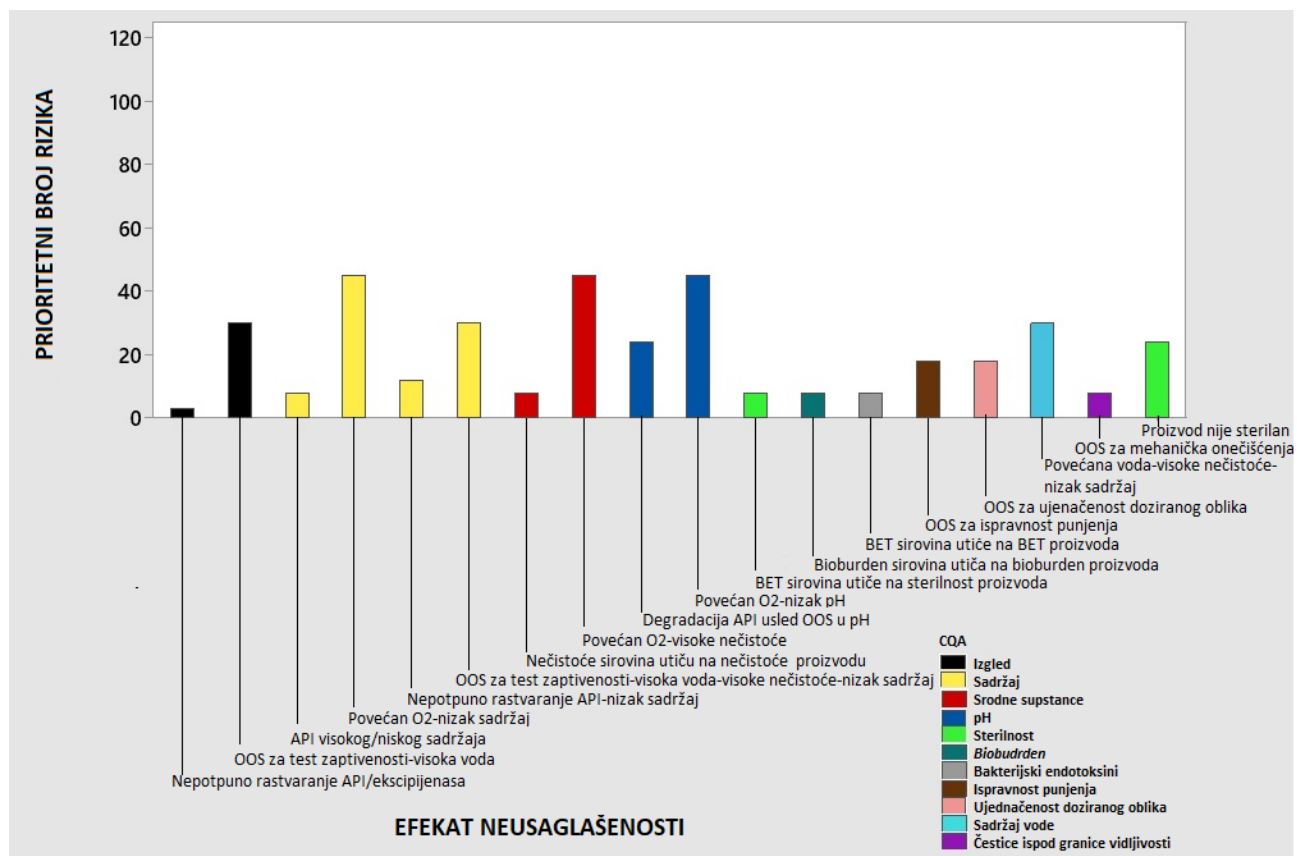
Tabela 4.15. Rizik analiza za proizvodni proces esomeprazol praška za injekciju/infuziju (nastavak)

| CILJANI PROFIL KVALITETA PROIZVODA | CMA/ CPP | Efekat odstupanja/neusaglašenosti | Ozbiljnost posledica neusaglašenosti (S) | Verovatnoća (P) | Detekcija (D) | RPN | OCENA RIZIKA |
|--|----------|---|--|-----------------|---------------|-----|--------------|
| Bakterijski endotoksini <i>Bioburden</i> Sterilnost | CMA | Neogovarajući rezultati za <i>bioburden</i> /bakterijske endotoksine polaznih sirovina koji dalje mogu uticati na <i>bioburden</i> i sterilnost gotovog proizvoda | 4 | 2 | 1 | 8 | L |
| Ispitivanje ispravnosti punjenja Ujednačeno st doziranog oblika | CPP | Limiti za zapreminu punjenja/ujednačenost doziranog oblika nisu zadovoljeni, što uzrokuje neodgovarajuću dozu za pacijenta | 3 | 2 | 3 | 18 | L |
| Voda | CPP | Test rasta pritiska nije zadovoljio zahteve nakon sekundarnog sušenja Povećan sadržaj vode liofilizata uzrokuje povećane srodne supstance i posledično manji sadržaj | 5 | 2 | 3 | 30 | L |
| Čestice ispod granice vidljivosti | CPP | Tokom vizuelne inspekcije, nisu sve bočice zadovoljile propisane zahteve | 4 | 2 | 1 | 8 | L |
| Sterilnost | CPP | Pritisak tokom sterilne filtracije IT filtera Proizvod ne prolazi test sterilnosti | 4 | 2 | 3 | 24 | L |

Napomena: L- nizak rizik (engl. *Low*); M – srednji rizik (engl. *Medium*)

RPN svake pojedinačne neusaglašenosti/odstupanja je izračunata na osnovu numeričke evaluacije tri individualne komponente ocenjivanja: ozbiljnosti posledica neusaglašenosti, verovatnoće i detekcije (opisano u delu 3.2.4.2). Ocene su za svaku od ovih komponenata dodeljene na osnovu znanja o proizvodu i procesu proizvodnje, a u skladu sa skalom ocenjivanja prethodno objašnjenoj u Tabeli 3.14.

Grafički prikaz izračunatih RPN-ova svakog identifikovanih odstupanja/neusaglašenosti je prikazan na Slici 42.

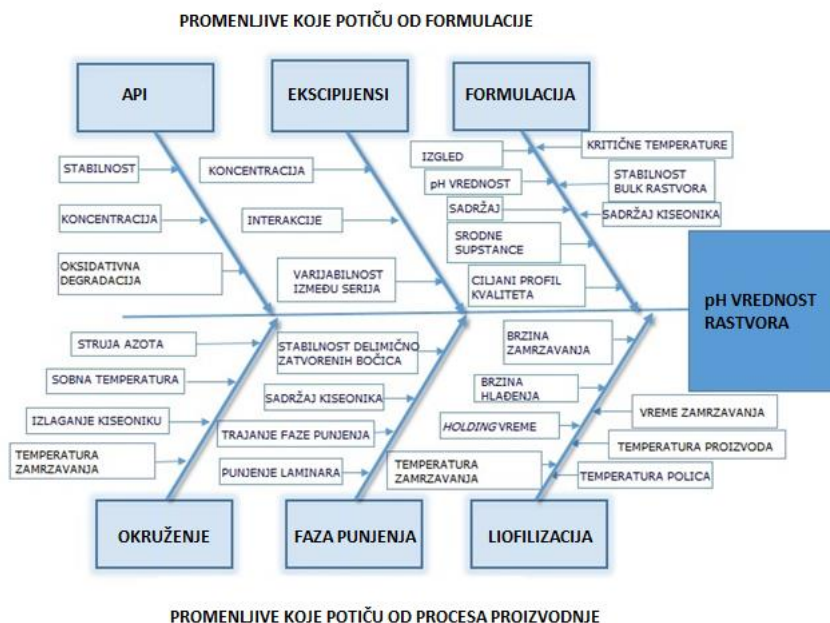


Slika 42. Pregled RPN izračunatih za svaku identifikovanu neusaglašenost/odstupanje (obrazloženje za svaki RPN je dato u Tabeli 4.15); napomene: OOS - engl. *Out Of Specification* - rezultat izvan specifikacije; BET - bakterijski endotoksini

Sva potencijalna odstupanja/neusaglašenosti su ocenjeni kao nizak rizik (dobijeni RPN-ovi su manji od 40), izuzev onih koji su povezani sa sledećim CQA: pH, sadržaj esomeprazola i srodne supstance, koji su ocenjeni kao srednji rizik (dobijeni RPN-ovi u rasponu od 40-99 za efekat neusaglašenosti/odstupanja) i stoga su bili predmet daljeg razmatranja.

Kritični atributi kvaliteta gotovog proizvoda esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, dobijeni rizikom analizom, sa najvišim RPN ocenom su pH (RPN 45), sadržaj esomeprazola (RPN 45) i srodne supstance (RPN 45). Sva tri CQA su potencijalno povezana sa rizikom povećanog sadržaja kiseonika u rastvoru, usled njegovog izlaganja vazduhu, koji dovodi do brzog pada pH vrednosti i posledično do rezultata izvan okvira specifikacije. Ovo može pokrenuti oksidaciju esomeprazola i dovesti do porasta nečistoća i rezultata izvan specifikacijskih granica za sadržaj aktivne supstance.

Imajući u vidu da je pH vrednost rastvora ocenjena kao najkritičnija za dostizanje željenog kvaliteta esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, sve varijable formulacije i proizvodnog postupka, koje bi potencijalno mogle da utiču na dobijanje rezultata izvan specifikacije za ovaj CQA su procenjene i prikazane su uz pomoć *Ishikawa* dijagrama kao alata za analizu rizika (Slika 43).



Slika 43. Pregled varijabli formulacije i procesa koje bi mogle uticati na CQA-pH esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju

Za većinu formulacionih i procesnih varijabli istaknutih *Ishikawa* dijagramom, dobra kontrola i pozitivno iskustvo u vezi sa osiguranjem odgovarajućeg kvaliteta proizvoda su dokazani validiranim procesnim parametrima i in-procesnom kontrolom koja se sprovodi (Tabela 4.13). Sa druge strane, temperatura (temperatura prostorije, temperatura polica, temperatura zamrzavanja) kojoj je proizvod izložen, kao i dužina trajanja te izloženosti (engl. *holding time*), su više puta dovođeni u korelaciju sa promenom pH vrednosti rastvora, kao kritični procesni parametri odgovorni za ovaj efekat. Zbog toga, sa ciljem da se obezbedi bolja kontrola pH vrednosti rastvora, kao najkritičnijeg CQA, potrebno je razviti *design space* koji je opisan odgovarajućim granicama CPP temperatura polica i CPP *holding* vreme.

Uzimajući u obzir faktore koji utiču na kvalitet liofiliziranog leka, odnosno na kontrolu pH vrednosti esomeprazol rastvora, temperatura kojoj je proizvod izložen (od temperature prostorije od 20 °C do temperature zamrzavanja tokom programa liofilizacije od -30 °C) i vreme trajanja ove izloženosti su detaljnije analizirane.

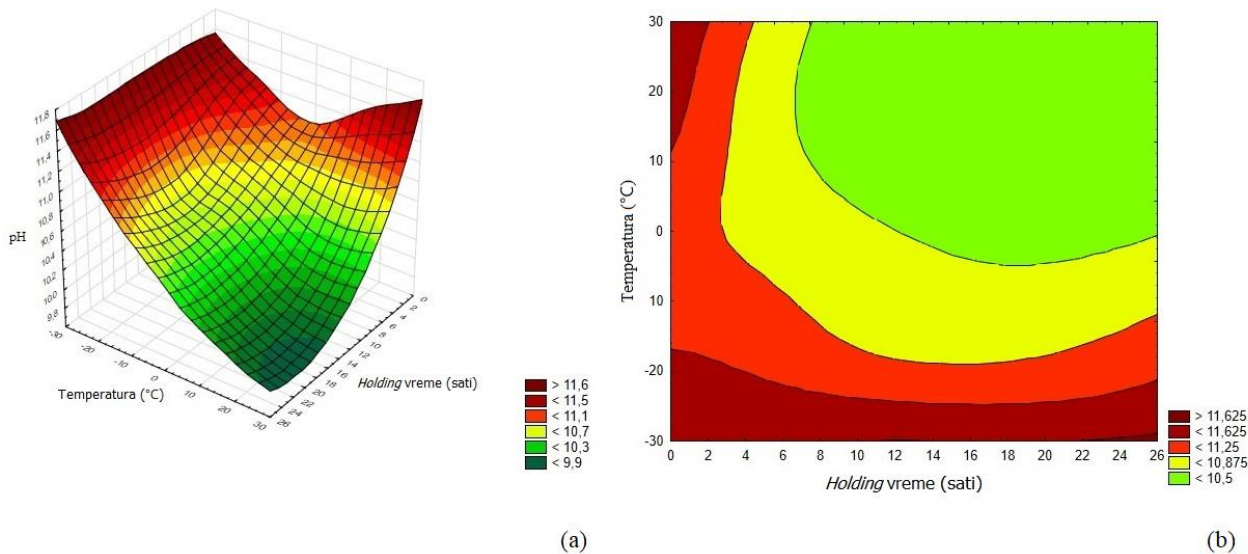
Kao što je već prethodno detaljno opisano (tačka 4.1.4), sa ciljem da se dobije stabilna pH vrednost rastvora, uveden je korak direktnog zamrzavanja (pre-zamrzavanje), kako bi se rastvor učinio inertnim i time sprečio dalji pad pH vrednosti, odnosno stabilizovao rastvor esomeprazol-natrijuma. Tokom proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, osim temperature od 20 °C koja je do tada korišćena, napunjene delimično zatvorene bočice su podvrgavane pre-zamrzavanju, na temperaturama polica od -5 °C, -15 °C i -30 °C nakon punjenja, a pre započinjanja procesa liofilizacije. Za sve uzorke napunjenih bočica koje su čuvane na različitim temperaturama polica (20 °C, -5 °C, -15 °C i -30 °C), za rastvor u delimično zatvorenim napunjenim bočicama, praćeni su CQA pH, sadržaj i srodne supstance, u prethodno definisanim vremenskim intervalima čuvanja (*holding time* tačke 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h – od momenta kada je rastvor napunjen u bočice).

