

Opponensi bírálat

Rácz Norbert

„Optimalizáló szoftver szerepe robusztus folyadékkromatográfiás módszerek fejlesztésében”
című PhD értekezéséhez

I. A kutatási téma aktualitása

Rácz Norbert PhD doktori értekezésében folyadékkromatográfiás módszereket dolgozott ki modellezés céljából, melyen keresztül a QbD (Quality by Design) elv analitikai alkalmazásának lehetőségét mutatja be optimalizáló szoftverek segítségével. Kísérleteihez a DryLab szoftver különböző (már meglévő és épp fejlesztés alatt lévő) verzióit használta. Legfőbb célkitűzése volt szemléltetni, hogy az előre megfelelően megtervezett kísérletekből nyert adatokból szimulált számítógépes modellek segítségével hogyan azonosíthatók a kromatográfiás módszerek kritikus paraméterei, melyekkel ismertté tehető azok robusztus tartománya. A DryLab szoftver olyan alkalmazási lehetőségeit mutatja be, amik még a legszigorúbban szabályozott környezetben, például a gyógyszeriparban is elfogadhatók, melyet az ICH (International Council for Harmonisation) irányelvek határoznak meg. Gyógyszeripari környezetben a kutatással és fejlesztésekkel (K+F) foglalkozó részlegeken jó néhány kutatónak napi szinten számottevő hasonló folyadékkromatográfiás feladatot kell megoldani, azonban a különböző módszerfejlesztések időnként kemény próbatételt is jelenthetnek. Mindemellett az ipari környezetben a versenyfutás az idővel a legfontosabb tényezők egyike, és a megvalósíthatóságot az anyagi ráfordíthatóság is nagymértékben befolyásolja. Éppen ezért a versenyszférában dolgozók előszeretettel illesztik be a piacon elérhető, megbízhatóan pontos, a befektetett munka idejét jelentősen csökkentő számítógépes alkalmazásokat azon elsődleges céllal, hogy ráfordításaikat jelentősen lefaraghassák, természetesen a szükséges kockázat és az abból származó haszon alapos mérlegelésével. Egyre növekvő tehát az igény arra, hogy a nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC és UHPLC) módszerfejlesztések a modern számítógépes tudomány segítségével, szoftveres modelltámogatásokkal pontosabban és gyorsabban elvégezhetővé váljanak.

A DryLab módszeroptimalizáló szoftver alkalmazásának ilyen irányú nagyrabecsülését mi sem bizonyítja jobban, mint Jelölt cikkeinek nemzetközi szinten elismert folyóiratokba történő befogadása. Jelölt tudományos eredményeit értekezése *Tézisek* fejezetének négy pontjában fogalmazza meg, melyek magukban foglalják az öt elsőszerzős és egy másodszerzős közleményét is.

2. Az értekezés szerkezete

A dolgozat formailag és tartalmilag is logikus felépítésű, nyelvezete érthető. Helyesírási, nyelvhelyességi hibákat csak elenyésző számban tartalmaz.

Az áttekintett 30 oldalnyi *Irodalmi háttér* a címben és a *Bevezetés* részben megfogalmazott célkitűzésekre épül és röviden átfogja a kísérleti részben részletes bemutatásra kerülő témákat, nevezetesen a DryLab módszeroptimalizáló szoftver alkalmazásával összefüggésben szóba került folyadékkromatográfiás technikákat, a kolonnák összehasonlíthatóságát és a paraméterek hatását az elválasztásra. Betekintést nyújt a gyógyszerhatóságok által előírt szabályozásokba. Érinti azokat az ICH irányelveket, melyek szorosan kapcsolódnak a dolgozatban szereplő részekhez, a gyógyszeripari fejlesztési modellt (QbD), a kísérlettervezést és a számítógépes optimalizálási lehetőségeket a folyadékkromatográfiában.

Az 50 oldalnyi *Kísérleti rész a Tézisekben* (1,5 oldal) is ismertetett és rangos folyóiratokban leközölt Jelölt eredményeit átölelő négy nagy fejezetből áll. Ezek egymással is kapcsolatban lévő, ugyanakkor a DryLab szoftver más és más alkalmazásának szemléltetését megcélzó tanulmányból épülnek fel.

