

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 13.5.2021. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Biljane Gatarić, magistra farmacije, pod naslovom:

**PRIMENA TEHNIKA ZA NAPREDNU ANALIZU PODATAKA U BIOFARMACEUTSKOJ
KARAKTERIZACIJI LEKOVA: IDENTIFIKACIJA, KLASIFIKACIJA I PREDVIĐANJE FAKTORA
KOJI UTIČU NA INTESTINALNU APSORPCIJU LEKOVITIH SUPSTANCI**

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Jelena Parojčić, redovni profesor, mentor rada, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Sandra Cvijić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Žarko Gagić, docent, Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći:

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „Primena tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova: identifikacija, klasifikacija i predviđanje faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci“, sadrži pet poglavlja: (i) Opšti deo, (ii) Cilj istraživanja, (iii) Eksperimentalni deo, (iv) Zaključci i (v) Literatura. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i obuhvata 74 grafička prikaza (5 u Opštem delu i 69 u Eksperimentalnom delu), 53 tabele, kao i 564 literaturna navoda (od čega je 216 korišćeno za formiranje seta podataka za naprednu analizu).

U okviru Opšteg dela dat je pregled aktuelnih saznanja koja se odnose na oblast biofarmaceutske karakterizacije lekova. Detaljno su razmotreni različiti biofarmaceutski, fizičko-hemijski, fiziološki i farmaceutsko-tehnološki faktori od kojih zavisi apsorpcija lekovitih supstanci iz gastrointestinalnog trakta, uključujući i uticaj hrane. Kritički su razmotrena različita ograničenja koja se odnose na postojeći, opšte prihvaćeni pristup biofarmaceutskoj klasifikaciji lekova i modifikovani pristupi koji su opisani u literaturi. Pored toga, navedeni su osnovni pojmovi i principi napredne analize podataka, uključujući pregled tehnika koje se koriste za naprednu analizu podataka: Veštačke neuronske mreže;

Hijerarhijsko klasterovanje na glavnim komponentama; Stablo odlučivanja; Algoritam potpornih vektora sa polinomalnom kernel funkcijom i Algoritam slučajnih šuma . Dat je i pregled dostupne literature koja se odnosi na primenu tehnika za naprednu analizu podataka u razvoju i karakterizaciji lekova.

U okviru Cilja istraživanja konkretno i jasno je definisan osnovni, opšti, cilj rada i odgovarajući specifični ciljevi. Kao opšti cilj navedena je procena mogućnosti primene tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova. Specifični ciljevi istraživanja su obuhvatili:

- razvoj i validaciju modela za predviđanje humane intestinalne permeabilnosti lekovite supstance na osnovu odabranih molekulskih deskriptora;
- identifikaciju kritičnih vrednosti biofarmaceutskih faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i uspostavljanje modifikovanog biofarmaceutskog sistema klasifikacije;
- identifikaciju fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih faktora i njihovih interakcija koje utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i njihovu biofarmaceutsku klasifikaciju;
- razvoj i validaciju klasifikacionih modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova;
- biofarmaceutsku karakterizaciju izabranih model supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost zasnovanu na primeni fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela, u kombinaciji sa rezultatima dobijenim ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance iz tableta sa trenutnim oslobađanjem. Kao model supstance u ovom delu istraživanja izabrani su aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin koji su u literaturi opisani kao nisko rastvorljive i nisko permeabilne supstance čija je apsorpcija varijabilna i nepotpuna.

U okviru Eksperimentalnog dela rada opisan je pristup primenjen prilikom formiranja baze podataka za analizu, kao i odgovarajuće tehnike i metode koje su korišćene za naprednu analizu podataka, *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja izabranih model lekovitih supstanci iz tableta i *in silico* modelovanje i simulaciju apsorpcije izabranih model lekovitih supstanci u uslovima primene leka na gladno i nakon obroka, detaljno su prikazani i prodiskutovani dobijeni rezultati.

Prvi deo Eksperimentalnog rada se odnosi na prikupljanje i kritičku analizu dostupnih podataka o biofarmaceutskim, fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim karakteristikama različitih lekovitih supstanci i formiranje baze podataka za analizu. Definisani su sledeći kriterijumi za uključivanje lekovitih supstanci u bazu podataka:

- Set podataka A: lekovite supstance za koje postoje pouzdani podaci o koeficijentu permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije u ljudi, uključujući i supstance čije su biofarmaceutske karakteristike detaljno opisane i evaluirane u vidu FIP Biowaiver monografija;
- Set podataka B: lekovite supstance za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog

farmaceutskog oblika leka, uz pretpostavku da farmaceutski oblik leka ne utiče na apsorpciju;

- Set podataka C: lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost.

Drugi deo Eksperimentalnog rada se odnosi na primenu naprednih tehnika za analizu podataka s ciljem razvoja modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci u ljudi, identifikaciju fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i njihovih kritičnih vrednosti kao osnov za uspostavljanje modifikovanog biofarmaceutskog sistema klasifikacije, i razvoj i validaciju klasifikacionih modela za predviđanje uticaja hrane na intestinalnu apsorpciju lekova.