4.2.2 Razvoj design space-a procesa liofilizacije

Višeslojni perceptron (engl. *multilayer perceptron* - MLP) veštačka neuronska mreža je trenirana uz pomoć rezultata iz 32 eksperimentalne probe (u kojima su varirani temperatura polica i *holding* vreme). Mreža koja najbolje opisuje uticaj ovih ulaznih varijabli na pH vrednost rastvora bila je MLP

sa tri sloja i strukturom 2-4-1. MLP je obuhvatila dva neurona u prvom ulaznom sloju (što odgovara ulaznim podacima – temperatura (20 °C, -5 °C, -15 °C i -30 °C) i vreme (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h), četiri neurona u drugom skrivenom sloju i jednim neuronom u trećem sloju, koji odgovara pH vrednosti rastvora, koja je korišćena kao izlaz. Treniranje mreže je sprovedeno kroz 100 epoha uz korišćenje algoritma *back-propagation*. Nakon treniranja, vrednosti za RMS grešku su bile 0,015 za set za treniranje, 0,006 za set za validaciju i 0,005 za test set. Ove vrednosti ukazuju na to da je mreža na adekvatan način istrenirana i da je u stanju da predvidi pH vrednost rastvora esomeprazol-natrijuma.

Na Slici 44a je prikazana površina odgovora, generisana uz pomoć validirane neuronske mreže, dok Slika 44b prikazuje konturni dijagram. Površine su odabrane na osnovu specifikacijskih granica za pH medijuma: između pH 10,3 i pH 11,8.



Slika 44. Uticaj temperature polica liofilizatora i *holding* vremena na pH vrednost rastvora esomeprazol-natrijuma: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 44b prikazan je *design space*, odnosno granice temperature polica liofilizatora (-10 °C do -30 °C) pri kojim pH vrednost rastvora esomeprazol-natrijuma ostaje stabilna i u skladu sa specifikacijskim kriterijumima prihvatljivosti (pH 10,8-11,8), u toku definisanog vremena zadržavanja (*holding* vremena od 5-26 h).

4.3 Primena algoritma učenja za predviđanje profila stabilnosti esomeprazol praška

Kao što je već prethodno detaljno opisano, kritični korak procesa proizvodnje esomeprazol praška je period između procesa punjenja i liofilizacije, u kojem su sve bočice, delimično zatvorene, u potpunosti izložene uslovima okruženja u kojima se nalaze. Izuzetna nestabilnost se ogleda u variranju pH vrednosti rastvora, uzrokovanoj uticajem kiseonika. Ova nestabilnost dalje vodi ka mnogim problemima kao što su promene u sadržaju srodnih supstanci, što utiče na sadržaj esomeprazola, tokom roka upotrebe. Polazeći od pH vrednosti *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma (specifikacija: pH 10,8-11,8), koja opada različitom brzinom u zavisnosti od uslova okruženja kojima je izložena (temperatura prostora, sadržaj kiseonika, vreme trajanja izloženosti), otežana je kontrola i predviđanje pH vrednosti rastvora za liofilizirani proizvod na kraju procesa proizvodnje (specifikacija: pH 10,0-11,0) i posledično, kontrola pH vrednosti tokom definisanog roka upotrebe (36 meseci). Brzim padom pH vrednosti rastvora esomeprazol-natrijuma ugroženi su kvalitet i stabilnost proizvoda. Oba kriterijuma prihvatljivosti, pH *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma na kraju pripreme i pH rastvora rekonstituisanog gotovog proizvoda, su definisani u sklopu zahteva ICH vodiča za specifikacije lekovitih preparata za parenteralnu primenu, a limiti su podešeni u skladu sa literaturnim podacima za inovatorski lek, kao i na osnovu podataka sakupljenih tokom razvoja formulacije i rezultata studije stabilnosti (detaljnije u Tabeli 4.4). Posmatrajući degradacioni profil API i činjenicu da kombinacija alkalnog pH (koji odgovara specifikaciji rastvora esomeprazol-natrijuma) i temperature može uticati na pojavu brojnih nečistoća, a samim tim i na sadržaj esomeprazola, potrebno je izvršiti procenu svih dostupnih rezultata ispitivanja pH vrednosti, kako bi se pronašla korelacija između pH vrednosti finalnog rastvora i pH vrednosti finalnog proizvoda, pod svim uslovima čuvanja proizvoda.

Sa ciljem da se osigura kontrola pH vrednosti rastvora esomeprazol-natrijuma, koja posledično utiče na stabilnost leka, serije esomeprazola, proizvedene na isti način, su čuvane u delimično zatvorenim bočicama 3 h na temperaturi od 20 °C i temperaturi -30 °C, nakon čega su liofilizirane i postavljene na dugotrajno ispitivanje stabilnosti u trajanju od 36 meseci. Cilj ove studije je bio da se primeni algoritam dubokog učenja za predviđanje profila stabilnosti esomeprazola i da se odrede limiti pH vrednosti za rekonstituisani rastvor finalnog liofiliziranog proizvoda, koji će osigurati da se kvalitet proizvoda zadrži tokom perioda čuvanja od 36 meseci.

4.3.1 Ispitivanja sprovedena za esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju

Sa ciljem da se obezbedi najbolja moguća kontrola pH vrednosti rastvora, koja utiče na pH vrednost gotovog proizvoda, esomeprazol serije proizvedene na isti način su čuvane u delimično zatvorenim bočicama na sobnoj temperaturi (oko 20 °C) i na temperaturi koja odgovara koraku zamrzavanja programa liofilizacije (-30 °C). Ove dve temperature su izabrane kao jedina dva ekstremna slučaja koja su moguća da se dese tokom uspostavljenog procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, na osnovu uslova okruženja koji vladaju u proizvodnoj zoni. Nakon vremena čuvanja od maksimum 3 h na obe temperature, što odgovara vremenu potrebnom da se napuni celokupna veličina serije, započet je proces liofilizacije za sve ispitivane bočice.

Od svih proizvedenih serija, 5 čuvanih na temperaturi od 20 °C i 4 serije na temperaturi od -30 °C (Tabela 4.16), su odabrane da budu postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima dugotrajne studije stabilnosti (25 °C/60% RH) i intermedijarne studije stabilnosti (30 °C/75% RH), u dužini trajanja definisanog roka upotrebe proizvoda od 36 meseci.

Tabela 4.16. Pregled serija esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju koje su korišćene u predviđanju stabilnosti proizvoda

| Tip probe | Delimično zatvorene bočice nakon punjenja čuvane na temperaturi od 20 °C tokom maksimum 3 h pre započinjanja programa liofilizacije | Delimično zatvorene bočice nakon punjenja čuvane na temperaturi od -30 °C tokom maksimum 3 h pre započinjanja programa liofilizacije |
|--|--|--|
| Veličina serije | 67,98 L 33.000 bočica | 67,98 L 33.000 bočica |
| Ukupan broj serija | 115 | 17 |
| Dugotrajni uslovi ispitivanja studije stabilnosti (25 °C/60% RH) tokom roka upotrebe od 36 meseci* | Bočice 5 serija ukupno: serija 102:20C (25/60), serija 38:20C (25/60), serija 48:20C (25/60), serija 5:20C (25/60), serija 65:20C (25/60) | Bočice 4 serije ukupno: serija 15:-30C (25/60), serija 17:-30C (25/60), serija 2:-30C (25/60), serija 3:-30C (25/60) |
| Intermedijarni uslovi ispitivanja studije stabilnosti (30 °C/75% RH) tokom roka upotrebe od 36 meseci* | Nije primenjivo | Bočice 2 serije ukupno: serija 2:-30C (30/75), serija 3:-30C (30/75) |

* Napomena: bočice su tokom studije stabilnosti čuvane u originalnom pakovanju radi zaštite od svetlosti.

Uslovi čuvanja i učestalost testiranja su dati u Tabeli 4.17. Sadržaj esomeprazola, nečistoće i pH su testirani u svakoj vremenskoj tački tokom kondicioniranja.

Tabela 4.17. Uslovi čuvanja i učestalost testiranja esomeprazol proba

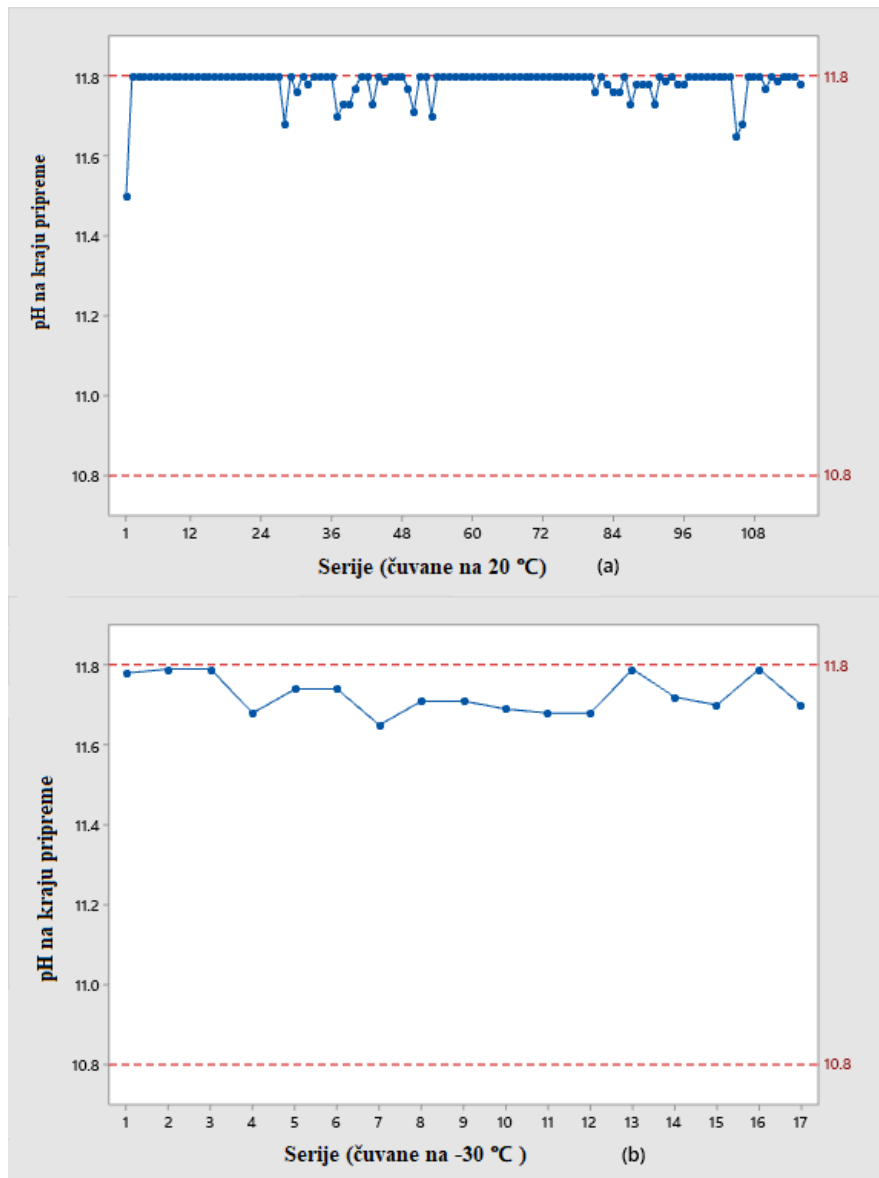
| Uslovi skladištenja | | Vremenske tačke za testiranje (meseci) |
|---------------------|----------------------|--|
| Dugotrajni | 25 ± 2 °C/60 ± 5% RH | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 |
| Intermedijarni | 30 ± 2 °C/75 ± 5% RH | 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 |

U okviru ove studije, rezultati ukupno 132 proizvedene serije su evaluirani (shema izvedenih ispitivanja je prikazana u Tabeli 4.16).