A kétoldalnyi *Összefoglalás* (2 oldal) az elvégzett kísérletek rövid kivonata.

A *Felhasznált irodalom* 159 hivatkozást tartalmaz, mind hazai, mind nemzetközi publikációkkal átölelve a disszertáció anyagát.

A *Mellékletekben* (3 oldal) adatokat találunk a kísérleti rész harmadik fejezetéhez.

3. Az értekezés tartalmi kifejtése

Opponensként jelenleg abban a helyzetben vagyok, hogy Jelölt dolgozatának kiteljesedését a munkahelyi vitát megelőző állapotától kezdve követhettem végig. Megállapítható, hogy a tanszéki vitát követően a Bírálók javaslatai alapján, az elhangzott kritikai észrevételek és változtatási igények túlnyomó többségben beépítésre kerültek, valamint az apróbb hibák, hiányosságok javítása is legtöbb helyen megtörtént. Ezeket jelenlegi bírálatomban ennek értelmében elfogadottnak tekintem.

Jelölt a **kísérleti rész első fejezetében** (2.1.) az *állófázisok reprodukálhatóságát* tanulmányozta. Négy „azonos típusú, de eltérő gyártási sarzsból származó” kolonnán szemléltette, hogy milyen hibákat rejthet a „trial and error” módszeroptimalizálás, szemben a szoftveres számítások (DryLab) által támogatott fejlesztéshez képest. Ez utóbbihoz

oszloponként 12 mérésből álló kísérleti modellt (kocka) épített, melyen bemutatta a Design Space-t (DS), azaz ahol a kiindulási feltételeinknek megfelelő értéket kaphatunk a kritikus csúcspár felbontására. Ezek után még további nyolc, ismeretlen „előéletű”, de azonos típusú állófázissal létrehozta az újabb kockamodelljeit. Azonban egy hétköznapi módszerfejlesztés esetében az „*azonos típusú, de eltérő gyártási sarzsból származó*” állófázisok használata során nem indokolt ilyen nagyszámú ($12 \times 12 = 144$) párhuzamosan előkísérlet elvégzése. A tanszéki vitára bocsátott példányhoz képest jelen dolgozatában Jelölt ezt úgy indokolta, hogy tanulmányának további „*célja a DryLab szoftver új moduljának a Column Comparison-nak tesztelése, a fejlesztésének támogatása volt*”. Bár a szoftver ezen újdonsága kevésbé az itt bemutatott, hanem az egymással felcserélhető és helyettesíthető „alternatív” állófázisok bevezetése kapcsán vált igen népszerűvé [136].

A kísérleti rész második fejezete (2.2) a „*Mozgófázis összetétel optimalizálása számítógépes szimulációval*”, valamint a robusztusság vizsgálatával foglalkozik. Jelölt célja a Drylab egy új fejlesztésű egysége (a $2 \times 3 \times 3$ alapkísérlet adataival előállítható $t_G - pH - t_C$ „kocka” modell) alkalmazhatóságának prezentálása, melyhez egy megfelelő kromatográfiás kísérleti körülményt választott ki. Ebben a munkában sem az felhasznált modellvegyületnek (az amlodipinnek és rokon szennyezőinek) vizsgálata volt Jelölt elsődleges feladata, (mint ahogyan az előző fejezben sem,) hanem a hangsúly a *3-dimenziós ábrázolás* az adott ($t_G - pH - t_C$) változó paraméterek mellett, azaz az optimalizáló szoftver ezen egysége használatának előnyei és korlátai bemutatása.

- Megítélése szerint, –amennyiben az elsődleges kitűzött cél egy, „a szoftveres fejlesztést szemléltető tanulmány” bemutatása –, elegendő volna-e a kiválasztott hatóanyag mellett csupán azokra a kritikusnak ítélt szennyezőkre összpontosítani (pl. itt az *ImpH*, *ImpG* és *ImpB*), amelyeket az elővizsgálatok és egyéb prediktáló szoftverek (pl. Marvin Sketch) is alátámasztanak? Tehát a „kísérleti modell”, és mindezzel az értékelések, valamint az eredmények feldolgozása egyszerűsíthető-e?