U okviru trećeg dela eksperimentalnog rada sprovedena je biofarmaceutska karakterizacija komercijalno dostupnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem koji sadrže nisko rastvorljive i nisko permeabilne lekovite supstance aciklovir, furosemid, valsartan ili norfloksacin. U okviru *in vitro* ispitivanja, ispitivan je uticaj medijuma različitih pH vrednosti (pH 1,2; pH 4,5 i pH 6,8) i, takozvanih, pojednostavljenih fiziološki zasnovanih medijuma koji simuliraju uslove u tankom crevu u preprandijalnom i postprandijalnom stanju (*Fasted state simulated intestinal fluid, FaSSIF* i *Fed state simulated intestinal fluid, FeSSIF*), bez i uz dodatak sintetskih surfaktanata. *In silico* modelovanje i simulacija obuhvatila je razvoj i validaciju fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela za predviđanje apsorpcije za četiri izabrane model supstance i njihovu primenu s ciljem identifikacije regionalne apsorpcije lekova i procene uticaja hrane primenom unapređenog prostornog modela apsorpcije i transporta u okviru programskog paketa GastroPlus™ (verzija 9.7, Simulation Plus Inc., SAD).

Na kraju disertacije, izneti su zaključci koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize, kao i spisak odgovarajućih literaturnih navoda, ukupno 564 reference, koje uključuju 216 literaturnih navoda korišćenih za formiranje baze podataka za analizu.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Primena tehnika za naprednu analizu podataka omogućila je da se na osnovu karakteristika lekovitih supstanci sadržanih u okviru seta podataka A razvije model za predviđanje intestinalne permeabilnosti u ljudi na osnovu vrednosti molekularnih deskriptora TPSA, HBD i HB. Set A sadrži 75 lekovitih supstanci sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama za koje postoje pouzdani podaci o efektivnoj permeabilnosti određeni u okviru *in vivo* studija intestinalne perfuzije kod ljudi objavljeni u literaturi, odnosno za koje je dostupna FIP Biowaiver monografija sa detaljnim pregledom podataka o odgovarajućim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama. S ciljem uspostavljanja veze između intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci i vrednosti odabranih molekularnih deskriptora, korišćena je tehnika nereakcentnih neuronskih mreža treniranih algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptroni. Neuronske mreže su razvijane pomoću softverske platforme RapidMiner Studio Free v.8.2.001 (RapidMiner GmbH, Dortmund, Germany). Za potrebe treninga i validacije veštačkih neuronskih mreža, lekovite supstance su podeljene u tri seta: (i) set za učenje

(training set), (ii) set za proveru (test set) i (iii) set za spoljašnju proveru (eksterni set). Dobijeni modeli su evaluirani i validirani na osnovu vrednosti sledećih statističkih parametara: kvadrat koeficijenta korelacije za unakrsnu validaciju (engl. *Square correlation coefficient of cross validation*, Q^2), koren srednjeg kvadratnog odstupanja za unakrsnu validaciju (engl. *Root mean squared error of cross validation*, RMSE_{cv}), kvadrat koeficijenta korelacije za test set (engl. *Square correlation coefficient of test set*, R^2_T) i koren srednjeg kvadratnog odstupanja za test set (engl. *Root mean squared error for test set*, RMSET) (243). Eksterni set je korišćen za praćenje performansi mreža tokom treniranja da bi se sprečilo preterano treniranje mreža.

Za identifikaciju fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci i njihovih kritičnih vrednosti primenjeno je hijerarhijsko klasterovanje na glavnim komponentama koje je uključilo sva tri seta podataka (A, B i C). Hijerarhijsko klasterovanje je sprovedeno prema Ward-ovom kriterijumu na osnovu procene varijanse (inercija) kao i na osnovu metode glavnih komponenti. Analiza je sprovedena pomoću programskog paketa FactoMineR v. 1.34, koji je deo softverske platforme R Studio v.3.5.2. (R Studio, Inc.).

Rezultati sprovedenih klaster analiza su pokazali da su određene supstance zbog ekstremnih vrednosti predominantnih varijabli u procesu klasterovanja smeštene u odvojene klustere bez obzira na kombinaciju ulaznih varijabli korišćenih u analizi. Dronabinol je prepoznat kao takva supstanca unutar grupe supstanci za koje je pokazana bioekvivalencija između čvrstog farmaceutskog oblika i oralnog rastvora (set B), a na osnovu visoke D/S vrednosti ($D/S = 3571$), kao i levotiroksin-natrijum na osnovu visokih PIK/D i C_{max}/D vrednosti i dugog poluvremena eliminacije ($t_{1/2} = 180$ h). Lekovite supstance su u slučaju seta podataka B grupisane u dva klastera. Međutim, u slučaju seta podataka C, lekovite supstance su grupisane u tri ili četiri klastera (kada se izuzmu klasteri sa samo jednom supstancom). Ovakvi rezultati ukazuju na veći nivo raznolikosti unutar grupe lekovitih supstanci koje pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost. Interesantno je da su klaster analize na zbirnom setu podataka rezultirale sa dva jasno definisana klastera bez obzira na to koja je kombinacija ulaznih varijabli primenjena. U slučaju klaster analize IV, kada su kao ulazni parametri korišćene sve varijable (njih 11), levotiroksin-natrijum je identifikovan kao jedina supstanca, koja je odvojena u poseban klaster zbog niske doze (200 µg) kojom su normalizovane PIK i C_{max} vrednosti.