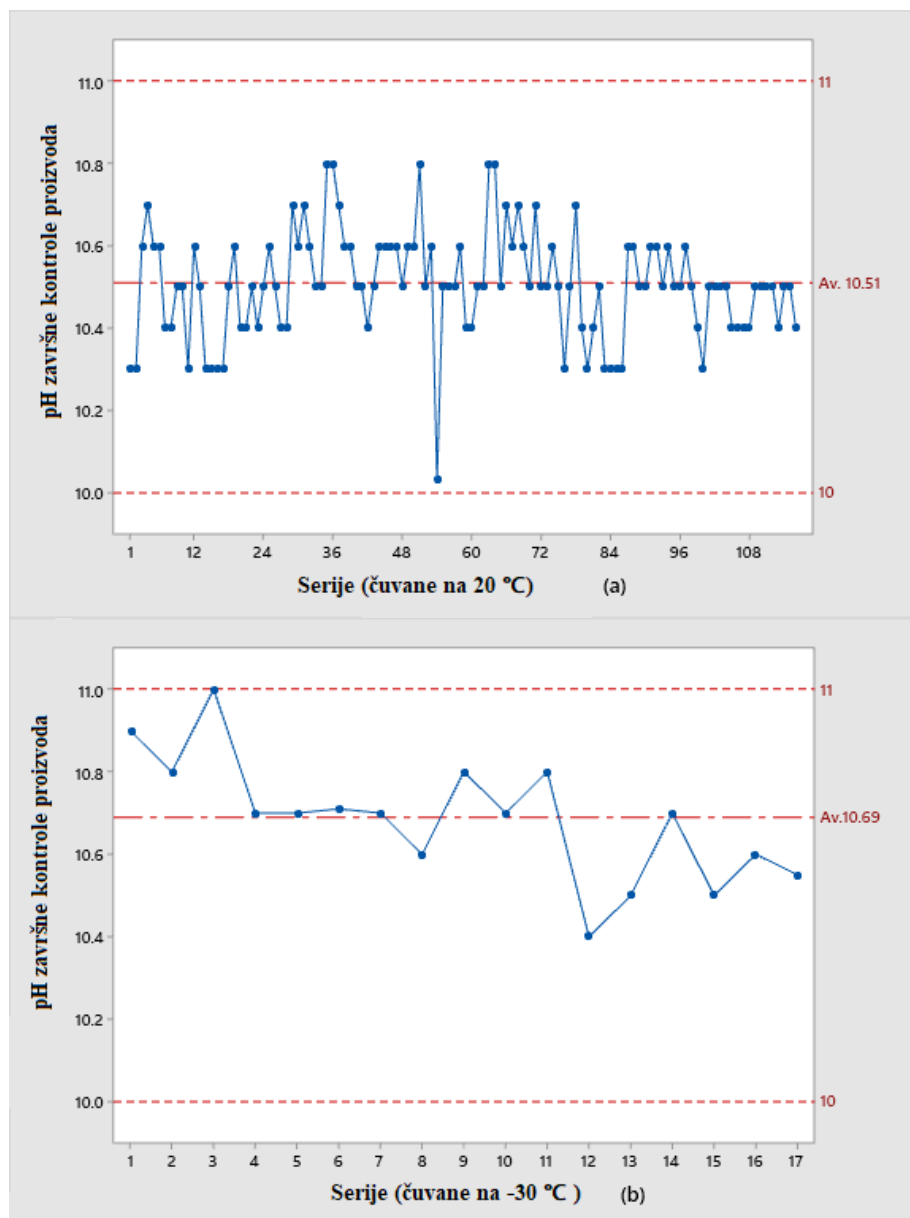
4.3.2 Analiza uticaja pH vrednosti na stabilnost lekovitog proizvoda

Vrednost pH za *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma je podešen tokom pripreme rastvora na vrednost definisanu specifikacijom (pH 10,8-11,8) i to dodavanjem odgovarajuće količine rastvora natrijum-hidroksida i ovo je jedini proizvodni korak u kojem se na pH vrednost rastvora može direktno uticati samim proizvodnim procesom. Izlaganje rastvora lekovitog proizvoda vazduhu povećava koncentraciju kiseonika u rastvoru i rezultuje brzim padom pH vrednosti. Kao što je već objašnjeno, ovo se prvenstveno dešava u rastvoru u delimično zatvorenim bočicama, od trenutka njihovog punjenja, do momenta početka procesa liofilizacije. Ovom nestabilnošću, pH vrednost finalnog proizvoda nakon rekonstitucije je takođe ugrožena i ne može biti lako kontrolisana (specifikacija: pH 10,0-11,0). Povećan sadržaj kiseonika u *bulk* rastvoru esomeprazol-natrijuma, ne samo da dovodi do brzog pada pH vrednosti i posledično do rezultata izvan specifikacije za ovaj in-procesni parametar, već takođe posledično pokreće oksidaciju API i dovodi do rezultata izvan specifikacijskih granica za srodne supstance i sadržaj esomeprazola.

Rezultati koji se odnose na pH vrednost *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma i pH vrednost gotovog proizvoda dobijeni za dve grupe ispitivanih proba (Tabela 4.16), su prikazani na Slikama 45 i 46, redom.



Slika 45. Poređenje rezultata ispitivanja pH vrednosti *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma za serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju: (a) čuvane na 20 °C; (b) čuvane na -30 °C.



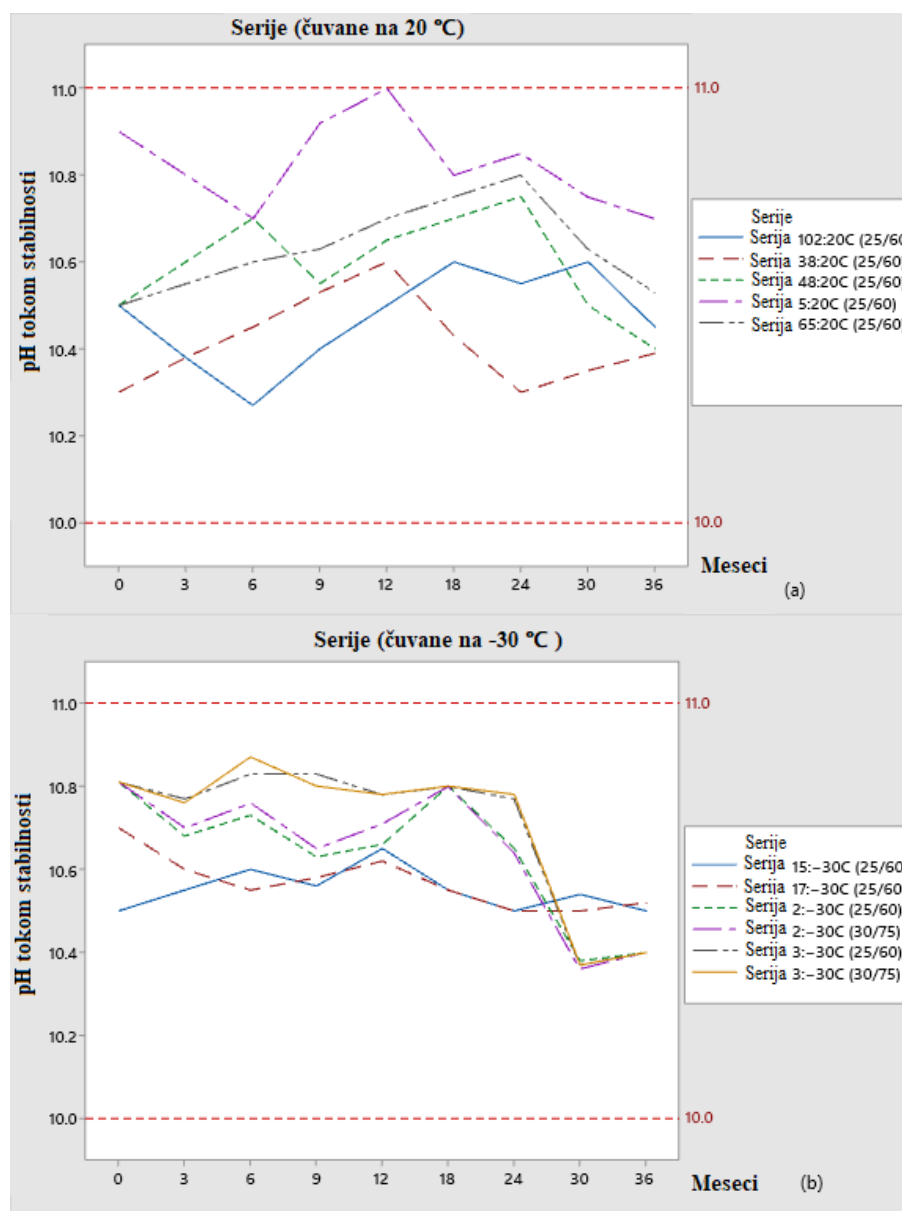
Slika 46. Poređenje rezultata ispitivanja pH vrednosti gotovog proizvoda za serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju: (a) čuvane na 20 °C; (b) čuvane na -30 °C.

Rezultati ispitivanja pH vrednosti gotovog proizvoda su više pomereni ka gornjem limitu specifikacijskih granica, za serije koje su čuvane na temperaturi od -30 °C (prosečna vrednost: pH 10,69), nego za serije čuvane na temperaturi od 20 °C (prosečna vrednost: pH 10,51). Ako se posmatraju pojedinačne vrednosti, prve tri serije koje su čuvane na temperaturi od -30 °C, pokazuju najviše vrednosti pH rastvora (pH 10,9, pH 10,8, pH 11,0, redom), dok ostale serije imaju uporedive rezultate sa serijama čuvanim na 20 °C. Interni kontrolni limiti, koji su korišćeni tokom pripreme rastvora za sve ispitivane serije, u jedinom koraku proizvodnje gde je pH pod uticajem dodatka rastvora natrijum-hidroksida, su podešeni da se suze limiti na opseg pH 11,8-11,6, kako bi se isključile interindividualne razlike između serija i tako sve ispitivane serije učinile mogućim za poređenje. Iako su sve serije imale jednaki početni opseg za pH vrednost *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma, analiziranjem svih predstavljenih rezultata zaključeno je da je veći pad pH vrednosti uočen za serije čije su delimično zatvorene bočice čuvane na temperaturi od 20 °C:

- pH pad za bočice čuvane na temperaturi od 20 °C je za 1,1-1,5 pH jedinicu;
- pH pad za bočice čuvane na temperaturi od -30 °C je za 0,8-1,2 pH jedinicu, što je u proseku za 0,3 pH jedinice manje nego za serije čuvane na 20 °C pre liofilizacije.

Pad pH vrednosti je posledica interakcije vazduha (kiseonika) sa rastvorom lekovite supstance. Vreme kontakta između kiseonika i rastvora je isto za serije izložene kiseoniku na temperaturi od 20 °C i od -30 °C, ali sa značajnom razlikom da rastvor u delimično zatvorenim bočicama izložen temperaturi zamrzavanja od -30 °C postaje momentalno inertan i kao takav otporan na sve dalje potencijalne uticaje, odnosno na uticaj kiseonika. To je razlog zbog kojeg ove serije imaju manji pad pH vrednosti.

Trend promene pH vrednosti rekonstituisanih rastvora gotovog proizvoda, dobijenih tokom ispitivanja stabilnosti za serije koje su čuvane na temperaturama od 20 °C (a) i -30 °C (b) je prikazan na Slici 47.



Slika 47. Poređenje rezultata ispitivanja pH vrednosti dobijenih tokom studija stabilnosti za serije: (a) čuvane na 20 °C; (b) čuvane na -30 °C.

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Poređenjem rezultata ispitivanja pH vrednosti rastvora gotovog proizvoda, dobijenih tokom roka

upotrebe serija čuvanih na 20 °C, uočene su značajne razlike između vremenskih tačaka u kojima je vršeno testiranje: pH se nalazila u opsegu pH 10,3-11,0. Sa druge strane, pH vrednost serija koje su čuvane na temperaturi od -30 °C nisu varirale značajno tokom roka upotrebe – opseg ovih pH vrednosti je bio pH 10,4-10,8, na oba uslova ispitivanja stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH). Stabilnija pH vrednost tokom roka upotrebe uočena je za serije koje imaju višu inicijalnu pH vrednost (za *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma, na kraju faze pripreme rastvora).

4.3.3 Pregled rezultata stabilnosti

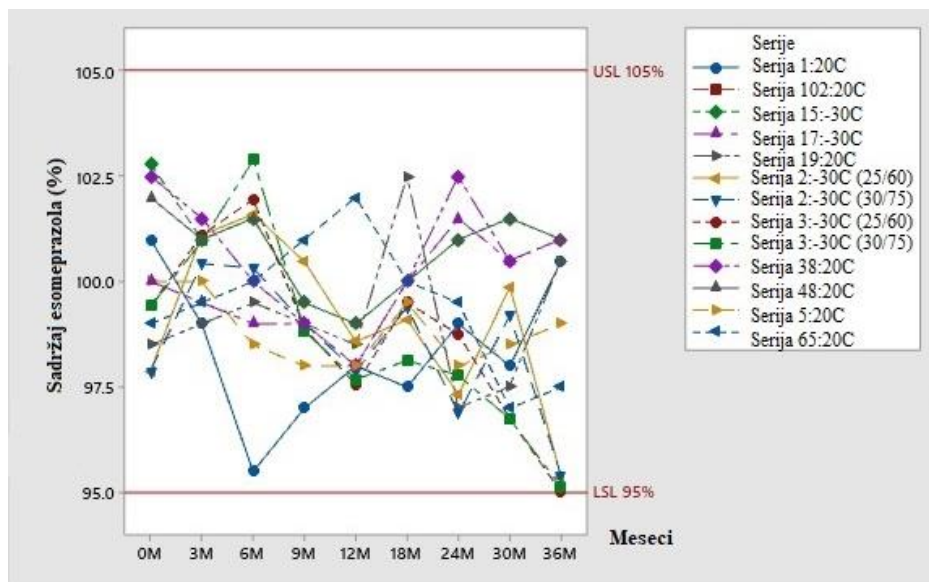
Tokom studija stabilnosti, sadržaj pet degradacionih proizvoda je bio iznad ICH limita za prijavljivanje tokom perioda skladištenja, zbog čega su i identifikovane. Ovi degradacioni proizvodi su:

- sulfonska nečistoća: omeprazol nečistoća D (Ph. Eur.);
- 4-hidroksi sulfonska nečistoća: omeprazol nečistoća I (Ph. Eur.);
- 4-hidroksi nečistoća: proizvod termalne degradacije esomeprazola;
- 4-hidroksi sulfidna nečistoća: proizvod hidrolize u alkalnom vodenom rastvoru (pH 10,5) 4-hidroksi esomeprazola;
- 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinska kiselina: proizvod hidrolize omeprazol nečistoće D.