Másrészről a korábbi „*Válaszok az opponensi előbírálatra*” dokumentum 7-es kérdésre adott felelete alapján, – miszerint azt írta, hogy „*a kísérletek során törekedtünk valós analitikai problémát megoldani*”, valamint „*más munkaponton újabb kritikus szennyezőt is érdemes vizsgálni*” –, meglátásom szerint talán belefért volna a végleges dolgozatát is kiegészíteni ezzel és az ott bemutatott példákkal mindezt szemléltetni is a disszertáció és ezen fejezet címében foglaltaknak megfelelően.

A **harmadik**, nagyobb lélegzetű **kísérleti részben** (2.3.) *kiterjesztett kísérleti térben történő folyadékkromatográfiás módszer optimalizálás(oka)t* mutat be, ahol célja a „DryLab modellezés határainak vizsgálata” volt.

Ebben először a kiválasztott állófázis megismerése érdekében egy kísérleti terv segítségével feladatként tűzte ki „*a szoftverben alkalmazható maximális kísérleti paramétertartomány meghatározását*”, „*amelyben a vizsgált vegyületek retenciós időinek modellezése még megfelelő pontosságú.*” A „*retenció pontos előrejelzés*”-éhez a fejezetéhez kiválasztott modell hatóanyagtól, -az apixabantól- független *tesztvegyületekkel* „*így összesen $5 \times 5 \times 15 = 375$ db kísérletet*” hajtott végre a „*kiterjesztett kísérleti tér vizsgálatához*”. Majd ezt követően a „*szimuláció pontosságának ellenőrzésére*” további „*húsz pontot jelölt*” ki. Ezek a mérések, melyeket folyadékkromatográfiásan el is végzett, számosságát tekintve (ráfordított energia) nagyon nagy értéket képviselnek.

- Véleménye szerint a versenyszférát (az ipari környezetet) tekintve milyen esetben éri meg ilyen gigantikus mennyiségű befektetett munka a célkísérletek elvégzését megelőzően?

Az így bemutatott kísérletsorozata azt mutatta, hogy a retenciós idő előrejelzéséhez a szoftverfejlesztők által felállított szabályok a „*gradiens idő, a hőmérséklet és a pH maximális eltéréseire ($\Delta t_G \max 3X$; $\Delta T \leq 30^\circ\text{C}$; $\Delta \text{pH} \leq 0,6$)*” csupán irányadók, de nem szigorú elvárások a DryLab-bal történő módszerfejlesztések során. (Megjegyzésem itt az 55. oldalon véleményem szerint egy elírás történt: „*a gradiens idő (t_G) előrejelzés*” helyett *eltérést* akart írni.) „*A fenti eredmények azt mutatják, hogy retencióbecslésre hatékonyan lehet használni a kiterjesztett DryLab modellt. Gradiens idő és hőmérséklet tekintetében, amennyiben a kísérleti körülmények megkövetelik, akár nagyobb mértékű kiterjesztés is elfogadható, azonban a pH tartomány további szélesítése csak abban az esetben javasolt, ha a mintakomponensek pK_a értéke pontosan ismert.*”

- Véleménye szerint ez a megállapítás mennyire tekinthető általános érvényűnek?
- Azaz az itt meghatározott „*maximális kiterjesztett kísérleti tér*”, melyet az itt kipróbált konkrét állófázison (*Acquity BEH C18*) mutatott be, sikeresen átvihető-e, alkalmazható-e másik, azonban azonos USP 621 kolonna besorolású (pl. L1-es; C-18) oszlopra is?

Miután az előkísérletek végén összefoglalta a tapasztalatait, a fejezet további részében Jelölt rátért az apixaban hatóanyag szintézistámogató módszerfejlesztésre (a célvizsgálat). Ez egy újabb példa „*az előző pontban (az elővizsgálatban) leírt kiterjesztett kísérleti térű optimalizálási stratégia alkalmazására*”. Ebben az új kísérleti térben a hőmérséklet-tartományt még tovább kívánta terjeszteni 60°C -ra ($20^\circ\text{C} - 80^\circ\text{C}$). Ez a szoftverfejlesztő által javasolt és deklarált

tartománynak immáron a duplája (2X30 °C). A fejlesztésnél további (Marvin Sketch) szoftver segítségével is felhasználva a „pH maximális kiterjeszhetőségét” is figyelembe vette.