Za razvoj modela za predviđanje efekta hrane je korišćen caret paket (R Studio v.3.5.2.). Zbirni set podataka (set B i set C) je podeljen na set za učenje (training set) i set za proveru (test set) pomoću desetostruke unakrsne validacije sa stratifikovanim uzorkovanjem u odnosu 7:3. U metodi stratifikovanog uzorkovanja set podataka se deli na podgrupe na osnovu vrednosti izlazne varijable tj. na ovaj način se kreiraju podsetovi čija distribucija vrednosti izlazne varijable odgovara distribuciji u celom setu podataka. Na training set je primenjena RandOverClassif funkcija dostupna u UBL paketu (R Studio v.3.5.2.), koja je omogućila da se veštački utrostruči i učetvorostruči broj primera lekovitih supstanci sa pozitivnim i negativnim efektom hrane, redom. Klasifikacioni modeli su kreirani pomoću algoritma slučajnih šuma (RF) i algoritma potpornih vektora sa polinomalnom kernel funkcijom (SVMPoly). Tokom treniranja modela primenjena je desetostruka unakrsna validacija. Klasifikacioni modeli su evaluirani na osnovu vrednosti osetljivosti (engl. *Sensitivity*), preciznosti klasifikacije (engl. *Precision*) i kappa vrednosti, koje su dobijene za

test set od 15 lekovitih supstanci. Analize su prvobitno sprovedene primenom RF i SVMPoly funkcija na trening set sa dva farmakokinetička parametra ($t_{1/2}$ i F_m) i svim biofarmaceutskim (D/S , F_a i P_{eff}) i fizičko-hemijskim parametrima ($clogP$, MW , $TPSA$ i HB) kao ulaznim varijablama. Međutim, kada su dobijeni modeli primenjeni na test set, koji je sadržao 15 lekovitih supstanci, kappa vrednosti su bile ispod željenog nivoa od 0,4, koji je preporučen u literaturi za *in silico* klasifikacione modele. Primenom varImp funkcije utvrđeno je da su u procesu klasifikacije učestvovala samo sledeće varijable: D/S , P_{eff} , F_m i $t_{1/2}$, te je uključivanje ostalih pet varijabli smanjilo prediktivnu moć klasifikacionih modela. Analize su ponovljene primenom RF i SVMPoly funkcija na trening set sa D/S , P_{eff} , F_m i $t_{1/2}$ kao ulaznim varijablama. RF parametri ($ntree$ i $mtry$) su bili podešeni na 500 i 2. SVMPoly parametri (*degree*, *scale* i *C*) su bili 1, 5 i 1. Kappa vrednosti za test set su bile 0,7521 za SVMPoly i 0,7345 za RF model što ukazuje na značajno slaganje između predviđenog i efekta hrane uočenog *in vivo*. Dok je preciznost u FE_{\downarrow} klasi bila 1 za oba modela, preciznost u FE_0 klasi za SVMPoly model je bila veća od RF modela (1 naspram 0,9), dok je RF model pokazao veću preciznost u poređenju sa SVMPoly modelom u FE_{\uparrow} klasi (0,67 prema 0,5). Oba modela su omogućila uspešnu klasifikaciju devet od deset lekovitih supstanci, iz test seta, u FE_0 klasu (osetljivost = 0,9), dve od dve lekovite supstance u FE_{\uparrow} klasu (osetljivost = 1) i dve od tri lekovite supstance u FE_{\downarrow} klasu (osetljivost = 0,67). Gu i saradnici (320) su dobili slične vrednosti za osetljivost po klasi kada su primenili model logističke regresije na set podataka od 92 lekovite supstance pri čemu su ulazne varijable bile maksimalna doza koja se može apsorbirati (engl. *Maximum absorbable dose* (MAD)), dozni broj i $\log D$. Međutim, ove vrednosti su se odnosile na trening set, jer model nije testiran na eksternom, nezavisnom setu podataka.

Četiri model lekovite supstance za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) su detaljno okarakterisane primenom fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela u kombinaciji sa rezultatima *in vitro* ispitivanja brzine rastvaranja aktivne supstance u različitim medijumima. Eksperimentalno je ispitan uticaj medijumima različitih pH vrednosti (pH 1,2; pH 4,5; pH 6,8) i, takozvanih, pojednostavljenih fiziološki zasnovanih medijuma (bez surfaktanata i uz dodatak sintetskih površinski aktivnih supstanci) koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu u uslovima primene leka na gladno, odnosno nakon obroka (preprandijalni i postprandijalni uslovi). Iako se radi o model supstancama koje su opisane kao nisko rastvorljive, rezultati sprovedenih *in vitro* ispitivanja su pokazali da je u svim ispitivanim medijumima, osim u medijumu pH 1,2, bez i uz dodatak sintetskih površinski aktivnih supstanci, postignuto brzo rastvaranje lekovitih supstanci (više od 80, odnosno 85% rastvoreno nakon 30 minuta). Jedino odstupanje uočeno je u slučaju norfloksacina usled postojanja interakcije sa natrijum-laurilsulfatom koja je poznata i opisana u literaturi.