4.3.3.1 Pregled rezultata ispitivanja sadržaja esomeprazola i srodnih supstanci dobijenih tokom studija stabilnosti

4.3.3.1.1 Rezultati ispitivanja sadržaja esomeprazola

Trend promene vrednosti sadržaja esomeprazola u gotovom proizvodu tokom studija stabilnosti, ispitivanog kod svih ispitivanih serija (Tabela 4.16), prikazan je na Slici 48:



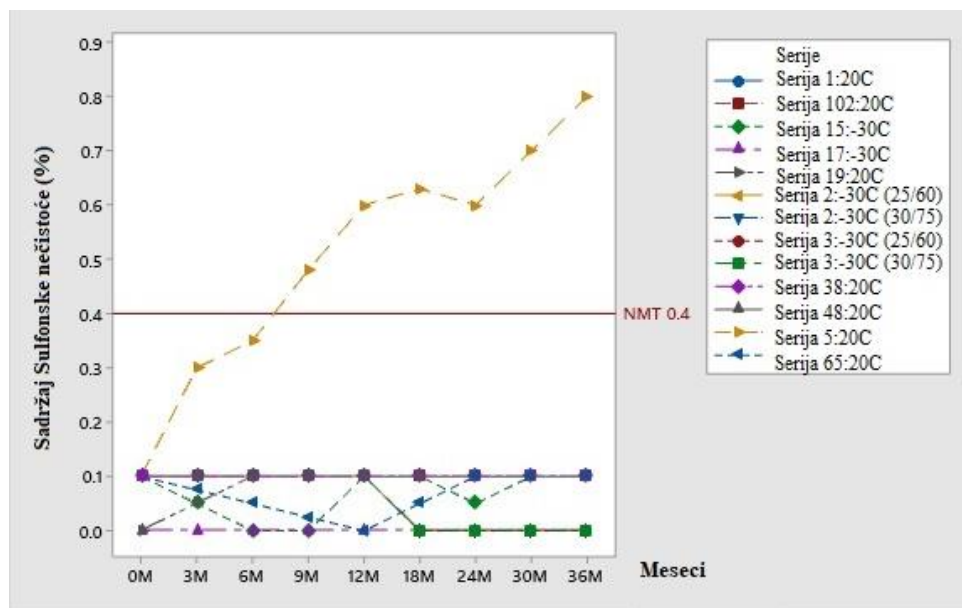
Slika 48. Trend promene vrednosti sadržaja esomeprazola u gotovom proizvodu, dobijenih tokom studija stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH i 30 °C/75% RH za serije čuvane na temperaturi od 20 °C i -30 °C

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Svi rezultati na oba uslova ispitivanja stabilnosti su u skladu sa specifikacijskim granicama. Rezultati za sadržaj esomeprazola u gotovom proizvodu tokom studija stabilnosti su se uglavnom kretali u opsegu 98-102%. Sadržaj esomeprazola nije varirao značajno tokom studija stabilnosti pri oba uslova ispitivanja (25 °C/60% RH i 30 °C/75% RH). Veće varijacije rezultata su uočene pod uslovima 30 °C/75%RH, ali su rezultati bili u okviru specifikacijskih granica.

4.3.3.1.2 Rezultati za ispitivanja sadržaja sulfonske nečistoće (Nečistoća D)

Trend promene vrednosti sadržaja sulfonske nečistoće je analiziran za sve serije (čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C), postavljene na studije stabilnosti pod uslovima 25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH, a rezultati su prikazani na Slici 49:



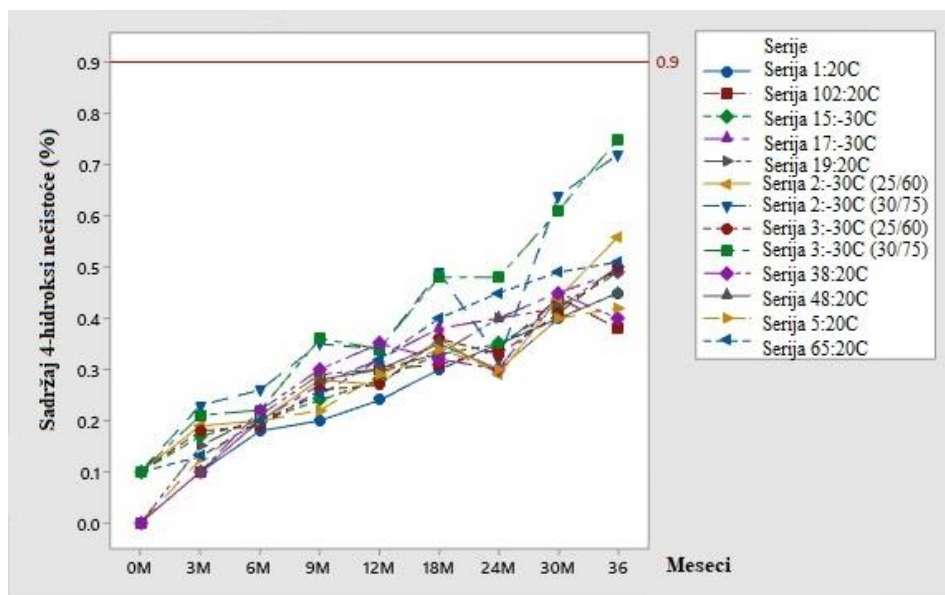
Slika 49. Trend promene vrednosti sadržaja sulfonske nečistoće tokom studija stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH) za serije čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Svi rezultati su u bili okviru specifikacijskih granica, izuzev za jednu seriju ispitivanu pri uslovima 25 °C/60%RH (serija broj 5, čuvana na 20 °C, ali proizvedena sa serijom API koja je imala visok nivo sulfonske nečistoće u ulaznoj kontroli, a koja je nastavila svoj rast tokom čuvanja). Sadržaj sulfonske nečistoće, sa izuzetkom serije broj 5:20 °C, ostao je na istom nivou za oba uslova ispitivanja stabilnosti (uglavnom sa sadržajem od 0,1%).

4.3.3.1.3 Rezultati za ispitivanja sadržaja 4-hidroksi nečistoće

Trend promene vrednosti sadržaja 4-hidroksi nečistoće je analiziran za sve serije (čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C), postavljene na studije stabilnosti pod uslovima 25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH, a rezultati su prikazani na Slici 50:



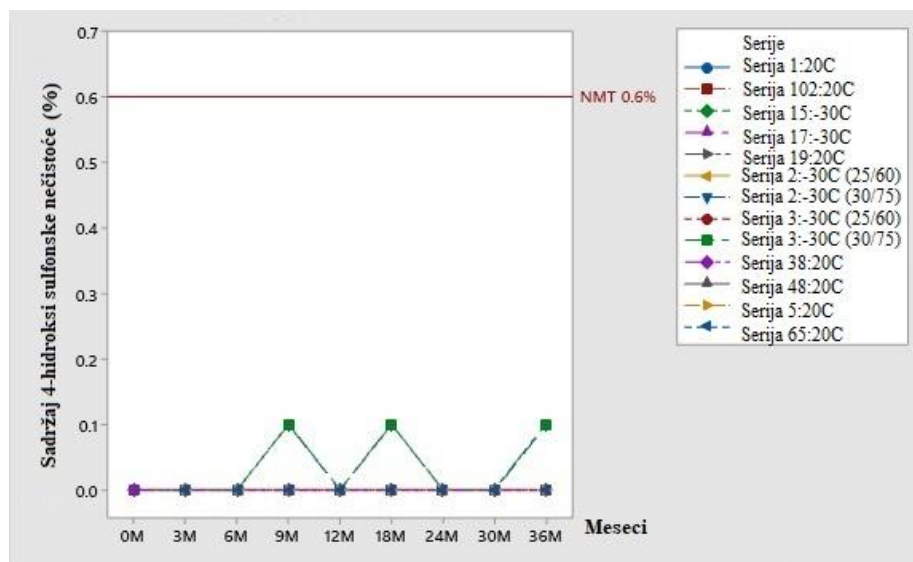
Slika 50. Trend promene vrednosti sadržaja 4-hidroksi nečistoće tokom studija stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH) za serije čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Sadržaj 4-hidroksi nečistoće je pokazao trend konstantnog rasta tokom studije stabilnosti pri oba uslova ispitivanja. Ukoliko se posmatraju serije koje su postavljene na studiju stabilnosti pri oba uslova (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH), nisu uočene razlike u vrednostima sadržaja na različitim uslovima čuvanja. Na kraju roka upotrebe za sve serije sadržaj ove nečistoće je oko 0,5% - što je značajno niže od propisane specifikacijske granice (najviše 0,9%).

4.3.3.1.4 Rezultati za ispitivanja sadržaja 4-hidroksi sulfonske nečistoće

Rezultati dobijeni za ispitivanje sadržaja 4-hidroksi sulfonske nečistoće tokom studija stabilnosti za sve ispitivane serije su bili oko 0%, ili nečistoća nije bila detektovana (specifikacijom je propisano: najviše 0,6%) i prikazani su na Slici 51:

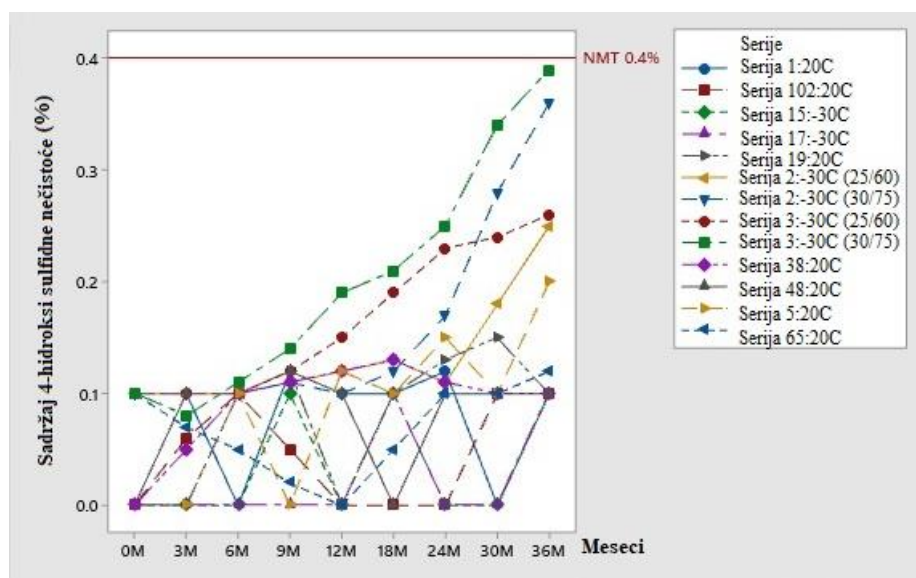


Slika 51. Trend promene vrednosti sadržaja 4-hidroksi sulfonske nečistoće tokom studija stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH) za serije čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

4.3.3.1.5 Rezultati za ispitivanja sadržaja 4-hidroksi sulfidne nečistoće

Trend rezultata dobijenih za ispitivanje sadržaja 4-hidroksi sulfidne nečistoće tokom studija stabilnosti je prikazan na Slici 52:



Slika 52. Trend promene vrednosti sadržaja 4-hidroksi sulfidne nečistoće tokom studija stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH) za serije čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C

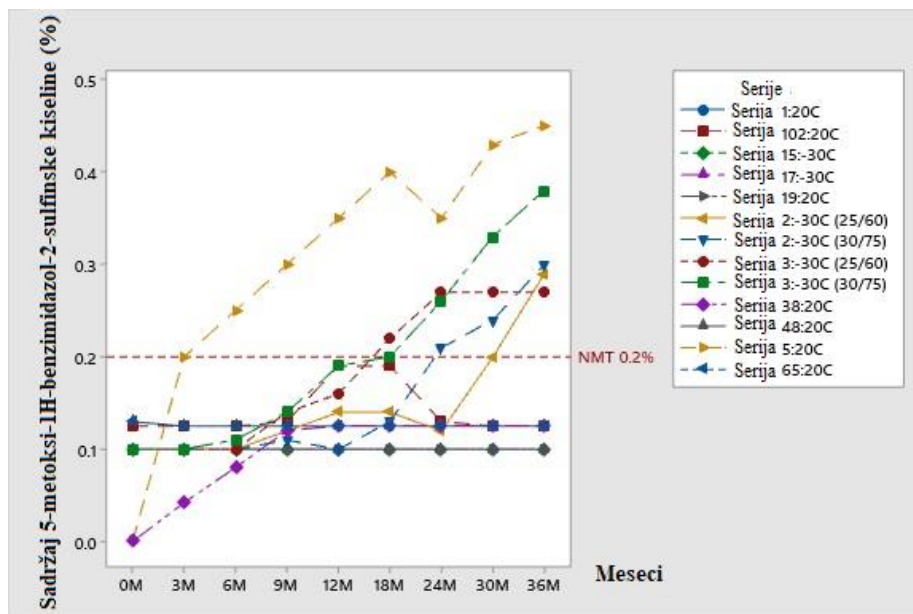
Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Sadržaj 4-hidroksi sulfidne nečistoće za većinu analiziranih serija je bio na istom nivou tokom roka upotrebe – oko 0,1%. Porast sadržaja ove nečistoće može biti uočen na oba uslova kondicioniranja za

serije broj 2 i broj 3, koje su čuvane na temperaturi od -30 °C pre liofilizacije. Ipak, svi rezultati su u okviru specifikacijskih granica (najviše 0,4%).