A kromatográfiás mérések és a „kockák” elemzését követően, a kiválasztott módszer jóságát úgy igazolta, hogy a „munkapont körüli térrészből „kimetszett” egy kisebb részt, melyen robusztusság vizsgálatot” is végzett. Az *apixaban* és *köztitermékei* elemzésére alkalmas UHPLC módszer szimulált és mért kromatogramjai (31 és 32. ábra) jó egyezést mutatnak.

Jelölt konklúziójában szerepel a munkára fordított idő is, mely a mai elvárások szerint szintén nagyon fontos tényező. Ezután összegezi, hogy „a vizsgálati módszer a végső minősítésen kívül kitűnően alkalmazható a preparatív kutató laboratóriumokban, szintézisfejlesztésnél és tisztítási lépések ellenőrzésére, valamint gyártásközi ellenőrzések (IPC) során is”. Véleményem szerint ez a következtetés kicsit messzebbre mutat a valóságnál. Egyrészt, mivel a „Válaszok az opponensi előbírálatra” dokumentum 17-es kérdésre, – miszerint „Véleménye szerint az *Int4* és *Int3* kritikus pár közötti felbontás elegendő lesz-e egy valós IPC vizsgálat alkalmazására, az *Int4* megbízható minősítésére?” – adott válaszát idézve: „Az *Int4* *intermediér* IPC-s vizsgálatára egy másik munkapont szükséges, ahol a két vegyület között nagyobb a felbontás”.

Másfelől kérdésem:

- Mit ért itt Jelölt a „végső minősítésen”?

Egy hatóanyag HPLC tisztaságvizsgálati módszerében nem csupán az intermedierekről, hanem az összes „rokon vegyület szennyezőről” számot kell adni. Az imént említett korábbi dokumentum 11-es kérdésére, azaz, hogy “Számolt-e az *apixaban* gyártása során várható *carryover*, *izomer* és *dimer* szennyezések kromatográfiás tulajdonságaival is az állófázis és a független tesztvegyületek kiválasztása során, melyeket a kiterjesztett tér modellezéséhez használt?” Jelölt az alábbi választ adta: „Az *izomer* és *dimer* szennyezésekkel a fejlesztés ezen fázisában nem foglalkoztunk”, *de a modellbe könnyedén beépíthetők ezek a szennyezők is a fejlesztés későbbi fázisában.*”.

Mindent összevetve tehát Jelölt vizsgálati módszerére vonatkozó konklúziója némi pontosítást igényel például úgy, hogy: „a már elkészített kocka modell és a szintézistámogatáshoz fejlesztett kromatográfiás módszer jó alapot szolgáltathat gyártásközi ellenőrzések (IPC) módszerei, valamint a hatóanyag minősítésére alkalmas tisztaságvizsgálati módszer kidolgozásához is”.

Az utolsó, a **negyedik kísérleti fejezet** (2.4.) témája a „*Modellezés kiterjesztése alternatív folyadékkromatográfiás mechanizmusok optimalására*”. Azaz alkalmazhatóak-e ugyanazok a

modellegyenletek, – melyekkel a DryLab szakértői szoftver számol –, a fordított fázistól eltérő retenciós mechanizmusú elválasztások optimalizálására is. A fejezet bevezető része az előbírálatra bocsátott verzióhoz képest letisztultabb, így pontosabb megfogalmazásban kaphattuk meg, hogy Jelölt „*a dolgozat ezen részében*” mire „*keresett választ*” és ez hogyan kapcsolódik a korábbi kísérleti részekhez. Első ide vonatkozó kísérletében porózus grafitált szén (PGC) állófázison kívánt szerkezeti izomereket elválasztani. A fejlesztéshez felhasználta a „*Pallas szoftver által kalkulált logP értékeket*” is. Mivel a „*szerkezeti izomerek elválasztása során a terner mozgófázis összetétel (t_C) hatással lehet a szelektivitásra [85,86,157]*”, előbb kétdimenziós síkokat készített, majd sikeresen alkalmazta a DryLab kísérleti 4.1.4 béta-verzión szimulált háromdimenziós modellt. A 38. ábrán szemléltetett szimulált és mért kromatogramok itt is szép egyezést mutatnak. Jelölt konklúziója, hogy a hagyományos fordított fázisra leírt kísérleti modellek jól hasznosíthatók ezen körülmények között is.