Primenom unapređenog prostornog modela apsorpcije i tranzita (programski paket GastroPlusTM, Simulations Plus, SAD) razvijeni su i validirani fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli za predviđanje *in vivo* ponašanja za svaku od četiri izabrane model supstance. Razvijeni modeli su zatim uspešno primenjeni za predviđanje profila koncentracije ispitivanih lekovitih supstanci u plazmi u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima na osnovu profila brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima.

Za razliku od modela napredne analize podataka (RF model, algoritam slučajnih šuma) razvijenog u okviru ovog istraživanja, rezultati *in silico* simulacija primenom razvijenog PBPK modela ukazali su na odsustvo efekta hrane, osim u slučaju valsartana. Ovakvi rezultati su u skladu i sa donekle kontradiktornim rezultatima *in vivo* studija, s obzirom da je u slučaju valsartana i norfloksacina u nekim studijama uočeno odsustvo, a u nekim negativan uticaj hrane. Dobijeni rezultati ukazuju na složene i međusobno povezane faktore koji utiču na apsorpciju leka u uslovima primene nakon obroka, kao i preveliku diskriminatornost razvijenog RF modela.

Uparedna analiza rezultata biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci koje su u literaturi opisane kao nisko rastvorljive i nisko permeabilne, pokazala je da su sve četiri ispitivane lekovite supstance tipa slabih kiselina, koje pokazuju ograničenu rastvorljivost pri niskim vrednostima pH kakve postoje u želucu, na osnovu kojih su, u skladu sa kriterijumima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije okarakterisane kao „nisko rastvorljive“. Međutim, njihova rastvorljivost se sa porastom pH vrednosti povećava i ukazuje na mogućnost potpunog rastvaranja primenjene doze pri uslovima koji postoje u tankom crevu. Sve četiri ispitivane model supstance su komercijalno dostupne u obliku konvencionalnih neobloženih ili film tableta izrađenih uz primenu uobičajenih ekscipijenasa i bez dodatka pomoćnih supstanci koji olakšavaju kvašenje i rastvaranje, i u uslovima *in vitro* ispitivanja pokazuju brzo i kompletno rastvaranje aktivne supstance u svim medijumima pH vrednosti veće od 4,5.

Rezultati biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost ukazuju na to da su postojeći kriterijumi na kojima se zasniva procena rastvorljivosti u okviru Biofarmaceutskog sistema klasifikacije previše strogi i da ih je potrebno modifikovati kako bi se uspostavile biorelevantne granične vrednosti i kriterijumi za klasifikaciju lekova na osnovu rastvorljivosti, naročito kada se radi o lekovitim supstancama tipa slabih kiselina. U skladu sa navedenim, kao i rezultatima napredne analize podataka, kao kritičan parametar za biofarmaceutsku klasifikaciju supstanci izdvaja se permeabilnost definisana u vidu ternerne klasifikacije na visoko, umereno i nisko permeabilne lekovite supstance.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Tehnike za naprednu analizu podataka su u oblasti biofarmacije uglavnom korišćene za predviđanje parametara koji ukazuju na bioperformanse leka (kao što je procenat apsorbovane doze ili permeabilnost) na osnovu izračunatih molekulskih deskriptora i mogućnost klasifikacije lekovitih supstanci (1-17). U ovom istraživanju ispitana je mogućnost primene različitih tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova na uzorku od 128 model lekovitih supstanci koje su grupisane u tri seta podataka na osnovu opsežne analize dostupnih informacija o njihovim fizičko-hemijskim, biofarmaceutskim i farmakokinetičkim karakteristikama. Tehnika nereakcentnih neuronskih mreža treniranih algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptroni, je uspešno primenjena za razvoj modela za predviđanje intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci u ljudi na osnovu izabranih molekulskih deskriptora. Model je validiran na osnovu podataka o lekovitim supstancama koje su raspoređene u test, odnosno eksterni set podataka i može se koristiti za predviđanje permeabilnosti