4.3.3.1.6 Rezultati za ispitivanja sadržaja 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline

Trend rezultata određivanja sadržaja dobijenih za ovu nečistoću za sve serije (čuvane na 20 °C i -30 °C, pre liofilizacije) prikazan je na Slici 53.



Slika 53. Trend promene vrednosti sadržaja 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline tokom studija stabilnosti (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH) za serije čuvane na temperaturama od 20 °C i -30 °C

Legenda: serije čuvane na temperaturi od 20 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 102:20C (25/60), 38:20C (25/60), 48:20C (25/60), 5:20C (25/60) i 65:20C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 25 °C/60% RH: 15:-30C (25/60), 17:-30C (25/60), 2:-30C (25/60) i 3:-30C (25/60); serije čuvane na temperaturi od -30 °C, postavljene na studiju stabilnosti pri uslovima 30 °C/75% RH: 2:-30C (30/75) i 3:-30C (30/75).

Rezultati za većinu serija koje su čuvane na 20 °C i -30 °C pre liofilizacije su u okviru specifikacijskih granica, izuzev za seriju broj 5 (čuvanu na 20 °C), serije broj 2 i broj 3 (čuvane na -30 °C) na oba uslova kondicioniranja (25 °C/60%RH i 30 °C/75%RH). Poređenjem rezultata za seriju broj 2 na različitim uslovima ispitivanja stabilnosti, može se uočiti da je sadržaj ove nečistoće veći pri ekstremnijim uslovima čuvanja koji odgovaraju 30 °C/75%RH. Pri uslovima 25 °C/60%RH za većinu serija, vrednosti sadržaja 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline ostaju do oko 0,1%.

Posmatrajući rezultate dobijene na različitim uslovima kondicioniranja serija, moglo bi se pretpostaviti da temperatura ima uticaj na formiranje 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline. Ovo je verovatno povezano sa uticajem na formiranje prekursora ove nečistoće, nečistoće D, i mnogo izraženije hidrolize na višim temperaturama. Pad sadržaja nečistoće D nakon 12 meseci kondicioniranja za serije broj 2:-30 °C i broj 3:-30 °C je takođe uočen i najverovatnije je povezan sa degradacijom nečistoće D u 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinsku kiselinu, imajući u vidu da od ove vremenske tačke počinje rast pomenute nečistoće.

Serije sa većim vrednostima sadržaja 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline su imale više vrednosti pH u završnoj kontroli rekonstituisanog proizvoda (Slika 46), kao što je to slučaj za seriju broj 2:-30 °C, seriju broj 3:-30 °C i seriju broj 5:20 °C, što ukazuje na to da pH vrednost može imati uticaj na sadržaj ove nečistoće, a samim tim i na kvalitet proizvoda. Ovo su takođe serije kod kojih

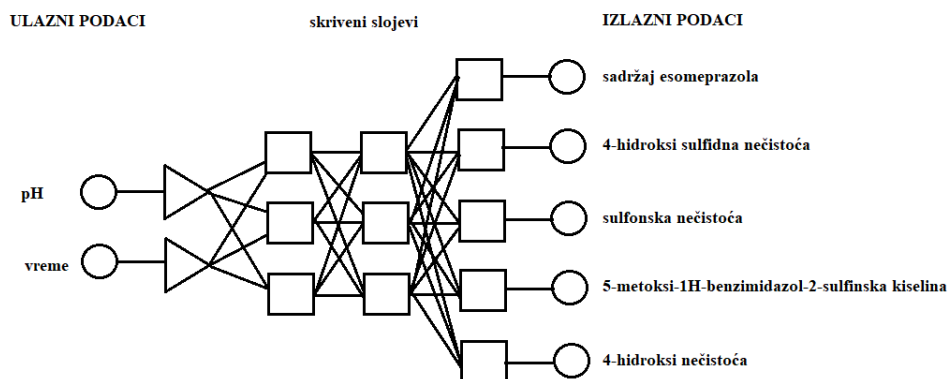
je pH vrednost *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma na kraju pripreme na gornjem limitu specifikacijske granice (oko pH 11,8 - Slika 45). Ova pretpostavka je dodatno potvrđena poređenjem ovih rezultata sa onim dobijenim za seriju broj 15: -30 °C. Ova serija je proizvedena sa istom serijom API kao i serije broj 2:-30 °C i broj 3:-30 °C, čuvane su na istoj temperaturi, ali sa nižom pH vrednošću zabeleženom u završnoj kontroli (pH 10,5), te je tokom roka upotrebe sadržaj 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline bio samo 0,1% (Slika 53). Zbog toga, može se zaključiti da je formiranje 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline izraženije na višim pH vrednostima rastvora gotovog proizvoda. Na osnovu svih raspoloživih rezultata, rezultat pH vrednosti u završnoj kontroli rekonstituisanog rastvora od pH 10,8 i više, je okidač za promene u rezultatima za srodne supstance.

Razlike između serija sa višim rezultatima sadržaja 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline (serije čuvane na -30 °C, broj 2:-30 °C i broj 3:-30 °C) i one koje su čuvane na temperaturi od 20 °C, odnosno na nižoj temperaturi, bi mogle samo da pogoduju stabilnosti API, čineći rastvor inertnim i sprečavajući dalju degradaciju u nečistoću D ili 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinsku kiselinu. Ipak, ove serije, sa mnogo stabilnijom pH vrednošću tokom roka upotrebe, imaju i manje smanjenje pH vrednosti. Ovo ponovo potvrđuje uzrok rezultata izvan specifikacijskih granica za 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinsku kiselinu – višu pH vrednost gotovog proizvoda.

Uzimajući u obzir kombinaciju alkalnog pH i uticaja temperature na nastanak 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline, evaluacija svih raspoloživih rezultata pH vrednosti koji se odnose na pH vrednost *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma i pH vrednost rekonstituisanog rastvora gotovog proizvoda, za sve raspoložive proizvedene serije iz oba seta proba je izvedena. Evaluacija raspoloživih rezultata je izvršena kako bi se pronašla korelacija između pH vrednosti finalnog rastvora esomeprazol-natrijuma i pH vrednosti gotovog proizvoda u završnoj kontroli. Cilj je bio da se identifikuje *design space* koji opisuju interni kontrolni limiti pH rekonstituisanog proizvoda u završnoj kontroli koji će održati sadržaj 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline, ali i svih ostalih srodnih supstanci, uključujući i sadržaj esomeprazola, u okviru specifikacijskih granica za definisani rok upotrebe proizvoda od 36 meseci.

4.3.4 Izgradnja i primenu veštačke neuronske mreže u predviđanju sadržaja esomeprazola i profila nečistoća u zavisnosti od pH i vremena trajanja kondicioniranja

Sa ciljem da se definiše model veštačke neuronske mreže koji će biti u stanju da predvidi sadržaj esomeprazola i profil nečistoća u zavisnosti od pH vrednosti gotovog proizvoda, za 36 meseci kondicioniranja, kao i da se odrede pH limiti koji će osigurati kvalitet finalnog proizvoda tokom celokupnog perioda čuvanja, MLP mreža sa četiri sloja (2-3-3-5) je istrenirana uz korišćenje algoritma *back-propagation* (Slika 54).

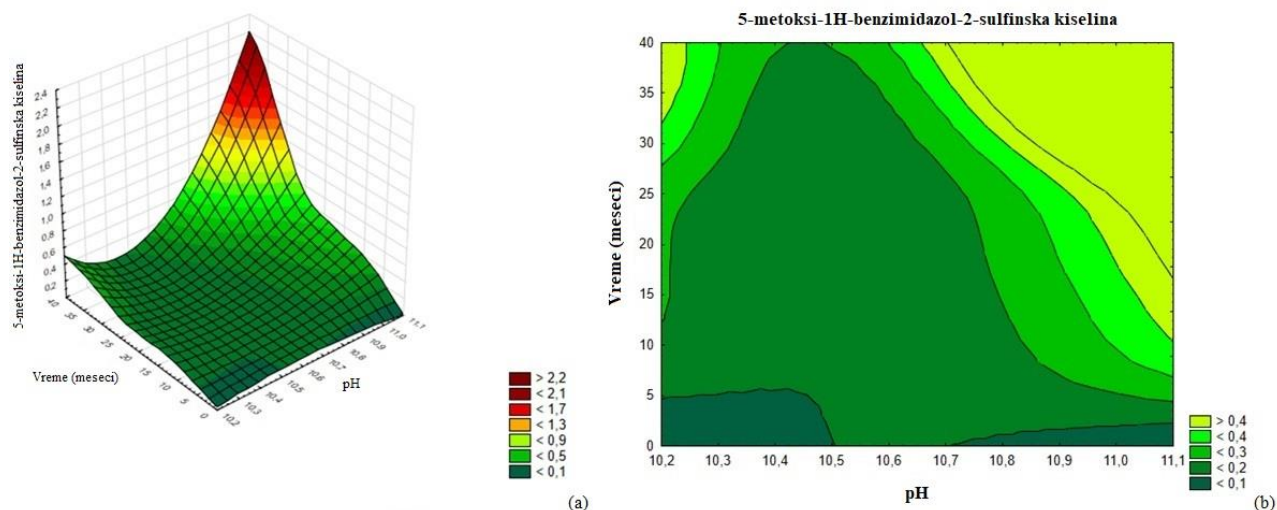


Slika 54. Četvoroslojna MLP mrežna arhitektura koja je korišćena za predviđanje stabilnosti esomeprazola u gotovom proizvodu tokom roka upotrebe od 36 meseci

Dva ulazna sloja odgovaraju pH vrednosti rekonstituisanog proizvoda i vremenu trajanja kondicioniranja (u mesecima). Izlazni podaci su sadržaj esomeprazola i četiri glavne nečistoće. Set podataka, koji se sastoji od 81 probe, je podeljen na treniranje, validaciju i set za testiranje (64:14:4). Mreža je istrenirana kroz 10.000 epoha. Nakon treniranja, RMS greške za trening, validaciju i test set su bile 0,025, 0,038 i 0,013, redom, što odgovara uspešnom predviđanju rezultata stabilnosti.

Granice pH vrednosti gotovog proizvoda koje će stabilizovati esomeprazol prašak u pogledu rezultata srodnih supstanci i sadržaja esomeprazola u okviru specifikacijskih granica tokom čitavog roka upotrebe od 36 meseci, su definisane uz pomoć *design space*, dobijenog na osnovu sakupljenih podataka.

Slika 55a prikazuje površinu odgovora, generisanu uz pomoć validirane neuronske mreže, dok Slika 55b prikazuje konturni dijagram. Konture su selektovane na osnovu specifikacijskih granica za 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinsku kiselinu od $\leq 0,2\%$.

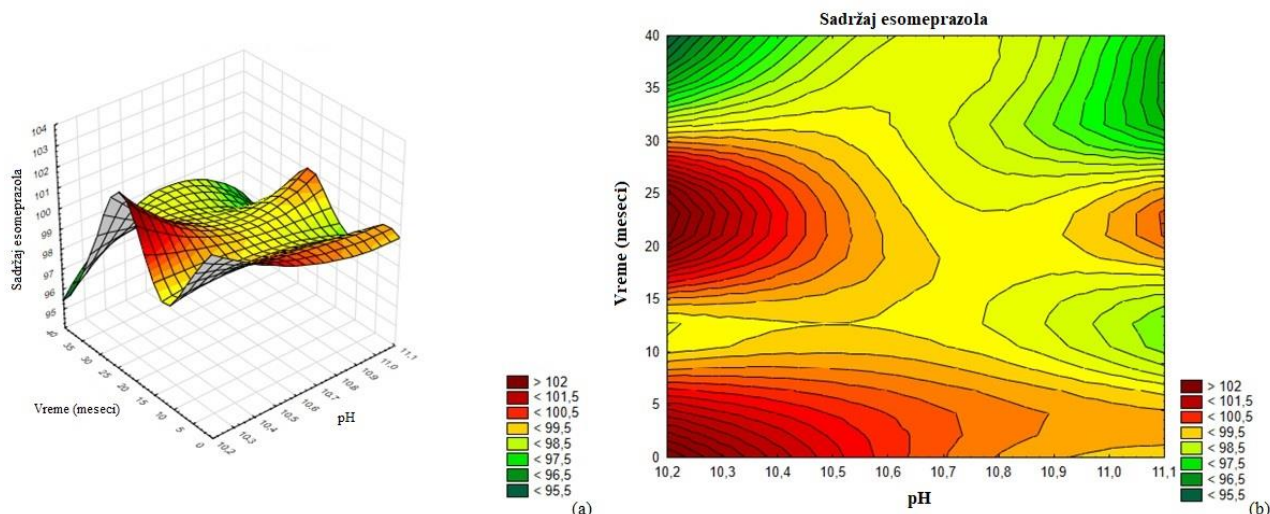


Slika 55. Uticaj pH vrednosti i vremena trajanja ispitivanja stabilnosti na sadržaj 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 55b je prikazan *design space*, odnosno granice pH vrednosti finalnog proizvoda (pH 10,4-10,6), u kojima sadržaj 5-metoksi-1H-benzimidazol-2-sulfinske kiseline ostaje stabilan i u okviru propisanih specifikacijskih granica ($\leq 0,2\%$) za definisani rok upotrebe od 36 meseci.

Na Slici 56a je prikazana površina odgovora, generisana na osnovu validirane neuronske mreže, dok

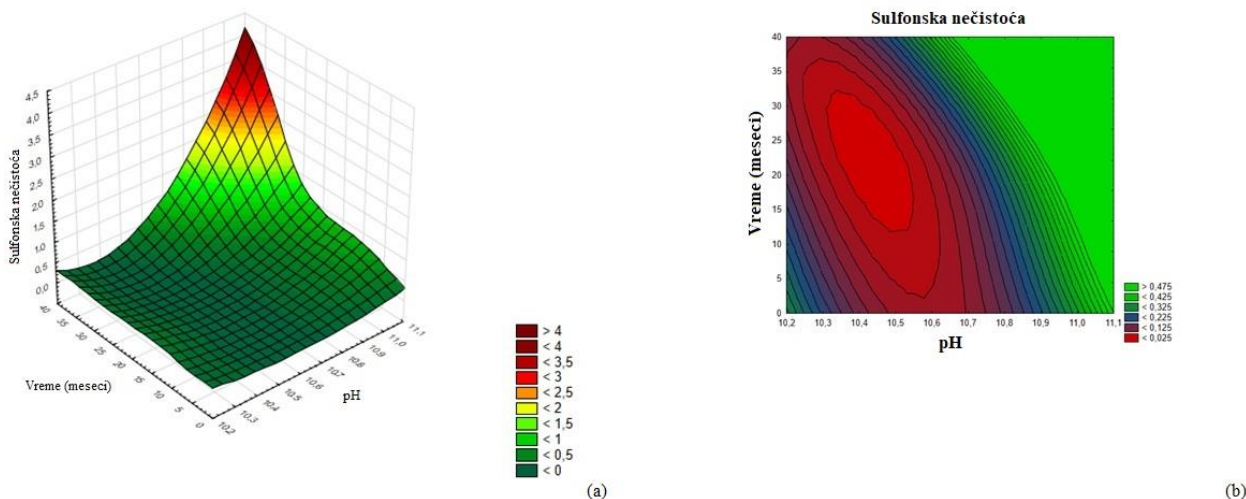
je na Slici 56b predstavljen konturni dijagram. Konture su odabrane na osnovu specifikacijskih granica za sadržaj esomeprazola od 95-105%.



Slika 56. Uticaj pH vrednosti rastvora esomeprazol-natrijuma i vremena trajanja ispitivanja stabilnosti na sadržaj esomeprazola: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 56b je prikazan *design space*, odnosno granice pH vrednosti finalnog proizvoda (pH 10,2-11,0) u kojima sadržaj esomeprazola ostaje stabilan i u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti za definisani rok upotrebe od 36 meseci.

Na Slici 57a je prikazana površina odgovora, generisana na osnovu validirane neuronske mreže, dok je na Slici 57b predstavljen konturni dijagram. Konture su odabrane na osnovu specifikacijskih granica za sadržaj sulfonske nečistoće: $\leq 0,4\%$.

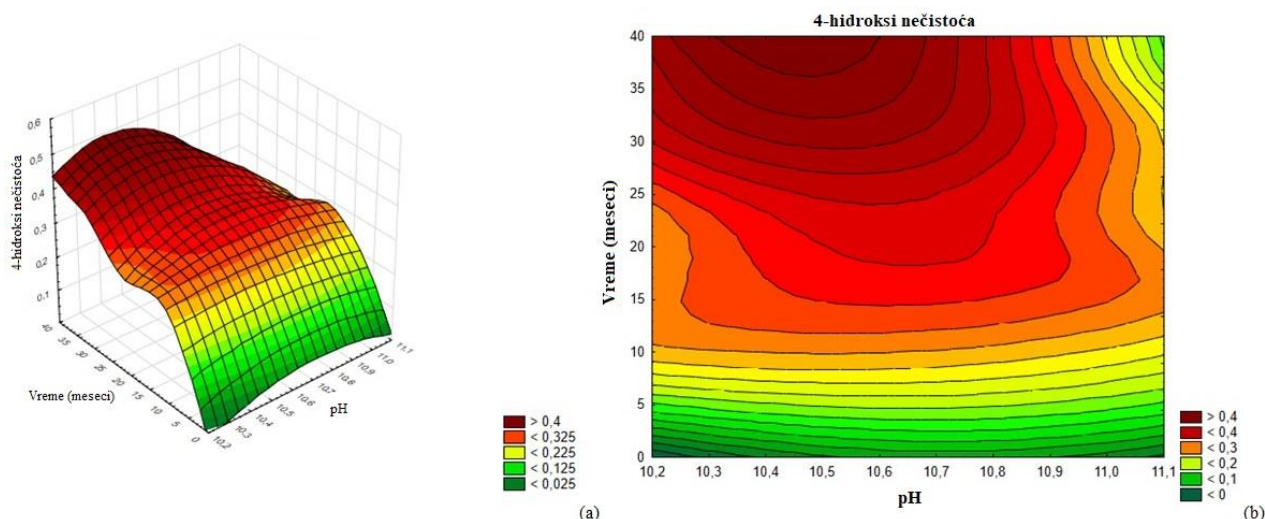


Slika 57. Uticaj pH vrednosti i vremena trajanja ispitivanja stabilnosti na sadržaj sulfonske nečistoće: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 57b je prikazan *design space*, odnosno granice pH vrednosti finalnog proizvoda (pH 10,2-10,6) u kojima sadržaj sulfonske nečistoće ostaje stabilan i u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti za definisani rok upotrebe od 36 meseci.

Na Slici 58a je prikazana površina odgovora, generisana na osnovu validirane neuronske mreže, dok je na Slici 58b predstavljen konturni dijagram. Konture su odabrane na osnovu specifikacijskih granica za sadržaj 4-hidroksi nečistoće: $\leq 0,9\%$. Sve prikazane površine su *design space* za sadržaj 4-hidroksi nečistoće i predstavljaju limite pH i definisanog roka upotrebe od 36 meseci u okviru kojih

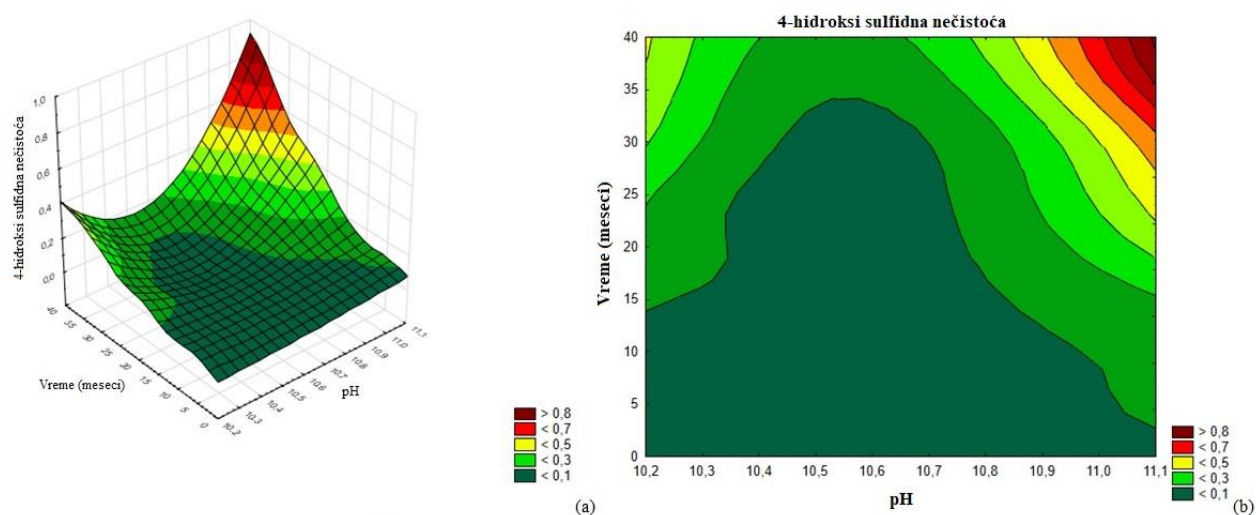
nivoi ove nečistoće ostaju u skladu sa specifikacijskim granicama.



Slika 58. Uticaj pH vrednosti i vremena trajanja ispitivanja stabilnosti na sadržaj 4-hidroksi nečistoće: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 58b je prikazan *design space*, odnosno granice pH vrednost finalnog proizvoda (pH 10,3-11,1) u kojima sadržaj 4-hidroksi nečistoće ostaje stabilan i u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti za definisani rok upotrebe od 36 meseci.

Na Slici 59a je prikazana površina odgovora, generisana na osnovu validirane neuronske mreže, dok je na Slici 59b prikazan konturni dijagram. Konture su odabrane na osnovu specifikacijskih granica za sadržaj 4-hidroksi sulfidne nečistoće: $\leq 0,4\%$.



Slika 59. Uticaj pH vrednosti i vremena trajanja ispitivanja stabilnosti na sadržaj 4-hidroksi sulfidne nečistoće: a) površina odgovora; b) konturni dijagram

Na osnovu dobijenih rezultata, na Slici 59b je prikazan *design space*, odnosno granice pH vrednosti finalnog proizvoda (pH 10,35-10,73) u kojima sadržaj 4-hidroksi sulfidne nečistoće ostaje stabilan i u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti za definisani rok upotrebe od 36 meseci.

5.0 Zaključak

Sa ciljem da se izvrši optimizacija procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg postupkom liofilizacije koji će osigurati kvalitet leka uvećane serije tokom roka upotrebe, definisani su svi kritični parametri celokupnog procesa proizvodnje. Kritični parametri procesa koji mogu uticati na kritične attribute kvaliteta praška za rastvor za injekciju/infuziju i njihov uticaj, procenjivani su primenom različitih tehnika analize rizika. Eksperimentalni rad je izveden u tri faze i zaključci svake od faza su posebno prikazani u nastavku.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada sprovedena je karakterizacija nečistoća koje potiču od puta sinteze API i onih koje se svrstavaju u proizvode degradacije, studija stabilnosti za ispitivanje R-enantiomera API esomeprazol-natrijum, formalna studija stabilnosti, ispitivanje uticaja svetlosti na stabilnost proizvoda i ispitivanje stabilnosti rekonstituisanog proizvoda (*in-use* perioda). Dobijeni rezultati su iskorišćeni da se detaljno definiše specifikacija gotovog proizvoda, kao i njegovi uslovi čuvanja i rok upotrebe. Poređeni su fizičko-hemijski i mikrobiološki rezultati dve veličine serija gotovog proizvoda (*scale-up* sa 17.000 na 33.000 bočica), sa ciljem da se ukaže na CQA esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju. Na osnovu rezultata iz ove faze, definisani su faktori formulacije, kritični proizvodni koraci i kritični delovi opreme/sistema koji imaju najveći uticaj na mogućnost dobijanja stabilnog gotovog proizvoda uvećane serije. Uzimajući u obzir sve faktore koji mogu uticati na kvalitet liofiliziranog leka, kontrola pH vrednosti rastvora je bila glavni cilj optimizacije procesa proizvodnje esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju. U cilju dobijanja stabilne pH vrednosti rastvora, uvedeno je direktno zamrzavanje (korak pre-zamrzavanja), kako bi se rastvor učinio inertnim i time sprečio pad pH vrednosti, a rastvor esomeprazola stabilizovao. Ispitane su fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike međuproizvoda i gotovog proizvoda za uvećane serije kod kojih je varirana temperatura kojoj su izložene napunjene bočice nakon punjenja i pre početka programa liofilizacije od 20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C, sa ciljem da se odabere najbolja temperatura koraka pre-zamrzavanja.