A modellvegyülete (JWH-122) és izomerjei ebben a részben a gyakorlati életből, egy igen szigorú jogi környezetből származott. Bár a bemutatott fejlesztés során az összes izomer elválasztása a kitűzött célnak megfelelően szépen megvalósult, azonban épp ez a 4-es pozícióban metilezett származék (33. ábra) a kromatogram legvégén eluálódik, igen kis csúcsmagassággal, jelentős csúcsszélességgel. Egyedül ez a JWH-122 molekula [156] minősül kábítószernek, tehát büntetőjogi szempontból ennek a vegyületnek az azonosítása, kromatográfiás detektálhatósága, minőségi, illetve mennyiségi meghatározása bír jelentőséggel.

- Mérhető-e megbízhatóan a kitüntetett vegyület ezzel a módszerrel, amennyiben rutinalkalmazásban kívánják felhasználni?

A fejezet legutolsó kísérleti részében három különböző HILIC állófázisra fejlesztett módszereket hallucinogén gomba két komponensének logD értéke alapján. Kísérleti tervében modellezőszoftverekkel másodfokú polinom (DryLab 2010) és exponenciális (DryLab 4) megközelítést alkalmazott az izokratikus összetétel és a retenciós idők modellezésére. Az ellenőrző kromatogramok összehasonlításával azonban kiderült, hogy ezek a modellek csak korlátozottan alkalmazhatóak. A gyakorlati haszna a bemutatott vizsgálatoknak, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott modellszámításai alapján sikerült kidolgozni egy, a rutinmérésekre is alkalmas módszert, melyet a bűnügyi laboratóriumban használnak.

- Végezetül a dolgozat kitekintéseként, véleménye szerint, az időnként horribilis mennyiségű előkísérlet elvégzésével járó munkát lehet-e könnyíteni a DryLab Optimalizáló szoftver további fejlesztésével? Hogyan lehetne még több időt, energiát megtakarítani a módszerfejlesztések során? Történtek-e ilyen irányú fejlesztések az elmúlt időszakban?

4. Összefoglalás

Rácz Norbert PhD doktori értekezésében olyan folyadékkromatográfiás (kismolekulás) modellkísérleteket tervezett, melyekkel hatékonyan szemléltethetők egy modern optimalizáló szoftver (DryLab) újításai. Tanulmányozta a DryLab szoftver megbízhatóságát, valamint olyan alkalmazásokat, melyekkel arra is rávilágított, hogy ez a módszeroptimalizáló számítógépes program néhány esetben csak korlátozottan vehető igénybe. A DryLab fejlesztőivel közösen egy "hiányt pótló", a *– pH és a termer mozgófázis optimalizálására alkalmas* – szoftveregységet dolgoztak ki. Igazolta, hogy a modellalapú kísérlettervezés alkalmas kiterjesztett kísérleti térben kromatográfiás retenció és felbontás pontos becslésére. Jelölt munkája hozzájárult a DryLab kromatográfiás módszeroptimalizáló szoftvert érintő fejlesztésekhez, eredményei nemzetközi érdeklődésre tarthatnak számot. Jelen disszertáció a *Tézisekben* is bemutatott közlemények alapján lett összeállítva, ami egyben azt is jelenti, hogy eredményei egy rangos tudományos megmérettetésen már sikeresen szerepeltek.

A dolgozat a PhD-vel szemben támasztott követelményeknek eleget tesz. Következésképpen az értekezés nyilvános vitára bocsátását támogatom, sikeres védelem esetén javaslom Jelöltnek a PhD fokozat odaítélését.

Budapest, 2022. 11. 07.



dr. Szabovik Gabriella Ildikó

e-mail: szabovik@richter.hu