lekovitih supstanci čije se vrednosti analiziranih deskriptora (TPSA, HBD i HB) nalaze u opsegu: [37,3–163] ± 37,71 za TPSA, [0–5] ± 1,5 za HBD i [2–11] ± 2,7 za HB. Primenom tehnika hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama i stabla odlučivanja na setu podataka koji je obuhvatio 64 lekovite supstance sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama, intestinalna permeabilnost (P_{eff}) je identifikovana kao kritičan parametar koji utiče na apsorpciju lekovitih supstanci, za razliku od rastvorljivosti (odnos doza/rastvorljivost (parametar D/S) je bila jedna od ulaznih varijabli za klaster analizu) koju algoritam ni u jednoj kombinaciji parametra nije identifikovao kao značajan. Ovakvi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja Newby i saradnika (15, 16) koji su primenom metode klasifikacionih i regresionih stabala (engl. *Classification and regression trees*, C&RTs) pokazali da rastvorljivost nije bila značajna za predviđanje apsorpcije lekovite supstance u meri u kojoj su očekivali tj. dobijeni rezultati su pokazali da je permeabilnost najvažniji faktor za predviđanje apsorpcije posle oralne primene lekovitog preparata. Pored „nisko permeabilnih ($P_{eff} < 1 \times 10^{-4}$ cm/s) i „visoko permeabilnih ($P_{eff} > 2,7 \times 10^{-4}$ cm/s) lekovitih supstanci prepoznata je i grupa „srednje permeabilnih“ supstanci, čije P_{eff} vrednosti variraju od 1 do $2,7 \times 10^{-4}$ cm/s. Takođe je uočeno da su nisko permeabilne supstance generalno okarakterisane vrednostima frakcije apsorbovanog leka (F_a) manjim od 50%, dok su supstance sa umerenom permeabilnošću okarakterisane F_a vrednostima u rasponu od 50 do 84%, a visoko permeabilne supstance vrednostima F_a većim od 85%. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje „ternernog“ sistema klasifikacije, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji ističu značaj uvođenja srednje klase za permeabilnost lekovitih supstanci u cilju boljeg predviđanja njihove apsorpcije (17, 18). Rezultati sprovedenih analiza pokazuju da visoke P_{eff} vrednosti mogu kompenzovati nisku rastvorljivost lekovite supstance tj. da se visoko permeabilne lekovite supstance mogu uspešno apsorbovati iz gastrointestinalnog trakta bez obzira na rastvorljivost određenu *in vitro*. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, koji ukazuju na to da će se visoko permeabilne lekovite supstance dovoljno dobro apsorbovati bez obzira na rastvorljivost jer će se zahvaljujući visokim vrednostima P_{eff} kompenzovati njihova niska rastvorljivost (18 - 20). Klaster analize sprovedene na setu od 27 lekovitih supstanci, za koje je u okviru *in vivo* studija pokazana biološka ekvivalentnost između oralno primenjenog rastvora i čvrstog farmaceutskog oblika (set podataka B) i setu sa 26 lekovitih supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (set podataka C), a potom i na zbirnom setu podataka B i C, su pokazale da je najveći broj lekovitih supstanci grupisano u dve klase, čije su granice definisane P_{eff} vrednostima od približno 2×10^{-4} cm/s i F_a i F_m vrednostima od 85% i 50%, redom.

Klasifikacioni modeli za predviđanje efekta hrane na apsorpciju lekovitih supstanci razvijeni su primenom algoritma slučajnih šuma (engl. *Random forests*, RF) i algoritma potpornih vektora sa polinomijalnom kernel funkcijom (engl. *Support vector machine with polynomial kernel function*, SVMPoly). Kao ulazni parametri razmatrani su: odnos doza/rastvorljivost (D/S), efektivna permeabilnosti (P_{eff}), obim metabolizma (F_m) i poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$). Oba modela su omogućila relativno uspešno predviđanje efekta hrane za test set, ali je samo RF model zadržao prihvatljiv stepen predikcije kada su modeli testirani na nepoznatom, eksternom setu lekovitih supstanci (κ vrednost > 0,4). Dobijeni rezultati ukazuju na to da se efekat hrane verovatno neće ispoljiti kod lekovitih supstanci koje se obimno metabolišu, imaju nizak odnos doza/rastvorljivost, te kratko poluvreme eliminacije i visoku permeabilnost, za razliku od lekovitih supstanci koje

se slabo metabolišu i imaju nisku permeabilnost i kratko poluvreme eliminacije za koje se očekuje negativni efekat hrane, odnosno smanjen obim i brzina apsorpcije u uslovima primene uz obrok). Pozitivan efekat hrane, odnosno povećanog obima apsorpcije u uslovima primene uz obrok se može očekivati u slučaju lekovitih supstanci koje imaju visok odnos doza/rastvorljivost, visoku permeabilnost i visok stepen metabolizma. Ovakvi rezultati su dobijeni i u nedavno objavljenoj studiji u okviru koje je sprovedena meta analiza uticaja hrane na apsorpciju lekova koji predstavljaju supstrat za efluks transportere u gastrointestinalnom traktu (21).

Uparedna biofarmaceutska karakterizacija izabranih model supstanci za koje se u literaturi navodi da pokazuju nisku rastvorljivost i nisku permeabilnost (aciklovir, furosemid, valsartan i norfloksacin) pokazala je da su sve četiri ispitivane lekovite supstance tipa slabih kiselina, koje pokazuju ograničenu rastvorljivost pri niskim vrednostima pH kakve postoje u želucu, usled čega su, u skladu sa kriterijumima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije okarakterisane kao „nisko rastvorljive“. Međutim, njihova rastvorljivost se sa porastom pH vrednosti povećava i ukazuje na mogućnost potpunog rastvaranja primenjene doze pri uslovima koji postoje u tankom crevu. Sve četiri ispitivane model supstance su komercijalno dostupne u obliku konvencionalnih neobloženih ili film tableta izrađenih uz primenu uobičajenih ekscipijenasa i bez dodatka pomoćnih supstanci koji olakšavaju kvašenje i rastvaranje, i u uslovima *in vitro* ispitivanja pokazuju brzo i kompletno rastvaranje aktivne supstance u svim medijumima pH vrednosti veće od 4,5. Ovakvi rezultati dodatno podržavaju istraživačke inicijative koje ukazuju na potrebu da se postojeći regulatorni kriterijumi za biofarmaceutsku klasifikaciju lekova preispitaju i revidiraju kako bi se uspostavile biorelevantne granične vrednosti i kriterijumi za klasifikaciju, naročito kada se radi o lekovitim supstancama tipa slabih kiselina (22).