U prvoj fazi istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Tokom studije stabilnosti izvedenoj na proizvodu koji je bio predmet ove doktorske disertacije, zabeleženo je pet potencijalnih degradacionih proizvoda esomeprazola (sulfonska nečistoća, 4-hidroksi sulfonska nečistoća, 4-hidroksi nečistoća, 4-hidroksi sulfidna nečistoća i N-metil izomeri). Kriterijumi prihvatljivosti za proizvode degradacije u esomeprazol prašku za rastvor za injekciju/infuziju utvrđeni su uzimajući u obzir kriterijume prihvatljivosti nečistoća u polaznoj API, njihovo povećanje tokom studija stabilnosti leka u razvojnoj fazi i originatorskom proizvodu, kao i predloženi rok upotrebe i preporučene uslove skladištenja za ispitivani proizvod.
- Rezultati studije ispitivanja R-enantiomera su pokazali da R-enantiomer nije degradacioni proizvod u predloženoj formulaciji pod uticajem temperature. Ipak, rezultati ispitivanja fotostabilnosti su ukazali na to da je R-enantiomer formiran u uzorcima koji su bili direktno izloženi svetlosti, zbog čega je potrebno proizvod čuvati zaštićen od svetlosti u originalnom pakovanju. Na osnovu ovih rezultata i preporučenih uslova kondicioniranja, ispitivanje optičke čistoće je isključeno iz specifikacije gotovog proizvoda.
- Za sve serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju ispitane u okviru formalne studije stabilnosti (kondicionirane pri uslovima 25°C/60% RH, 30°C/65%RH, 30°C/75%RH i 40°C/75%RH), rezultati u tačkama ispitivanja – inicijalno, nakon 3, 6, 9, 12, 18, 24 i 36 meseci su bili u okviru specifikacijskih granica.
- Poređenjem svih dostupnih rezultata iz sprovedenih ispitivanja, ustanovljeno je da je pH vrednost za serije koje se čuvaju na temperaturi od -30°C viši i stabilniji, u poređenju sa serijama koje se čuvaju na temperaturi 20°C. Ova razlika je rezultat različite izloženosti rastvora proizvoda kiseoniku nakon punjenja, a pre liofilizacije, što proizilazi iz efekta da, čak

i izložene u istom vremenskom trajanju, serije čuvane na -30 °C odmah postaju inertne i neosetljive na sve potencijalne dalje uticaje. Prethodno zamrzavanje na temperaturi koja odgovara onoj u prvom koraku programa liofilizacije (zamrzavanje, temperatura od -30 °C), dovoljna je da obezbedi direktno zamrzavanje rastvora u svim bočicama, čime sprečava smanjenje pH vrednosti usled izlaganja rastvora kiseoniku. Ovim se osigurava da je kvalitet rastvora u napunjenim bočicama i do samog kraja proizvodnog procesa isti kao i za finalni *bulk* rastvor esomeprazol-natrijuma na kraju pripreme. Vreme držanja bočica u fazi punjenja produženo na ovaj način je dovoljno za *scale-up* do skoro dvostruko veće veličine serije. Osim toga, dokazano je da uvođenje koraka pre-zamrzavanja ne menja nikakva svojstva procesa liofilizacije, niti bilo koju drugu fazu proizvodnje u prethodno uspostavljenom proizvodnom procesu, imajući u vidu da je reč o temperaturi zamrzavanja API, korišćenoj u prvom koraku procesa liofilizacije – fazi zamrzavanja. Rezultati dobijeni na ovaj način potvrđuju da definisani parametri procesa i ispitivanje u toku procesa, zajedno sa korakom pre-zamrzavanja, obezbeđuju pouzdanu i ponovljivu proizvodnju esomeprazola praška za rastvor za injekciju/infuziju, ispunjavajući sve unapred definisane attribute kvaliteta i specifikacije za finalni proizvod.

U drugoj fazi, *Quality by design* koncept u optimizaciji procesa liofilizacije u proizvodnji uvećane serije esomeprazol praška za rastvor za injekciju/infuziju, 40 mg je primenjen. Na osnovu znanja o proizvodu i procesu proizvodnje, analiza rizika za esomeprazol prašak za injekcije je sprovedena pomoću alata FMEA. Polazeći od ciljanog profila kvaliteta proizvoda, definisani su CQA, CMA i CPP koji mogu uticati na proces i proizvod. Za sve uzorke napunjenih bočica, uskladištenih na različitim temperaturama polica liofilizatora (20 °C, -5 °C, -15 °C, -30 °C), CQA (pH, sadržaj esomperzola i srodne supstance), su praćeni za rastvor u delimično zatvorenim bočicama čuvanim na policama liofilizatora unutar unapred definisanih vremenskih tačaka (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h). Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona je istrenirana korišćenjem rezultata 32 eksperimentalne probe (dobijenih promenom temperature police i vremena čuvanja) i odabrana je mreža koja najbolje opisuje uticaj ovih ulaznih promenljivih na pH vrednost rastvora (koji je bio izlaz mreže). Na ovaj način je definisan *design space* procesa liofilizacije, koji opisuju granice temperature police liofilizatora, u kojima pH rastvora esomeprazola ostaje stabilan za definisano vreme čuvanja napunjenih delimično zatvorenih bočica, od momenta punjenja do momenta početka liofilizacije.

Zaključci druge faze eksperimentalnog rada su sledeći:

- U drugoj fazi istraživanja, na osnovu znanja o proizvodu i procesu proizvodnje iz prve faze istraživanja, primenom QbD koncepta, u okviru FMEA analize rizika definisani su svi CQA sa najvećim RPN skorom. Temperatura (sobna temperatura, temperatura police, temperatura zamrzavanja) kojoj je proizvod izložen, kao i vremensko trajanje ove izloženosti (vreme zadržavanja), korelirani su kao kritični parametri procesa sa promenama pH vrednosti rastvora kao CQA, uz sadržaj esomeprazola i srodne supstance, te su dalje razmatrani i korišćeni kao ulazni podaci za definisanje *design space*-a. Veštačka neuronska mreža sa višeslojnim perceptronom (MLP) je obučena korišćenjem rezultata 32 eksperimentalne probe iz prve faze. Mreža koja je najbolje opisala uticaj ovih ulaznih promenljivih na pH vrednost rastvora je odabrana, a na osnovu rezultata definisan je *design space* za liofilizaciju uvećanih serija.
- Na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka, *design space* opisan granicama temperature police liofilizatora (-10 °C do -30 °C) i *holding* vremenom (5 - 26 h) u kojima pH vrednost rastvora esomeprazol-natrijuma ostaje stabilna i u skladu sa propisanim specifikacijskim granicama od pH 10,8 do 11,8.
- Izuzev činjenice da je dobijen mnogo stabilniji proizvod, prednosti ove optimizacije procesa proizvodnje su takođe sledeći:
uvećana veličina serije pruža novčano isplativiju liofilizaciju i time redukuje cenu koštanja proizvoda i povećava konkurentnost na tržištu;

optimizacija kapaciteta liofilizatora i posledično povećanje broja proizvedenih serija bez investicija u novu opremu.

U trećoj fazi istraživanja, za sve proizvedene serije iz prve faze, izvršena je detaljna analiza rezultata koji se odnose na pH vrednosti *bulk* rastvora esomeprazol-natrijuma, pH vrednosti gotovog proizvoda i pH vrednosti rastvora određenih tokom studije stabilnosti, kao i ispitivanje korelacije pH vrednosti rastvora sa rezultatima ostalih CQA (sadržaj esomeprazola i srodne supstance), zabeleženih tokom ispitivanja stabilnosti. Primenjen je algoritam dubokog učenja za predviđanje profila stabilnosti esomeprazola u liofiliziranom proizvodu i određene su granice pH vrednosti za rekonstituisani rastvor finalnog proizvoda koje bi osigurale željeni profil kvaliteta tokom 36 meseci. Analiza je sprovedena primenom MLP veštačke neuronske mreže sa četiri sloja neurona, u kojoj su pH vrednost rastvora esomeprazola i vreme skladištenja u mesecima bili ulazi za mrežu, dok su sadržaj esomeprazola i četiri glavne nečistoće bili izlazi mreže. Krajnji rezultat je bio *design space* procesa liofilizacije koji opisuju granice pH gotovog proizvoda i definisani rok upotrebe od 36 meseci, u kojem nivou svih srodnih supstanci i sadržaja esomeprazola ostaju u skladu sa specifikacijskim granicama tokom roka upotrebe.

Zaključci treće faze eksperimentalnog rada su sledeći:

- U trećoj fazi istraživanja uspostavljen je model veštačke neuronske mreže koji je sposoban da predvidi sadržaj esomeprazola i profil nečistoća u zavisnosti od pH vrednosti finalnog proizvoda, za 36 meseci roka upotrebe.
- MLP mreža kao alat za učenje, u kojoj su pH vrednost rastvora esomeprazola i vreme skladištenja u mesecima bili ulazi za mrežu, a sadržaj esomeprazola i nečistoće rezultati mreže, omogućila je odlično predviđanje i podudaranje eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata i identifikovanje željenog *design space*-a procesa liofilizacije. Razvijen je *design space* opisan granicama pH vrednosti od pH 10,4–10,6 za gotov proizvod i rokom upotrebe od 36 meseci, u kojem sadržaji svih srodnih supstanci i sadržaj esomeprazola ostaju u okvirima specifikacijskih granica tokom roka upotrebe. Drugim rečima, da bi se sve srodne supstance i sadržaj esomeprazola zadržale u okviru propisanih specifikacijskih granica tokom čitavog roka upotrebe, pH vrednost rekonstituisanog gotovog proizvoda bi trebalo da bude u opsegu pH 10,4-10,6. Podešavanje pH vrednosti rastvora esomeprazol-natrijuma tokom proizvodnje tako da se pH vrednost rekonstituisanog rastvora održava u ovom suženom eksperimentalno otkrivenom rasponu, će stabilizovati esomeprazol prašak za rastvor za injekciju/infuziju i osigurati pouzdanu i ponovljivu proizvodnju, koja ispunjava sve unapred definisane attribute kvaliteta i specifikacije za finalni proizvod.

6.0 Literatura

1. F. Franks, *Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2007)
2. D. Han Won, P. Heejun, H. Eun-Sol, Y. M. Kim, H. D. Hwang, S. W. Jang, M. Kim, Effect of Formulation Factors and Oxygen Levels on the Stability of Aqueous Injectable Solution Containing Pemetrexed, *Pharmaceutics* (2020) 12, 46
3. 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
4. X. Ch Tang, M. J. Pikal, Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice, *Pharmaceut. Res.* (2004) 21
5. M. J. Pikal, Swarbrick, J. Eds. Boylan, *Lyophilization In Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, NY, USA (2002) 1299–1326
6. P. Kheddo, M. Tracka, J. Armer, R. J. Dearman, S. Uddin, C. van der Walle, A. P. Golovanov, The effect of arginine glutamate on the stability of monoclonal antibodies in solution. *Int. J. Pharm.* (2014) 473, 126–33, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.06.053
7. S. L. Nail, J. A. Searles, Elements of quality by design in development and scale-up of freeze-dried parenterals, *Biopharm Int.* 21 (2008) 44–52
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guidance, *Pharmaceutical Development Q8 (R2)* (2009)
9. A. G. Dossetter, G. Ecker, H. Lavery, J. Overington, ‘Big data’ in pharmaceutical science: challenges and opportunities, *Future Med. Chem.* 6 (8) (2014) 857–864
10. H. Kawasaki, T. Shimanouchi, Y. Kimura, Recent development of optimization of lyophilization process, *Hindawi J. Chem.* (2019)
11. 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
12. S. M. Patel, M. J. Pikal, Lyophilization process design space, *J. Pharmaceut. Sci.* 102 (2013) 3883–3887
13. R. Pisano, D. Fissore, A. Barresi, P. Brayard, P. Chouvenec, 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
14. F. Jameel, M. Khan, Quality-by-design as applied to the development and manufacturing of a lyophilized protein product, *AmPharmRev* (2019) 20–24
15. 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)
16. 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
17. 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
18. G. Shivkumar, P. S. Kazarin, A. D. Strongrich, A. A. Alexeenko, LyoPRONTO: an open-source lyophilization process optimization tool, *AAPS PharmSciTech* 20 (2019) 328
19. T. Zhua, E. M. Moussab, M. Wittingc, D. Zhoud, K. Sinhae, M. Hirthc, 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. Pharm. Biopharm.* 128 (2018) 363–378
20. R. De-Luca, G. Bano, E. Tomba, F. Bezzo, M. Barolo, Accelerating the development and transfer of freeze-drying operations for the manufacturing of biopharmaceuticals by model-based design of experiments, *Ind. Eng. Chem. Res.* 59 (2020) 20071–20085