Primenom unapređenog prostornog modela apsorpcije i tranzita (programski paket GastroPlus™, Simulations Plus, SAD) razvijeni su i validirani fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli za predviđanje *in vivo* ponašanja za svaku od četiri izabrane model supstance. Razvijeni modeli su zatim uspešno primenjeni za predviđanje profila koncentracije ispitivanih lekovitih supstanci u uslovima primene na gladno i nakon obroka na osnovu profila brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem. Za razliku od modela napredne analize podataka (RFmodel, algoritam slučajnih šuma) razvijenog u okviru ovog istraživanja, rezultati *in silico* simulacija primenom razvijenog PBPK modela ukazali su na odsustvo efekta hrane, osim u slučaju valsartana. Ovakvi rezultati su u skladu i sa donekle kontradiktornim rezultatima *in vivo* studija, s obzirom da je u slučaju valsartana i norfloksacina u nekim studijama uočeno odsustvo, a u nekim negativan uticaj hrane. Dobijeni rezultati ukazuju na složene i međusobno povezane faktore koji utiču na apsorpciju leka u uslovima primene nakon obroka i u skladu su sa rezultatima nedavno objavljenih studija koje su se odnosile na istraživanje mogućnosti primene fiziološki zasnovanih farmakokinetičkih modela kao alata za predviđanje efekta hrane na apsorpciju lekova (23).

Reference

1. Balakin KV. Pharmaceutical data mining: approaches and applications for drug discovery. Hoboken, NJ : Wiley; 2009. Balakin KV. Pharmaceutical data mining: approaches and applications for drug discovery. Hoboken, NJ : Wiley; 2009.

2. Niwa T. Using General Regression and Probabilistic Neural Networks To Predict Human Intestinal Absorption with Topological Descriptors Derived from Two-Dimensional Chemical Structures. *J Chem Inf Comput Sci*. 2003;43(1):113-9.
3. Wessel MD, Jurs PC, Tolan JW, Muskal SM. Prediction of Human Intestinal Absorption of Drug Compounds from Molecular Structure. *J Chem Inf Comput Sci*. 1998;38(4):726-35.
4. Dorronsoro I, Chana A, Abasolo MI, Castro A, Gil C, Stud M, et al. CODES/Neural Network Model: a useful tool for in silico prediction of oral absorption and blood-brain barrier permeability of structurally diverse drugs. *QSAR Comb Sci*. 2004;23(2-3):89-98.
5. Paixão P, Gouveia LF, Morais JAG. Prediction of the in vitro permeability determined in Caco-2 cells by using artificial neural networks. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41(1):107-17.
6. Fujiwara S-i, Yamashita F, Hashida M. Prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of MO-calculation and neural network. *Int J Pharm*. 2002;237(1):95-105.
7. Di Fenza A, Alagona G, Ghio C, Leonardi R, Giolitti A, Madami A. Caco-2 cell permeability modelling: a neural network coupled genetic algorithm approach. *J Comput Aided Mol Des*. 2007;21(4):207-21.
8. Diukendjieva A, Tsakovska I, Alov P, Pencheva T, Pajeva I, Worth AP, et al. Advances in the prediction of gastrointestinal absorption: Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) modelling of PAMPA permeability. *Comput Toxicol* 2019;10:51-9.
9. Chatzizacharia K, Hatzivramidis D. New frames of reference for mapping drugs in the four classes of the BCS and BDDCS into regions with clear boundaries. *AIChE Journal*. 2015;61(11):3570-9.
10. Daousani C, Macheras P, Karalis V. Understanding the Linkage between Pharmacokinetic Properties and the Two Classification Systems: BCS and BDDCS. Denver, CO: AAPS Annual Meeting and Exposition; 2016.
11. Khandelwal A, Bahadduri PM, Chang C, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Computational models to assign biopharmaceutics drug disposition classification from molecular structure. *Pharm Res*. 2007;24(12):2249-62.
12. Pham-The H, Garrigues T, Bermejo M, Gonzalez-Alvarez I, Monteagudo MC, Cabrera-Perez MA. Provisional classification and in silico study of biopharmaceutical system based on caco-2 cell permeability and dose number. *Mol Pharm*. 2013;10(6):2445-61.
13. Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, et al. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. *J Pharm Sci*. 2019.
14. Hou T, Wang J, Li Y. ADME Evaluation in Drug Discovery. 8. The Prediction of Human Intestinal Absorption by a Support Vector Machine. *J Chem Inf Model*. 2007;47(6):2408-15.
15. Newby D, Freitas AA, Ghafourian T. Comparing multilabel classification methods for provisional biopharmaceutics class prediction. *Mol Pharm*. 2014;12(1):87-102.
16. Newby D, Freitas AA, Ghafourian T. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. *Eur J Med Chem*. 2015;90:751-65.
17. Bergström CA, Strafford M, Lazorova L, Avdeef A, Luthman K, Artursson P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J Med Chem*. 2003;46(4):558-70.
18. Macheras P, Karalis V. A non-binary biopharmaceutical classification of drugs: The ABF system. *Int J Pharm*. 2014;464(1-2):85-90.
19. Butler JM, Dressman JB. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J Pharm Sci*. 2010;99(12):4940-54.
20. Fagerholm U. Evaluation and suggested improvements of the Biopharmaceutics Classification System (BCS). *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(6):751-7.

21. Sharma S, Prasad B. Meta-Analysis of Food Effect on Oral Absorption of Efflux Transporter Substrate Drugs: Does Delayed Gastric Emptying Influence Drug Transport Kinetics? *Pharmaceutics* 2021, 13(7), 1035.
22. Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:152-63.
23. Cheng L, Wong H. Food Effects on Oral Drug Absorption: Application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling as a Predictive Tool, *Pharmaceutics* 2020, 12(7), 672.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u vidu dva rada u međunarodnim naučnim časopisima sa SCI liste i dva saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u celini ili u izvodu. Podaci o publikovanim radovima dati su u nastavku.

1. Gatarić B, Parojčić J. An investigation into the factors governing drug absorption and food effect prediction based on data mining methodology. *AAPS Journal.* 2019;22(1):11.

a. **Naziv časopisa:** *AAPS Journal / American Association of Pharmaceutical Scientists*

b. **Impakt faktor (2019):** 3,737

c. **Kategorija:** M21

d. **Rang časopisa u oblasti Pharmacology & Pharmacy:** 72/271

2. Gatarić B, Parojčić J. Application of data mining approach to identify drug subclasses based on solubility and permeability. *Biopharm Drug Dispos.* 2019; 40(2): 51-61.

a. **Naziv časopisa:** *Biopharmaceutics and Drug Disposition*

b. **Impakt faktor (2020):** 1,627

c. **Kategorija:** M23

d. **Rang časopisa u oblasti Pharmacology & Pharmacy:** 244/275

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34)

Gatarić B, Parojčić J. Application of cluster analysis to identify drug subclasses based on dose number and permeability. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 22-24.9.2016. Belgrade, Serbia, Book of Proceedings.p. 153-154

Gatarić B, Parojčić J. Data mining of physicochemical, biopharmaceutical and pharmacokinetic properties of model drugs exhibiting low solubility and low permeability. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology 20-22.9.2018. Szeged, Hungary, Book of Abstracts.p.192-193

E. ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DISERTACIJE

Rezultati sprovedenih istraživanja ukazuju na mogućnost primene različitih tehnika za naprednu analizu podataka s ciljem identifikacije, klasifikacije i predviđanja faktora koji mogu uticati na apsorpciju lekovitih supstanci iz gastrointestinalnog trakta i, komplementarno sa drugim *in silico* i *in vitro* metodama, značajno doprineti biofarmaceutskoj karakterizaciji lekovitih supstanci.

Primenom tehnike nerekurzivnih neuronskih mreža treniranih algoritmom povratne propagacije, višeslojni perceptroni, uspešno je razvijen model za predviđanje intestinalne permeabilnosti lekovitih supstanci u ljudi na osnovu izabranih molekulskih deskriptora (TPSA, HBD i HB). Model je validiran na osnovu podataka o lekovitim supstancama koje su raspoređene u test, odnosno eksterni set podataka i može se koristiti za predviđanje permeabilnosti lekovitih supstanci čije se vrednosti analiziranih deskriptora nalaze u sledećem opsegu: $[37,3-163] \pm 37,71$ za TPSA, $[0-5] \pm 1,5$ za HBD i $[2-11] \pm 2,7$ za HB.

Primenom tehnika hijerarhijskog klasterovanja na glavnim komponentama i stabla odlučivanja na setu podataka od 64 lekovite supstance sa različitim fizičko-hemijskim i biofarmaceutskim osobinama, intestinalna permeabilnost (P_{eff}) je identifikovana kao kritičan parametar koji utiče na apsorpciju lekovitih supstanci. Pored „nisko” permeabilnih ($P_{eff} < 1 \times 10^{-4}$ cm/s) i „visoko” permeabilnih ($P_{eff} > 2,7 \times 10^{-4}$ cm/s) lekovitih supstanci prepoznata je i grupa „srednje” permeabilnih lekovitih supstanci, čije P_{eff} vrednosti variraju od 1 do $2,7 \times 10^{-4}$ cm/s. Takođe je uočeno da su nisko permeabilne supstance generalno okarakterisane vrednostima frakcije apsorbovanog leka (F_a) manjim od 50%, dok su supstance sa umerenom permeabilnošću okarakterisane F_a vrednostima u rasponu od 50 do 84%, a visoko permeabilne supstance vrednostima F_a većim od 85%. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje „ternernog” sistema klasifikacije, što je u skladu sa rezultatima drugih autora koji ističu značaj uvođenja „srednje” klase za permeabilnost lekovitih supstanci u cilju boljeg predviđanja njihove apsorpcije.