21. D. Liu, F. Galvanin, Y. Yu, Formulation screening and freeze-drying process optimization of Ginkgolide B lyophilized powder for injection, *AAPS PharmSciTech* 19 (2018) 541–550
22. 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
23. J. C. Kasper, G. Winter, W. Friess, Recent advances and further challenges in lyophilisation, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* (2013)
24. M. Hassan-Alin; T. Andersson, E. Bredberg, K. Röhss, Pharmacokinetics of esomeprazole after oral and intravenous administration of single and repeated doses to healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (2000) 56, 665–670
25. T. Andersson, M. Hassan-Alin, G. Hasselgren, K. Röhss, L. Weidolf, Pharmacokinetic Studies with Esomeprazole, the (S)- Isomer of Omeprazole. *Clin. Pharmacokinet.* (2001) 40, 411–426, doi:10.2165/00003088-200140060-00003
26. T. Andersson, Pharmacokinetics, Metabolism and Interactions of Acid Pump Inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* (1996) 31, 9–28, doi:10.2165/00003088-199631010-00002
27. A. Pavlović, Tečno-Hromatografska i Spektrofotometrijska Karakterizacija i Određivanje Esomeprazola, Njegovih Nečistoća i Degradacionih Proizvoda; Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija (2014) 155–160
28. European Pharmacopoeia, 10th edition. Strasbourg: Council of Europe (2020)
29. 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
30. M. P. Brezeziska, Kinetics of omeprazole degradation in solid state *Acta Pol. Pharm.* (2011) 68, 753
31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. S. Ibrić, M. Jovanović, Z. Djurić, J. Parojčić, L. Solomun, The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit® RS PO as matrix substance. *J. Control. Release* (2002) 82, 213–222, doi:10.1016/s0168-3659(02)00044-5
36. M. Madzarevic, D. Medarevic, A. Vulovic, T. Sustersic, J. Djuris, N. Filipovic, S. Ibric, Optimization and Prediction of Ibuprofen Release from 3D DLP Printlets Using Artificial Neural Networks. *Pharmaceutics* (2019) 11, 544, doi:10.3390/pharmaceutics11100544
37. T. Miletic, S. Ibric, Z. Đurić, Combined Application of Experimental Design and Artificial Neural Networks in Modeling and Characterization of Spray Drying Drug: Cyclodextrin Complexes. *Dry. Technol.* (2013) 32, 167–179, doi:10.1080/07373937.2013.811593
38. N. Millen, A Kovačević, J Djuriš, S. Ibrić, Machine Learning Modeling of Wet Granulation Scale-up Using Particle Size Distribution Characterization Parameters. *J. Pharm. Innov.* (2020) 15, 535–546, doi:10.1007/s12247-019-09398-0
39. S. Ibrić, J. Djuriš, J. Parojčić, Z. Djuric, Artificial Neural Networks in Evaluation and Optimization of Modified Release Solid Dosage Forms. *Pharm.* (2012) 4, 531–550,

doi:10.3390/pharmaceutics4040531

40. 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
41. A. L. Fohi, R. E. Regal, Proton pump inhibitor-associated pneumonia: Not a breath of fresh air after all? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2(3) (2011) 17–26
42. J. R. Demarest, D. D. F. Loo, *Ann. Rev. Physiol.* 52 (1990) 307
43. X. Yao, J. G. Forte, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 103
44. A. B. Thomson, M. D. Sauve, N. Kassam, H. Kami takahara, Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World J Gastroenterol* 16 (19) (2010) 2323–2330
45. J. Rašić, V. Nestorović, S. Janičijević-Hudomal, D. Rašić, B. Kisić, Profilaksa stres ulkusa. *Praxis Medica*, 41(3-4) (2012) 89–92
46. J. M. Shin, Y. M. Cho, G. Sachs, *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 7800
47. M. Robinson, J. Horn, *Drugs.* 63 (2003) 2739
48. R. Walia, M. D. Hedaitullah, S. F. Naaz, K. Iqbal and H.S. Lamba, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 1 (2011) 565
49. T. Andersson, K. Röhss, E. Bredberg, M. Hassan-Alin, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15 (2001) 1563
50. L. Olbe, E. Carlsson, P. Lindberg, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2 (2003) 132
51. M. Kumar, K. Purandhar, K. Reddy, M. Reddy, K. Sreenath, (Dr. Reddy's Laboratories Limited) US20040077869 (2004)
52. A. A. Al-Badr, *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology VOL. 35*, Harry G. Brittain, Ed., Elsevier Inc, London, UK (2010) 151
53. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London, UK (2004) 1366
54. F. Wang, L. K. Montemayor, D. Che, S. E. Horne, (Apotex Pharmachem Inc.) US7786309 B2 (2010)
55. M. Bohlin, U. Noreland (Astrazeneca Ab) US8658799 B2 (2014)
56. P. Reddy, R. Reddy, M. Reddy, (Hetero Drugs Limited) EP2106397 B1 (2011)
57. T. M. Khomenko, K. P. Volcho, N. I. Komarova, N. F. Salakhutdinov, *Russ. J. Org. Chem.* 44 (2008) 124
58. P. Pitchen, M. Deshmukh, E. Dunach, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 8188
59. S. Zhao, O. Samuel, H. B. Kagan, *Tetrahedron* 43 (1987) 5135
60. P. Pitchen, C. J. France, I. M. McFarlane, C. G. Newton, D. M. Thompson, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 485
61. Smernice dobre proizvođačke prakse ("Sl. glasnik RS", br. 97/2017)
62. Obezbeđenje projektovane klase i količine vazduha u čistim sobama, Stojanović B., Rakin M. (2012)
63. Smernice dobre proizvođačke prakse ("Službeni glasnik RS", br. 97 од 1. novembra 2017, 19 od 8. марта 2023.
64. M. Jovanović, Z. Djurić, *Osnovi industrijske farmacije*, Nijansa, Zemun (2005)
65. G-W. Oetjen, *Freeze-Drying*, Wiley-VCH (1999) 2-12
66. S. Yoshika, Y. Aso, K. Izuutsu, T. Terao, Stability of beta-galactosidase, a model protein drug, is related to water mobility as measured by oxygen-17 nuclear magnetic resonance (NMR), *Pharm Res.* 10 (1) (1993) 103-108
67. S. Yoshika, Y. Aso, Sh. Kojima, Determination of molecular mobility of lyophilized bovine serum albumin and gamma-globulin by solid-state H1 NMR and relation to aggregation-susceptibility, *Pharm. Res.* 13 (6) (1996) 926-930
68. H. Vromans, E. J. M. Schalks, Comparative and predictive evaluation of the stability of different freeze dried formulations containing an amorphous, moisture-sensitive ingredient, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (5) (1994) 757-768
69. J. Oesterle, F. Franks, T. Auffret, The influence of tertiary butyl and volatile salts on the

- sublimation of the ice from frozen sucrose solution: Implication for freeze drying. *Pharmaceutical Development and Technology*, 3 (2), Marcel Dekker, Inc., New York, (1998) 175-183
70. D. S. Pržić, N. Lj. Ružić, S. D. Petrović, Lyophilization – the process and industrial use, *Chem. Ind.* 58 (12) (2004) 552-562
 71. ICH Q6A: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, ICH Steering Committee (1999)
 72. ICH Q 1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Steering Committee (2003)
 73. Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products, The European Medicinal Agency (2004)
 74. FDA Draft Guidance for Industry “Stability Testing of Drug Substances and Drug Products”
 75. ICH Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Steering Committee (1996)
 76. ICH Q1E, Evaluation for Stability Data, ICH Steering Committee (2003)
 77. S. W. Baertschi, *Pharmaceutical Stress Testing*, Taylor & Francis, USA (2003) 1-9
 78. Note for Guidance on in-use Stability Testing of Human Medicinal products, The European Medicinal Agency (2001)
 79. Note for Guidance on Maximum Shelf-life for Sterile Products for Human Use after First Opening or Following Reconstitution; The European Medicinal Agency (1998)
 80. ICH Q3A (R2), Impurities in New Drug Substances, ICH Steering Committee (2006)
 81. ICH Q3B (R2), Impurities in New Drug Products, ICH Steering Committee (2006)
 82. FDA Guidance for industry ANDAs: Impurities in Drug Substances (2009)
 83. FDA Guidance for Industry ANDAs: “Impurities in Drug Products” (1999)
 84. Lj. Solomun, Primena in silico metoda u predviđanju stabilnosti liofilizata za rastvor za injekcije sa kortikosteroidima pakovanih u dvokomorne bočice, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija, (2012) 31-36, 39-47
 85. M. Gibson, *Preformulacija i formulacija lekova* (2012) 309-342
 86. L. Xie, H. Wu, M. Shen, L. L. Augsburg, R. C. Lyon, M. A. Khan, S. W. Hoag, Quality-by-design (QbD): Effects of testing parameters and formulation variables on the segregation tendency of pharmaceutical powder measured by the ASTM D 6940-04 segregation tester. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(10) (2008) 4485-4497
 87. R. A. Lionberger, S. L. Lee, L. Lee, A. Raw, X. Y. Lawrence, Quality by design: concepts for ANDAs. *The AAPS journal*, 10(2) (2008) 268-276
 88. Guideline, I. H. T. Quality risk management Q9. In International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005)
 89. D. M. Barends, M. T. Oldenhof, M. J. Vredenburg, M. J. Nauta, Risk analysis of analytical validations by probabilistic modification of FMEA. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (2012) 64, 82-86
 90. N. Anthony Armstrong, *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation* (2006)
 91. X. Y. Lawrence, *Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control*. *Pharmaceutical research*, 25(4) (2008) 781-791
 92. Guideline, I. H. T. Pharmaceutical quality system Q10. Current Step, 4. In International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2008)
 93. W. D. Kenneth, *The FMEA Pocket Handbook* (2004)
 94. J. F. Van Leeuwen, M. J. Nauta, D. De Kaste, Y. M. C. F. Odekerken-Rombouts, M. T. Oldenhof, M. J. Vredenburg, D. M. Barends, Risk analysis by FMEA as an element of analytical validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 50(5) (2009) 1085-1087
 95. J. J. Hopfield, *Artificial Neural Networks*, *IEEE Circuits and Devices Magazine* (1998) 3-10
 96. A. C. Gayton, Prijenos i obrada informacija u živčanom sustavu, *Medicinska fiziologija*, VII, hrvatskosrpsko preštampano izdanje, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb (1981) 634-348
 97. B. Widrow, M. Lehr, 30 Years of Adaptive Neural Networks: Perceptron, Madaline and

- Backpropagation, Proceedings of the IEEE, vol. 78, no.9 (1990) 1415-1442
98. S. Milenković, Z. Obradović, V. Litovski, Annealing Based Dynamic Learning in Second-Order Neural Networks, ICNN, Washington DC (1996) 458-463
99. D. E. Rumelhart, G. E. Hinton, R. J. Williams, Learning Internal Representation by Error Propagation, Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructures of Cognition, Rumelhart D. E., McClelland J. L., Eds., vol I, MA: MIT Press (1986) 318-362
100. S. Grossberg, Nonlinear Neural Networks: Principles, Mechanisms and Architectures, Neural Networks, vol. 1 (1988) 17-61
101. M. Hasler, Overview of Analog Neural Networks, Invited talk at the IEEE COMPEURO, Bologna (1990)
102. S. Milenković, Veštačke neuronske mreže, Zadužbina Andrejević, Beograd (1997)
103. E. N. Drăgoi, S. Curteanu, D. Fissore, On the Use of Artificial Neural Networks to Monitor a Pharmaceutical Freeze-Drying Process, Drying Technology (2013)

7.0 Biografija autora

Jovana Ajdarić rođena je 28.03.1990. u Prijedoru, Republika Srpska. Osnovnu školu „Jovan Sterija Popović“ i Gimnaziju „Borislav Petrov Braca“, prirodno-matematički smer završila je u Vršcu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2009/2010. godine, a diplomirala je 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,71 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2014/2015. godine upisala je prvu godinu doktorskih akademskih studija (modul Farmaceutska tehnologija). Od decembra 2014. godine zaposlena je u HEMOFARM A.D. članici STADA ARZNEIMITTEL AG, na pozicijama odgovornim za koordinaciju, implementaciju i realizaciju tehnološkog transfera nesterilnih (obloženih i neobloženih tableta, dražeja, efervescentnih tableta, kapsula, peleta, rastvora i suspenzija) i sterilnih (injekcija, infuzija, liofilizata, sireta, kertridža, nazalnih sprejeva i kapi) farmaceutskih proizvoda, uključujući biofarmaceutike; pozicijama odgovornim za optimizaciju proizvodnih procesa, praćenje životnog ciklusa i *on-going* proces verifikacije lekova iz postojećeg portfolija; odbranu GMP inspekcija. Od februara 2021. godine zaposlena je u STADA grupi na poziciji *Scale-up* menadžera za optimizaciju i statistiku, Globalne Proizvodne ekspertize i tehnologija.

Jovana Ajdarić was born in Prijedor, Republika Srpska on March 28th 1990. She graduated from the "Jovan Sterija Popović" elementary school and the "Borislav Petrov Braca" high school in Vršac. She enrolled Faculty of Pharmacy of the University of Belgrade in 2009/2010 where graduated in 2014 with an average mark of 8.71 and a mark of 10 for her diploma thesis. She started her PhD studies in the field of pharmaceutical technology at the Faculty of Pharmacy in Belgrade in 2014/2015. Since December 2014, she has been employed at HEMOFARM A.D. members of STADA ARZNEIMITTEL AG, in positions responsible for the coordination, implementation and realization of technological transfer of non-sterile (coated and uncoated tablets, dragees, effervescent tablets, capsules, pellets, solutions and suspensions) and sterile (injections, infusions, lyophilisates, syrups, cartridges, nasal sprays) and drops) pharmaceutical products, including biopharmaceuticals; positions responsible for optimization of production processes, monitoring of the life cycle and on-going process verification of drugs from the existing portfolio; defense of GMP inspections. Since February 2021, she has been employed in the STADA group in the position of Scale-up manager for optimization and statistics of Global Production expertise and technology.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторскограда

Име и презиме аутора _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