Mogućnost predviđanja uticaja hrane na apsorpciju lekovitih supstanci ispitivana je primenom algoritma slučajnih šuma (RF) i algoritma potpornih vektora sa polinomalnom kernel funkcijom (SVMPoly), pri čemu su kao ulazni parametri korišćeni odnos doza/rastvorljivost (D/S), efektivna permeabilnost (P_{eff}), obim metabolizma (F_m) i poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$). Oba modela su relativno uspešno predviđala efekat hrane za test set, ali je RF model zadržao prihvatljiv stepen predikcije kada su modeli testirani na nepoznatom, eksternom setu lekovitih supstanci, uz kappa vrednost 0,48.

Primenom unapređenog prostornog modela apsorpcije i tranzita (programski paket GastroPlusTM, Simulations Plus, SAD) razvijeni su i validirani fiziološki zasnovani farmakokinetički modeli za predviđanje *in vivo* ponašanja za svaku od četiri izabrane model supstance. Razvijeni modeli su zatim uspešno primenjeni za predviđanje profila koncentracije ispitivanih lekovitih supstanci u plazmi u preprandijalnim i postprandijalnim uslovima na osnovu profila brzine rastvaranja iz komercijalno dostupnih uzoraka tableta sa trenutnim oslobađanjem u različitim medijumima.

Uporedna analiza rezultata biofarmaceutske karakterizacije izabranih model supstanci koje su u literaturi opisane kao nisko rastvorljive i nisko permeabilne, pokazala je da su sve četiri ispitivane lekovite, kao supstance tipa slabih kiselina, koje pokazuju ograničenu

rastvorljivost pri niskim vrednostima pH kakve postoje u želucu, u skladu sa kriterijumima Biofarmaceutskog sistema klasifikacije okarakterisane kao „nisko rastvorljive“. Međutim, njihova rastvorljivost se sa porastom pH vrednosti povećava i ukazuje na mogućnost potpunog rastvaranja primenjene doze pri uslovima koji postoje u tankom crevu. Sve četiri ispitivane model supstance su komercijalno dostupne u obliku konvencionalnih neobloženih ili film tableta izrađenih uz primenu uobičajenih ekscipijenasa i bez dodatka pomoćnih supstanci koji olakšavaju kvašenje i rastvaranje, i u uslovima *in vitro* ispitivanja pokazuju brzo i kompletno rastvaranje aktivne supstance u svim medijumima pH vrednosti veće od 4,5.

Kritička analiza dobijenih rezultata ukazuje na potrebu da se postojeći, regulatorno prihvaćeni, kriterijumi za biofarmaceutsku karakterizaciju lekova preispitaju i revidiraju kako bi se uspostavile biorelevantne granične vrednosti i kriterijumi za klasifikaciju, naročito kada se radi o lekovitim supstancama tipa slabih kiselina. U skladu sa navedenim, kao i rezultatima napredne analize podataka, kao kritičan parametar za biofarmaceutsku klasifikaciju supstanci izdvaja se permeabilnost definisana u vidu ternerne klasifikacije na visoko, umereno i nisko permeabilne lekovite supstance.

Prikazani rezultati predstavljaju značajan doprinos razvoju računarskih, *in silicom* metoda za biofarmaceutsku karakterizaciju lekova koje omogućavaju uvid u složene odnose između različitih, fizičko-hemijskih, biofarmaceutskih i farmakokinetičkih karakteristika lekovitih supstanci i njihovog uticaja na apsorpciju i biološku raspoloživost oralno primenjenih lekova.

F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd završena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 7% i posledica je podudarnosti ličnih imena, citata, reči korišćenih u opisu metodologije i uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja. Obim podudaranja sa tekstovima iz drugih izvora bio je najviše 2%. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da je priložena doktorska disertacija kandidata mag. farm. Biljane Gatarić originalno naučno delo.

G. PREDLOG KOMISIJE ZA OCENU ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata mag. farm. Biljane Gatarić, pod nazivom „Primena tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova: identifikacija, klasifikacija i predviđanje faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci“, čija je izrada odobrena na sednici Veća naučnih oblasti medicinskih nauka na Univerzitetu u Beogradu održanoj 25.02.2020. godine, napisana je tako da prikaže pregled aktuelnih istraživanja u oblasti biofarmaceutske karakterizacije lekova i njihov značaj, sadrži jasno postavljene istraživačke ciljeve, odgovarajuću metodologiju za sprovođenje istraživanja, detaljno prikazane rezultate istraživanja praćene adekvatnom diskusijom i zaključcima, tako da i po svom sadržaju i po formi, ispunjava sve kriterijume koji se zahtevaju za adekvatno napisano originalno naučno delo. Rezultati doktorske disertacije su objavljeni u okviru dva rada u međunarodnim časopisima sa SCI liste i dva

saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima. U skladu sa navedenim, članovi Komisije sa zadovoljstvom predlažu Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o izrađenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „Primena tehnika za naprednu analizu podataka u biofarmaceutskoj karakterizaciji lekova: identifikacija, klasifikacija i predviđanje faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju lekovitih supstanci“ i kandidatu mag. farm. Biljani Gatarić odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Beograd, 9.7.2021. godine

Članovi Komisije

Dr sc. Jelena Parojčić, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

Dr sc. Žarko Gagić, docent
Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet