

**mgr Lidia Gurba-Bryśkiewicz**

**Zastosowanie statystycznych metod planowania eksperymentów  
(DoE, Design of Experiments) w podejściu QbD  
(Quality by Design) do rozwoju technologii innowacyjnych  
substancji czynnych i produktów leczniczych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

**Promotor: dr hab. Wioleta Maruszak**



DZIAŁ CHEMII MEDYCZNEJ  
LABORATORIUM ANALIZ  
FIZYKOCHEMICZNYCH

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa rok 2024

---

## Dedykacje

Składam serdeczne podziękowania Pani Promotor dr hab. Wiolecie Maruszak za poświęcony czas, okazane wsparcie i motywowanie, dzielenie się wiedzą w trakcie wykonywania badań, przygotowania publikacji oraz cenne wskazówki merytoryczne podczas pisania niniejszej pracy.

Dziękuję Krzysztofowi Dubielowi, Dyrektorowi Działu Chemii Medycznej Celon Pharma S.A. za umożliwienie rozwoju i wykonania badań w obszarze tematyki rozprawy.

Dziękuję członkom zespołu: Damianowi Smudze, Urszuli Dawid, Monice Delis, Damianowi Tuzowi i Łukaszowi Markiewiczowi za życzliwość oraz pozytywną współpracę.

Dziękuję współautorom publikacji wchodzących w skład rozprawy, za owocną i merytoryczną współpracę.

Dziękuję dr hab. Piotrowi J. Rudzkiemu za wspierające zainteresowanie i motywowanie do przygotowania pracy doktorskiej.

Rodzinie i Przyjaciołom dziękuję za pełne wsparcia zainteresowanie.

Serdecznie dziękuję Teresie za nieocenione wsparcie i budowanie wiary w moje możliwości.

Szczególne podziękowania składam mojemu mężowi Marcinowi i córce Oldze za obecność, pomoc, życzliwość, zainteresowanie i codzienne wsparcie.

---

## Nazwy i numery projektów badawczych

Badania do pracy doktorskiej wykonywano w ramach realizacji następujących projektów badawczych:

1. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma S.A., projekt nr POIR.01.01.01-00-0382/16 „Selektywny inhibitor kinaz JAK w terapii chorób o podłożu immunologicznym”.
2. Agencja Badań Medycznych oraz Celon Pharma S.A., projekt nr 2021/ABM/05/00005 “TransformRNA—mRNA Therapeutics generation platform” w programie Development of Innovative Therapeutic Solutions using RNA technology.
3. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A., projekt nr POIR.01.02.00-00-0085/18 „KICHAI - Rozwój przedkliniczny i kliniczny innowacyjnego inhibitora kinazy PI3 delta jako kandydata w terapii chorób o podłożu zapalnym”.
4. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A., projekt nr STRATEGMED2/266776/17/NCBR/2015 „CELONKO – Opracowanie nowoczesnych biomarkerów oraz rozwój innowacyjnego inhibitora kinaz FGFR stosowanego w terapii nowotworów”.

**Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską**

Cykl publikacji będący podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora stanowią następujące publikacje wchodzące w skład dorobku naukowego:

- P1** **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Dawid U., Smuga D. A., Maruszak W., Delis M., Szymczak K., Stypik B., Moroz A., Błocka A., Mroczkiewicz M., Dubiel K., Wieczorek M.;  
Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies;  
Int. J. Mol. Sci., **2022**, 23, 10720 <https://doi.org/10.3390/10.3390/ijms231810720>  
IF: 5,6; MNiSW: 140
- P2** **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Smuga D. A., Dubiel K., Wieczorek M.;  
Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery;  
Biomedicines, **2023**, 11, 2752, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102752>  
IF: 4,7; MNiSW: 100
- P3** Michałek S., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Zagozda M., Maj A. M., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;  
The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415);  
RSC Adv., 2022, 12, 33605-33611, <https://doi.org/10.1039/d2ra07003k>  
IF: 3,9; MNiSW: 100
- P4** Michałek S., Maj M. A., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Zagozda M., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;  
Development and optimization of a continuous flow ester reduction with LiAlH<sub>4</sub> in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415);  
React. Chem. Eng., **2023**, Advanced Article, <https://doi.org/10.1039/D2RE00561A>  
IF: 3,9; MNiSW: 100
- P5** Michałek S., Powąła A., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Piórkowska N., Olejkowska P., Yamani A., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;  
Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor;  
Monatsh Chem, **2023**, 154, 1307–1314, <https://doi.org/10.1007/s00706-023-03121-z>  
IF: 1,8; MNiSW: 40

**Sumaryczny IF: 19,9; MNiSW: 480**

## 1. Spis treści

Dedykacje.....	2
Nazwy i numery projektów badawczych .....	3
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską .....	4
1. Spis treści.....	5
2. Wykaz stosowanych skrótów.....	7
3. Streszczenie w języku polskim .....	9
4. Streszczenie w języku angielskim (Abstract) .....	11
5. Wstęp teoretyczny.....	13
5.1. Wprowadzenie.....	13
5.2. Koncepcja Quality by Design (QbD).....	14
5.2.1. Profil jakości docelowego produktu (Quality Target Product Profile, QTTP) ....	15
5.2.2. Krytyczne atrybuty jakości (Critical Quality Attributes, CQAs).....	15
5.2.3. Krytyczne parametry procesu (Critical Process Parameters, CPPs) .....	16
5.2.4. Krytyczne atrybuty materiałów (Critical Material Attributes, CMAs) .....	16
5.2.5. Analiza ryzyka.....	16
5.2.6. Planowanie doświadczeń (Design of Experiments, DoE).....	17
5.2.7. Strategia kontroli .....	18
5.2.8. Analytical Quality by Design (AQbD).....	19
5.3. Koncepcja Design of Experiments (DOE).....	20
5.3.1. Przestrzeń projektowa (Design Space, DS).....	25
6. Założenia i cel pracy .....	27
7. Omówienie publikacji w kontekście tematyki pracy doktorskiej.....	28
7.1. Publikacja P1 .....	28
7.2. Publikacja P2.....	40
7.3. Publikacja P3 .....	43
7.4. Publikacja P4.....	51
7.5. Publikacja P5.....	58
8. Podsumowanie i wnioski .....	62
9. Bibliografia .....	65
10. Kopie opublikowanych prac .....	71
10.1. Publikacja P1.....	71
10.2. Publikacja P2.....	95

---

10.3. Publikacja P3.....	135
10.4. Publikacja P4.....	167
10.5. Publikacja P5.....	194
11. Dodatkowa działalność naukowa.....	210
12. Analiza bibliometryczna – Biblioteka WUM.....	217
13. Oświadczenia współautorów publikacji .....	220
13.1. Publikacja P1.....	220
13.2. Publikacja P2.....	231
13.3. Publikacja P3.....	235
13.4. Publikacja P4.....	242
13.5. Publikacja P5.....	249

## 2. Wykaz stosowanych skrótów

DoE	(ang. <i>Design of Experiments</i> ) planowanie eksperymentów
QbD	(ang. <i>Quality by Design</i> ) jakość przez projekt
AQbD	(ang. <i>Analytical Quality by Design (AQbD)</i> ) analityczna jakość przez projekt
EMA	(ang. <i>European Medicines Agency</i> ) Europejska Agencja Leków
FDA	(ang. <i>Food and Drug Administration</i> ) Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
cGMP	(ang. <i>Current Good Manufacturing Practices</i> ) Bieżąca Dobra Praktyka Wytwarzania
ICH	(ang. <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> ) Międzynarodowa Rada ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Środków Farmaceutycznych Stosowanych u Ludzi
QTTP	(ang. <i>Quality Target Product Profile</i> ) profil jakości docelowego produktu
CQAs	(ang. <i>Critical Quality Attributes</i> ) krytyczne atrybuty jakości
CMAs	(ang. <i>Critical Material Attributes</i> ) krytyczne atrybuty materiałów
CPPs	(ang. <i>Critical Process Parameters</i> ) krytyczne parametry procesu
DS	(ang. <i>Design Space</i> ) przestrzeń projektowa
ANOVA	analiza wariancji
R <sup>2</sup>	współczynnik determinacji
FTA	(ang. <i>Fault Tree Analysis</i> ) analiza drzewa błędów
FMEA	(ang. <i>Failure Mode and Effects Analysis</i> ) analiza przyczyn i skutków wad
ZTE	założenia techniczno – ekonomiczne
CCD	(ang. <i>Central Composite Design</i> ) plan centralny kompozycyjny
API	(ang. <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> ) substancja czynna
HPLC	(ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) wysokosprawna chromatografia cieczowa
UHPLC	(ang. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> ) ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa
JAK	kinaza Janusa
ROCK	kinaza związana z Rho
RP	(ang. <i>Reverse Phase</i> ) fazy odwrócone
MS	(ang. <i>Mass Spectrometry</i> ) spektrometria mas
UV	promieniowanie ultrafioletowe
ATP	(ang. <i>Analytical Target Profile</i> ) analityczny profil docelowy
CMAs	(ang. <i>Critical Method Attributes</i> ) krytyczne atrybuty metody
CMPs	(ang. <i>Critical Method Parameters</i> ) krytyczne parametry metody
MODR	(ang. <i>Method Operable Design Region</i> ) operacyjna przestrzeń projektowa metody
R <sub>s</sub>	współczynnik rozdzielania
A <sub>s</sub>	współczynnik symetrii piku
ACN	acetonitryl
MeOH	metanol
logP	współczynnik podziału n-oktanol/woda
logD	współczynnik dystrybucji
pK <sub>a</sub>	ujemny logarytm dziesiątej stałej dysocjacji kwasowej
CH <sub>1</sub> logD	chromatograficznie wyznaczony współczynnik hydrofobowości
clogD	obliczony teoretycznie współczynnik dystrybucji
USP	(ang. <i>United States Pharmacopoeia</i> ) Farmakopea Amerykańska

---

C18	oktadecylowa faza stacjonarna
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNA-LNP	nanocząstki lipidowe w kwasem rybonukleinowym
COVID-19	coronavirus disease 2019, choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2
PAT	(ang. <i>Process Analytical Technology</i> ) technologia analizy procesowej
PEG	(ang. <i>poly(ethylene glycol)</i> ) glikol polietylenowy
PDI	(ang. <i>Polidispersity Index</i> ) współczynnik polidispersyjności
FFD	(ang. <i>Full Factorial Design</i> ) pełny plan czynnikowy, (ang. <i>Fractional Factorial Design</i> ) frakcyjny plan czynnikowy
DSD	(ang. <i>Definitive Screening Design</i> ) ostateczny plan przesiewowy
RSM	(ang. <i>Response Surface Methodology</i> ) metodologia powierzchni odpowiedzi
SVEM	(ang. <i>Self Validated Ensemble Model</i> ) samouczące się modele grupujące
PI3K	3-kinaza fosfoinozytydu
SLE	toczeń rumieniowaty układowy
SM	(ang. <i>Starting Material</i> ) materiał wyjściowy
TEACl	chlerek tetraetyloamoniowy
DMA	dimetyloamina
DMP	ftalan dimetylu
DMF	dimetyloformamid
LAH	wodorek litowo-glinowy (LiAlH <sub>4</sub> )
THF	tetrahydrofuran
RT	temperatura pokojowa
PFA	polifluoroalkil
DIBAL-H	wodorek diizobutyloglinu
pan-FGFR	(ang. <i>pan-Fibroblast Growth Factor Receptor</i> ) receptor czynnika wzrostu pan-fibroblastów



### 3. Streszczenie w języku polskim

Celem pracy było wykazanie użyteczności zastosowania podejścia QbD oraz zaawansowanych narzędzi statystycznych planowania eksperymentów (DoE) w różnych obszarach rozwoju innowacyjnych substancji czynnych i produktów leczniczych: opracowaniu metod analitycznych umożliwiających monitorowanie jakości procesów i produktów na różnych etapach wytwarzania substancji i produktów leczniczych, opracowaniu i optymalizacji składu i postaci produktów leczniczych oraz opracowaniu i optymalizacji metody syntezy API na różnych etapach rozwoju technologii.

Stosując podejścia AQbD oraz DoE, obejmujące badania przesiewowe, optymalizację i walidację, opracowano metodę UHPLC ilościowego oznaczania pełnego profilu dziewięciu zanieczyszczeń innowacyjnej substancji farmaceutycznej CPL409116 (inhibitor JAK/ROCK). Krytyczne parametry metody (CMP) zostały przetestowane w szerokim zakresie: rodzaj fazy stacjonarnej (8 różnych kolumn), pH wodnej fazy ruchomej (2,6, 3,2, 4,0, 6,8) oraz początkowa (20 – 25%) i końcowa (85 – 90%) zawartość organicznej fazy ruchomej (ACN). Krytycznymi atrybutami metody (CMA) były rozdzielczość pomiędzy pikami ( $\geq 2,0$ ) i współczynnik symetrii pików analitów (0,8 – 1,8). Na etapie badań przesiewowych oceniono wpływ różnych poziomów CMP na CMA w oparciu o pełny plan czynnikowy  $2^2$ . Odporność metody potwierdzono z zastosowaniem ułamkowego planu czynnikowego  $2^{(4-1)}$ . Wygenerowano operacyjny zakres metody (MODR). Symulację Monte-Carlo zastosowano do obliczenia prawdopodobieństwa, że parametry CMA spełniają wymagania specyfikacji. Końcowe, optymalne parametry metody były następujące: kolumna Zorbax Eclipse Plus C18, wodna faza ruchoma 10mM 1mM wodny roztwór HCOOH o pH 2,6,  $20\% \pm 1\%$  ACN na początku i  $85\% \pm 1\%$  ACN na końcu gradientu, temperatura kolumny  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Metodę zwalidowano zgodnie z wytyczną ICH Q2(R1). Opracowana metody spełniła wymagania liniowości, precyzji i odporności. LOQ wyniosło 0,05%, a LOD 0,02% dla wszystkich zanieczyszczeń.

Skuteczne wykorzystanie koncepcji QbD i/lub DoE do optymalizacji składu i postaci produktów leczniczych przedstawiono na przykładzie rozwoju nanocząstek lipidowych do dostarczania różnych rodzajów RNA. W pracy przeglądowej zebrano badania opublikowane w ciągu ostatnich dziesięciu lat, prezentujące najnowsze trendy i wymagania regulacyjne, a także narzędzia projektowania statystycznego. W większości prac optymalizacyjnych zastosowano podejście DoE. Omówiono różne plany i metody oraz innowacyjne podejścia w ramach DoE. Oprócz tradycyjnie stosowanych testów i modelowania statystycznego (ANOVA, analiza regresji) wykorzystano także metody sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego. Pełne QbD opisano w kilku artykułach, a kilka odnosiło się do wybranych aspektów QbD.

Kolejnym obszarem, gdzie wykazano korzyści z zastosowania podejścia DoE jest synteza API. Użycie DoE pozwoliło poznać i skutecznie zoptymalizować prowadzenie dwóch etapów procesu wytwarzania innowacyjnej substancji czynnej CPL302415 (inhibitora PI3K $\delta$ ) w reaktorach przepływowych: etapu utleniania katalizowanego Pd oraz etapu redukcji grupy estrowej. Zastosowanie różnych narzędzi podejścia DoE pozwoliło znaleźć istotne czynniki wpływające na efektywność procesu oraz określić zakres operacyjny pozwalający na uzyskanie maksymalnej wydajności produktów. Zoptymalizowane warunki utleniania katalitycznego pozwoliły na uzyskanie wydajności produktu 84%. W przypadku etapu redukcji metodą katalityczną ponad 98%, a redukcji z użyciem LAH 83%.

Zastosowanie podejścia DoE pozwoliło także na skuteczną optymalizację parametrów syntezy innowacyjnej substancji aktywnej CPL304110 (inhibitora pan-FGFR) w reaktorze przepływowym. Wykonanie kilkunastu eksperymentów w oparciu o plan centralny kompozycyjny (CCD)  $2^4$  z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym oraz metodologię

powierzchni odpowiedzi, pozwoliło na skrócenie czasu prowadzenia reakcji do 2 minut w temperaturze 20°C i ekwiwalencie szczawianu dietylu i etanolanu sodu 1,23, przy zadowalającej wydajności 84%.

**Słowa kluczowe:** Analityczna Jakość przez Projekt (AQbD); Planowanie eksperymentów (DOE); Operacyjna Przestrzeń Projektowa Metody (MODR); profil zanieczyszczeń; rozwój metody analitycznej; CPL409116; inhibitor JAK/ROCK; nanocząstki lipidowe (LNP); dostarczanie RNA; CPL302415; inhibitor PI3K $\delta$ , CPL304110; inhibitor pan-FGFR, reaktor przepływowy

#### 4. Streszczenie w języku angielskim (Abstract)

##### **Application of statistical methods of Design of Experiments (DoE) in the Quality by Design (QbD) approach for the development of innovative active substances and drug products technologies**

The aim of the work was to demonstrate the usefulness of using advanced statistical tools for the design of experiments (DoE) and the QbD approach in various areas of the development of innovative active substances and drug products: developing analytical methods for monitoring the quality of processes and products at various stages of manufacturing substances and drug products, developing and optimizing the composition and formulation of drug products, development and optimization of API synthesis methods at various stages of technology development.

Using AQbD and DoE approaches, including screening, optimization and validation, a UHPLC method was developed to quantify the full profile of nine impurities of the innovative pharmaceutical substance CPL409116 (JAK/ROCK inhibitor). Critical method parameters (CMP) were tested in a wide range: type of stationary phase (8 different columns), pH of the aqueous mobile phase (2.6, 3.2, 4.0, 6.8) and start (20 – 25%) and alloy (85 – 90%) per cent organic mobile phase (ACN). The critical method attributes (CMA) were peak-to-peak resolution (2.0) and analyte peak symmetry factor (0.8 – 1.8). At the screening stage, the impact of different CMP levels on CMA was assessed based on a full fractional design  $2^2$ . The robustness of the method was confirmed using a  $2^{(4-1)}$  fractional factorial design. The method operational range (MODR) was generated. Monte-Carlo simulation was used to calculate the probability of meeting the CMA specifications. The final method parameters were as follows: Zorbax Eclipse Plus C18 column, aqueous mobile phase  $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$  aqueous HCOOH solution with pH 2.6,  $20\% \pm 1\%$  ACN at the beginning and  $85\% \pm 1\%$  ACN at the end gradient and column temperature  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . The method was validated according to ICH Q2(R1) guidelines. The developed method met the requirements of linearity, precision and robustness. The LOQ was 0.05% and LOD 0.02% for all impurities.

The effective use of the QbD and/or DoE concept to optimize the composition and formulation of drug products is demonstrated in the example of the development of lipid nanoparticles for the various types of RNA delivery. The review summarised research published over the last ten years, presenting the latest trends and regulatory requirements, as well as mathematical and statistical design methods. Most of the optimization work used the DoE approach. Various methods of designing and innovative approaches to DoE were discussed. In addition to the traditional tests and statistical modelling (ANOVA, regression analysis), artificial intelligence and machine learning methods were also used. The full QbD approach was described in a few articles, and a few refer to some aspects of QbD.

The API synthesis is another area where using the DoE approach benefits have been demonstrated. The use of DoE made it possible to learn and effectively optimize two stages of the production process of the innovative active substance CPL302415 (PI3K $\delta$  inhibitor) in flow reactors: the Pd-catalyzed oxidation stage and the ester group reduction stage. The use of various tools of the DoE approach allowed us to find important factors influencing the efficiency of the process and to determine the operational scope allowing for maximum product efficiency. Optimized catalytic oxidation conditions allowed for a product yield of 84%. In the case of the catalytic reduction stage, over 98%, and for reduction using LAH, 83%.

The use of the DoE approach also allowed for the effective optimization of the synthesis parameters of the innovative active substance CPL304110 (pan-FGFR inhibitor) in a flow reactor. Performing seventeen experiments based on the central composition design (CCD)  $2^4$  with two repetitions at the central point and the response surface methodology allowed the

reduction of the reaction time to 2 minutes at 20°C and the equivalent of diethyl oxalate and sodium ethoxide 1.23, with a satisfactory product yield of 84%.

**Keywords:** Analytical Quality by Design (AQbD); design of experiment (DOE); method operable design region (MODR); pharmaceutical impurity profiling; CPL409116; JAK/ROCK inhibitor; lipid nanoparticle (LNP); RNA delivery; CPL302415; PI3K $\delta$  inhibitor, CPL304110; pan-FGFR inhibitor, flow chemistry

## 5. Wstęp teoretyczny

### 5.1. Wprowadzenie

Poszukiwanie, projektowanie oraz produkcja innowacyjnych substancji i produktów leczniczych, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi prawa farmaceutycznego (EMA – European Medicines Agency, FDA - Food and Drug Administration), jest bardzo wyrafinowanym, zaawansowanym technologicznie przedsięwzięciem. Opracowanie nowych, bezpiecznych i skutecznych leków jest długim, trudnym i kosztownym procesem.

W ostatnich latach nastąpiły ważne zmiany wspomagające działania w tym obszarze. Opracowano nowoczesne systemy zarządzania jakością i zarządzania ryzykiem, uwzględniające procesy produkcyjne, kontrolne i dystrybucyjne [1–3]. Narzędzia te umożliwiają producentom leków wykrywanie, analizowanie, korygowanie i zapobieganie problemom, przy jednoczesnym ciągłym doskonaleniu procesu wytwarzania [4–6].

Modernizacja mająca na celu poprawę standardów produkcji farmaceutycznej ma początek regulacyjny we wprowadzonej w 2002 r. przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (US FDA) koncepcji „Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices (cGMPs) for the 21st century” (Bieżące Zasady Dobrej Praktyki Wytwarzania w Farmacji dla 21 wieku) opisującej nowy kierunek rozwoju zasad dobrej praktyki wytwarzania stosowanych do zarządzania produkcją leków i jakością produktu [7,8]. Zwrócono uwagę na fakt, że jakość nie może być oceniana jedynie przez badanie produktu, powinna być „wbudowana w produkt” lub zagwarantowana przez projekt. W tym celu zaleca się przeprowadzenie systematycznych prospektywnych badań, w oparciu o naukowo uzasadnioną metodykę, zorientowanych na ocenę ryzyka i uwzględniających holistyczną naturę przedmiotu. Rozwiązania te nazwano „Jakość przez Projekt” (Quality by Design, QbD).

Po inicjatywie FDA i wprowadzeniu koncepcji cGMP, Międzynarodowa Rada ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Środków Farmaceutycznych Stosowanych u Ludzi (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) ustanowiła szereg nowych wytycznych regulacyjnych (Q8(R2), Q9(R1), Q10, Q11) [9–12], gdzie zaleca się wdrożenie koncepcji QbD do przemysłu farmaceutycznego [9].

Wytyczna ICH Q8(R2) określa QbD jako systematyczne podejście do rozwoju leków oparte na wcześniej zdefiniowanych celach, zrozumieniu produktu i procesów, rzetelnej wiedzy naukowej, kontroli procesu oraz zarządzaniu ryzykiem jakości.

Pozostałe wytyczne ICH Q9 – Q11 wspomagają realizację QbD odnosząc się do nowoczesnych systemów zapewnienia jakości w zakresie informacji o produkcji, systemach zarządzania jakością i zarządzaniu ryzykiem.

Statystyczne planowanie doświadczeń (Design of Experiments, DoE) stanowi kluczową rolę w koncepcji QbD. Planowanie doświadczeń to specyficzne metody empirycznego i półempirycznego modelowania badanych procesów i statystycznej analizy danych pomiarowych, które umożliwiają uzyskanie znacznej ilości wiarygodnych informacji przy zachowaniu ograniczeń narzucanych na liczbę realizowanych pomiarów. Zastosowanie DoE umożliwia zatem uzyskanie maksimum informacji przy minimalnym czasie i oszczędnym budżecie. Celem DoE jest zdefiniowanie tzw. przestrzeni projektowej (Design Space, DS), czyli takich zakresów zmiennych, które gwarantują najwyższą jakość optymalizowanych parametrów procesu, metody badania, produktu itp.

Stosowanie podejścia QbD oraz DoE zmniejsza koszty optymalizacji procesu wytwarzania i finalnie leku, ponieważ jakość jest budowana podczas całego procesu produkcji, a nie jest weryfikowana głównie poprzez testowanie produktów gotowych, a także przynosi korzyści dla bezpieczeństwa pacjentów – zapewniając, że otrzymają oni leki wyższej jakości w krótszym czasie.

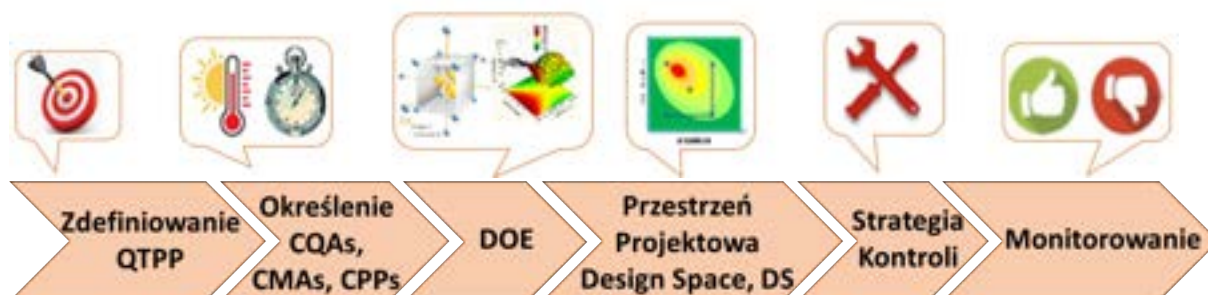
Pierwotnie metodologia QbD koncentrowała się na rozwoju technologii farmaceutycznej, ale ostatnio została także wdrożona do rozwoju i optymalizacji metod analitycznych i nazwana Analytical Quality by Design (AQbD).

## 5.2. Koncepcja Quality by Design (QbD)

Zastosowanie podejścia QbD w rozwoju produkcji farmaceutycznej obejmuje następujące etapy (**Rysunek 1**):

- zdefiniowanie głównego profilu jakości docelowego produktu – właściwości produktu o kluczowym znaczeniu dla pacjentów (Quality Target Product Profile, QTTP),
- określenie krytycznych atrybutów jakości – cech produktu o krytycznym znaczeniu dla jakości (Critical Quality Attributes, CQAs),
- określenie krytycznych atrybutów materiałów – cech składników produktu (Critical Material Attributes, CMAs),
- określenie krytycznych parametrów procesu (Critical Process Parameters, CPPs),
- wykonanie DoE (Design of Experiments) – optymalizacja procesu technologicznego, zakresów operacyjnych parametrów krytycznych,

- zdefiniowanie przestrzeni projektowej (Design Space, DS) procesu, z której powstaje produkt końcowy o pożądanym QTTP,
- identyfikacja parametrów wpływających na wydajność procesu i przyczyn zmienności,
- opracowanie strategii kontroli i analizy ryzyka,
- ciągle monitorowanie i doskonalenie procesu produkcyjnego [2–4,8,9,13].



**Rysunek 1.** Schemat podejścia Quality by Design (QbD) w rozwoju produkcji farmaceutycznej (opracowanie własne).

### 5.2.1. Profil jakości docelowego produktu (Quality Target Product Profile, QTTP)

Według ICH Q8(R2) [9] profil jakości docelowego produktu (QTTP) to „prospektywne podsumowanie cech jakościowych produktu leczniczego, które w idealnym przypadku zostaną osiągnięte w celu zapewnienia pożądanej jakości, biorąc pod uwagę bezpieczeństwo i skuteczność produktu leczniczego”.

QTTP obejmuje wsparcie bezpieczeństwa klinicznego i efektywności produktu leczniczego oraz stanowi podstawę do projektowania i optymalizacji procesu. QTTP to zbiór atrybutów produktu, które decydują o jego jakości, skuteczności i bezpieczeństwie dla pacjenta. Według FDA QTTP koncentruje się na etapach rozwoju chemicznego, rozwoju produkcji i kontroli [7,9].

QTTP definiuje charakterystykę leku i odnosi się do parametrów, takich jak zastosowanie kliniczne, droga i sposób podawania, dawka terapeutyczna, postać farmaceutyczna, opakowanie, czynniki wpływające na parametry farmakokinetyczne i kryteria jakości produktu końcowego, takie jak stabilność podczas przechowywania, sterylność i uwalnianie.

QTTP jest wskaźnikiem optymalizacji parametrów procesu, zapewnia, że krytyczne atrybuty jakości (Critical Quality Attributes, CQAs) mieszczą się w pożądanym zakresie [1–4,8,13].

### 5.2.2. Krytyczne atrybuty jakości (Critical Quality Attributes, CQAs)

CQAs to cechy fizyczne, chemiczne, biologiczne lub mikrobiologiczne, które należy kontrolować, aby zapewnić odpowiednią jakość produktu [9]. CQAs to parametry wpływające na QTTP i mające kluczowe znaczenie dla jakości produktu. Są one na ogół

związane z doбором odpowiednich ilości substancji pomocniczych i substancji aktywnych [1–4,8,13].

### **5.2.3. Krytyczne parametry procesu (Critical Process Parameters, CPPs)**

CPPs to krytyczne parametry produkcyjne, które wpływają na CQA, a tym samym na jakość produktu końcowego. CPPs powinny być monitorowane i kontrolowane w procesie produkcyjnym. Reprezentowane są przez zmierzoną lub obliczoną charakterystykę systemu lub procesu i zazwyczaj są to właściwości materiałów lub procesów wpływających na produkcję, takie jak, np. temperatura i ilość składników.

### **5.2.4. Krytyczne atrybuty materiałów (Critical Material Attributes, CMAs)**

CMAs to krytyczne właściwości materiałów, które muszą osiągnąć odpowiednie limity, aby zagwarantować jakość substancji pomocniczych, produktów leczniczych i innych materiałów używanych w procesie.

Ważne jest, aby podczas wdrażania podejścia QbD identyfikować różnicę między CQAs (dane wyjściowe) a CMAs (dane wejściowe). Na przykład CQAs produktu pośredniego danego etapu mogą stać się CMAs półproduktu na następnym etapie produkcji.

Zgodnie z wytyczną ICH Q9(R1) „Zarządzanie ryzykiem w jakości” [10], identyfikacja możliwych przyczyn zmienności procesów oraz skuteczna analiza ryzyka ma kluczowe znaczenie podczas optymalizacji procesów. Analizę ryzyka można wykonać w etapach początkowych lub końcowych optymalizacji procesu, powtarzając ją lub przeddefiniowując w razie potrzeby. Tym samym jakość produktu finalnego weryfikowana jest na podstawie dotychczasowych doświadczeń w zakresie wyznaczania CQAs, CPPs i oceny ryzyka [8,10,14].

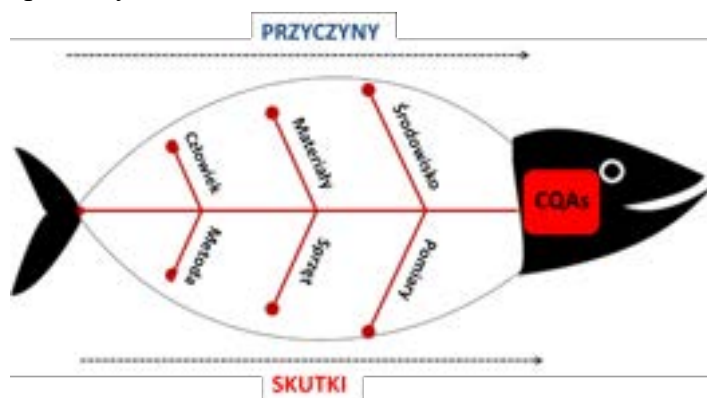
### **5.2.5. Analiza ryzyka**

Ocena ryzyka służy do określenia prawdopodobieństwa wystąpienia szkody i strat, które szkoda może spowodować, w szczególności jej konsekwencji dla bezpieczeństwa pacjenta. W ramach analizy ryzyka należy podjąć decyzję, które ryzyka można zaakceptować, a które należy minimalizować. Według ICH Q9(R1) zarządzanie ryzykiem wiąże się z procedurami, które należy wdrożyć w celu jego ograniczenia [10]. W wytycznej tej przedstawiono przykłady powszechnie stosowanych narzędzi zarządzania ryzykiem. Do oceny ryzyka na podstawie danych eksperymentalnych wykorzystuje się analizę wariancji (ANOVA) lub analizę regresji wielokrotnej. Równanie matematyczne zależności między zmiennymi można wyprowadzić za pomocą analizy regresji wielokrotnej. Za pomocą



ANOVA ocenia się istotność statystyczną wpływu każdego czynnika i efektów interakcji [14]. Identyfikacja QTPP, CQAs i CPPs wymaga doświadczenia i wiedzy odnośnie procesu, ponieważ stosowane są różne narzędzia oceny ryzyka, m.in. ranking i filtrowanie ryzyka, diagram Ishikawy, analiza drzewa błędów (Fault Tree Analysis, FTA), analiza przyczyn i skutków wad (Failure Mode and Effects Analysis, FMEA) [4,10].

Typowy diagram przyczynowo - skutkowy określający prawdopodobne przyczyny zmienności procesu i ich wpływ na CQAs produktu leczniczego przedstawiono na **Rysunku 2**. Podstawowe obszary zmienności to: człowiek, metody, materiały, sprzęt, środowisko, pomiary.



**Rysunek 2.** Schemat diagramu przyczynowo - skutkowego określający prawdopodobne przyczyny zmienności procesu i ich wpływ na CQAs produktu leczniczego (opracowanie własne na podstawie [15]).

### 5.2.6. Planowanie doświadczeń (Design of Experiments, DoE)

Planowanie doświadczeń (Design of Experiments, DoE) w świetle definicji z ICH Q8(R2) [9] jest najbardziej efektywnym kompromisem w trójkącie decyzyjnym każdego procesu (**Rysunek 3**) – pozwala na uzyskanie maksimum informacji przy minimalnym nakładzie czasu i oszczędnym budżecie.



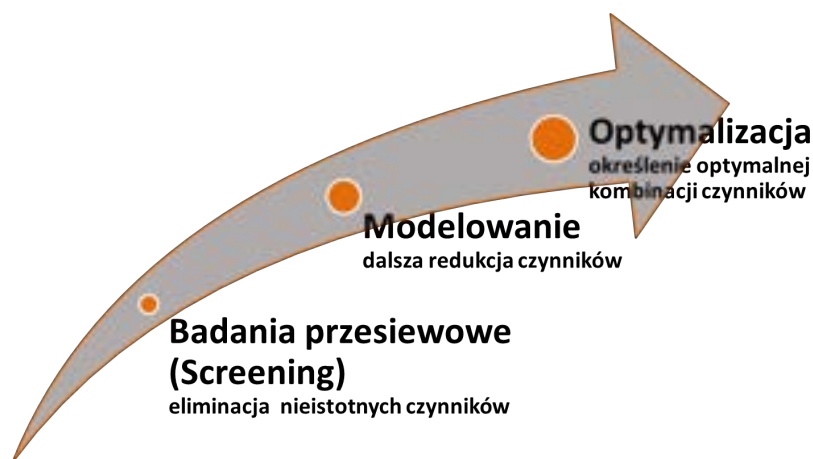
**Rysunek 3.** Schemat trójkąta decyzyjnego procesu (opracowanie własne).

Narzędzie DoE jest najbardziej innowacyjnym elementem QbD, wymagającym specjalistycznej wiedzy matematyczno - statystycznej oraz odpowiednich narzędzi obliczeniowych. Jednocześnie realizacja DoE dostarcza najbardziej rzetelnych, opartych

na obliczeniach, danych i wiedzy o zależnościach między parametrami wpływającymi na jakość produktu i efektywność procesu.

Podejście DoE może być zastosowane do wielu różnych celów (**Rysunek 4**):

- Selekcja czynników,
  - rozpoznanie istotnych wielkości wejściowych,
  - ograniczenie zakresu, czasu i kosztów badań,
- Stabilizacja procesu,
  - ograniczenie zmienności wielkości wyjściowych procesu, poprawa powtarzalności,
  - ograniczenie liczby wad,
  - zmniejszenie liczby interwencji korygujących,
- Optymalizacja procesu,
  - identyfikacja czynników istotnych,
  - optymalizacja wartości wejściowych dających maksymalną wydajność procesu i jakość produktu,
- Modelowanie procesu („gdybanie”),
  - opracowanie matematycznego modelu procesu,
  - prognozowanie wartości wyjściowych bez konieczności eksperymentu.



**Rysunek 4.** Obszary zastosowania DoE (opracowanie własne).

### 5.2.7. Strategia kontroli

Strategia kontroli jest bardzo ważnym krokiem w celu zabezpieczenia wydajności procesu i jakości produktu. Proces kontroli należy dokładnie zaplanować w oparciu o informacje o produkcji i procesie [11].

W podejściu QbD strategia kontroli jest realizowana podczas rozwoju produktu i pozwala na głębsze zrozumienie procesu i produktu. Opcje strategii kontroli za pomocą QbD

są bardziej efektywne w obszarach wymagających więcej czasu i specjalistycznej wiedzy, dostarczając więcej informacji niż w przypadku standardowego podejścia. W tym nowatorskim podejściu do jakości farmaceutycznej, jakość produktu końcowego buduje się poprzez identyfikację i kontrolę optymalnego zakresu zmiennych produkcyjnych. Gotowe produkty są ostatecznie testowane w celu potwierdzenia jakości [16].

Opracowanie skutecznej strategii kontroli rozpoczyna się od zdefiniowania QTPP. Pierwsze badania skupiają się na charakterystyce substancji czynnej oraz krytycznych właściwościach fizycznych, chemicznych, biologicznych i mikrobiologicznych produktu leczniczego.

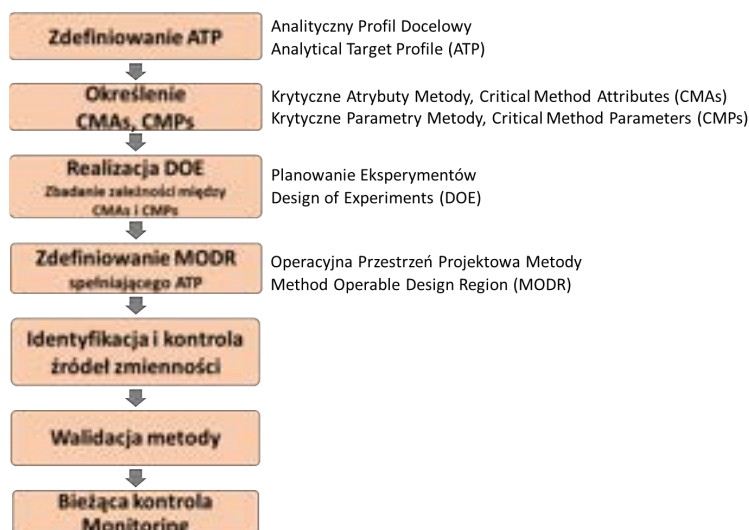
Na tym etapie definiowany jest także rozwój procesu. Na przykład, jeśli składnik aktywny ma niską rozpuszczalność w wodzie, postać tabletki o natychmiastowym uwalnianiu musi zapewniać wystarczające rozpuszczenie leku. Badania toksyczności przeprowadzone na wczesnych etapach zapewniają wyjściową ocenę profilu zanieczyszczeń substancji czynnej. Szczegółowa analiza mechanizmu i warunków powstawania oraz metod usuwania zanieczyszczeń, pozwala na opracowanie szczegółowych elementów i etapów strategii kontroli jakości, a także zdefiniowanie kryteriów i metod akceptacji uwzględnionych w specyfikacjach. Opracowując strategię kontroli należy uwzględnić także zasady zarządzania ryzykiem określone w ICH Q9(R1) [10,16].

Podczas produkcji strategia ciągłej kontroli umożliwia zrozumienie i stabilizację procesu. Dodatkowo stosowanie podejścia QbD umożliwia bieżącą aktualizację, modyfikację i ciągłe udoskonalanie strategii kontroli.

#### **5.2.8. Analytical Quality by Design (AQbD)**

Szczególną odmianą QbD jest AQbD – zastosowanie QbD do opracowania metod analitycznych. Na przestrzeni ostatnich lat pojawiło się wiele publikacji podkreślających podejście chemometryczne projektowania eksperymentów (DoE, design of experiments), jako nowego narzędzia w dziedzinie analizy farmaceutycznej, szczególnie przy optymalizacji i walidacji metod chromatograficznych i technik pokrewnych [17-28].

Schemat postępowania przy opracowaniu AQbD (**Rysunek 5**) jest analogiczny do ogólnego podejścia QbD. Poszczególne kroki są takie same, odmienne są jedynie nazwy i definicje poszczególnych parametrów.

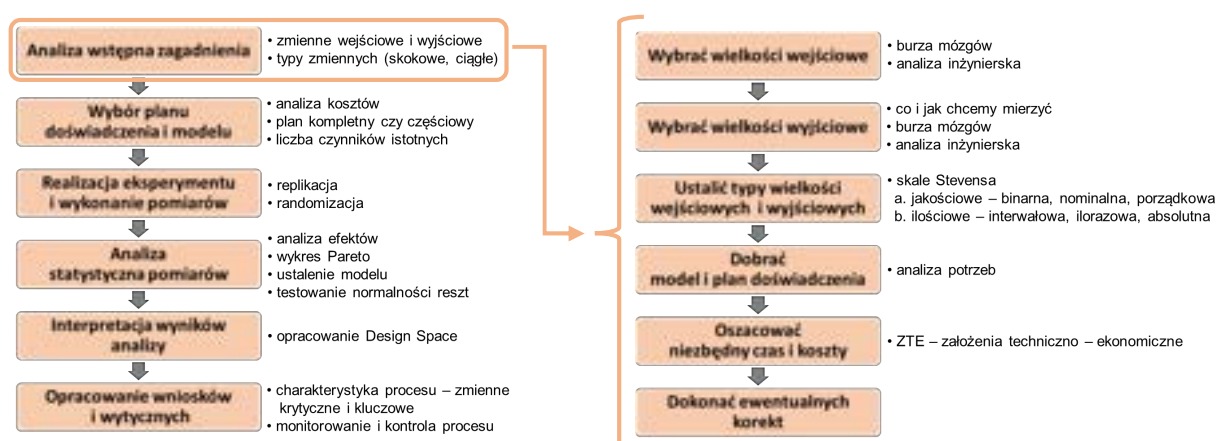


Rysunek 5. Schemat podejścia AQbD (opracowanie własne na podstawie [26]).

Szczegółowe zastosowanie podejścia AQbD przedstawiłam w **Publikacji 1**.

### 5.3. Koncepcja Design of Experiments (DOE)

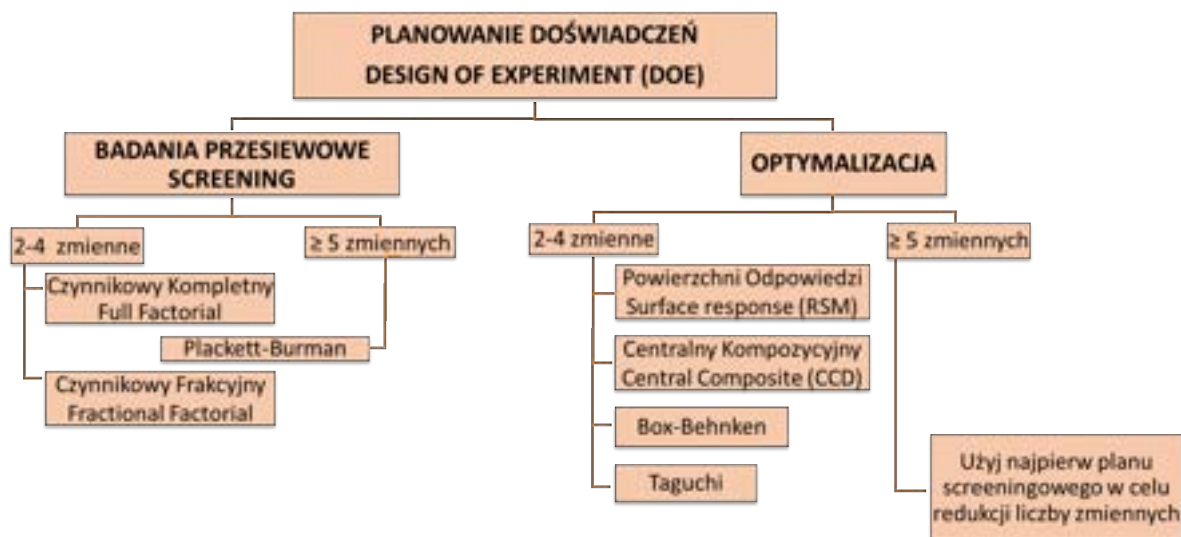
Planowanie doświadczeń (Design of Experiments, DoE) wg ICH Q8(R2) [9] to: specyficzne metody empirycznego i półempirycznego modelowania badanych procesów i statystycznej analizy danych pomiarowych, które umożliwiają uzyskanie znacznej ilości wiarygodnych informacji przy zachowaniu ograniczeń narzucanych na liczbę realizowanych pomiarów, a tym samym na koszt badań i termin ich wykonania. Realizacja DoE opiera się na szczegółowej analizie zagadnienia, zaprojektowaniu doświadczeń odpowiednio do celu badań, wykonaniu eksperymentów oraz analizie statystycznej i interpretacji wyników. Schemat postępowania podczas realizacji podejścia DoE przedstawiono na **Rysunku 6**.



Rysunek 6. Schemat realizacji podejścia DoE (opracowanie własne).

Początkowym i bardzo ważnym etapem opracowania podejścia DoE jest dokładna analiza zagadnienia i odpowiednie zaplanowanie eksperymentów.

Pierwszym kryterium doboru odpowiedniego planu eksperymentów jest ilość analizowanych zmiennych wejściowych oraz cel DoE, którym może być screening i wybór istotnych zmiennych lub optymalizacja i opracowanie przestrzeni projektowej (Design Space, DS). Schemat doboru planu eksperymentów w zależności od celu zastosowania DoE przedstawiono na **Rysunku 7**.



**Rysunek 7.** Schemat doboru odpowiedniego planu eksperymentów w zależności od celu zastosowania DoE (opracowanie własne na podstawie [29]).

Drugim kryterium doboru planów eksperymentów jest typ zmiennych wejściowych. W zależności od rodzaju zmiennych wejściowych stosujemy różne plany i analizy statystyczne (**Rysunek 8**).

			Wielkości wyjściowe					
			Dyskretne			Ciągłe		
			binarne	nominalne	porządkowe	interwałowe	ilorazowe	absolutne
Wielkości wejściowe	Dyskretne	binarne	Regresja logistyczna binarna	Regresja logistyczna nominalna	Regresja logistyczna porządkowa	<b>Plany czynnikowe: kompletne, frakcyjne, Metoda Taguchi</b>  <b>Powierzchnia odpowiedzi (RSM), Plany dla mieszanin</b>		
		nominalne						
		porządkowe						
	Ciągłe	interwałowe						
		ilorazowe						
		absolutne						

**Rysunek 8.** Typy zmiennych wejściowych i wyjściowych i odpowiadające im rodzaje planów eksperymentalnych oraz analiz statystycznych ([29]).

Liczba eksperymentów jakie należy wykonać rośnie wykładniczo wraz z liczbą analizowanych zmiennych. Na **Rysunku 9** przedstawiono jak zmienia się liczba koniecznych do wykonania eksperymentów planów dwuwartościowych kompletnych i frakcyjnych (badane zmienne są na dwóch poziomach).

**Liczba zmiennych**

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
4	$2^2$	$2^{3-1}$												
8		$2^3$	$2^{4-1}$	$2^{5-1}$	$2^{6-1}$	$2^{7-1}$								
16			$2^4$	$2^{5-1}$	$2^{6-2}$	$2^{7-2}$	$2^{8-4}$	$2^{9-4}$	$2^{10-4}$	$2^{11-7}$	$2^{12-8}$	$2^{13-8}$	$2^{14-10}$	$2^{15-11}$
32				$2^5$	$2^{6-1}$	$2^{7-2}$	$2^{8-2}$	$2^{9-4}$	$2^{10-5}$	$2^{11-5}$	$2^{12-7}$	$2^{13-8}$	$2^{14-8}$	$2^{15-10}$
64					$2^6$	$2^{7-1}$	$2^{8-2}$	$2^{9-3}$	$2^{10-4}$	$2^{11-5}$	$2^{12-6}$	$2^{13-7}$	$2^{14-8}$	$2^{15-9}$
128						$2^7$	$2^{8-1}$	$2^{9-2}$	$2^{10-3}$	$2^{11-4}$	$2^{12-5}$	$2^{13-6}$	$2^{14-7}$	$2^{15-8}$
256							$2^8$	$2^{9-1}$	$2^{10-2}$	$2^{11-3}$	$2^{12-4}$	$2^{13-5}$	$2^{14-6}$	$2^{15-7}$
512								$2^9$	$2^{10-1}$	$2^{11-2}$	$2^{12-3}$	$2^{13-4}$	$2^{14-5}$	$2^{15-6}$

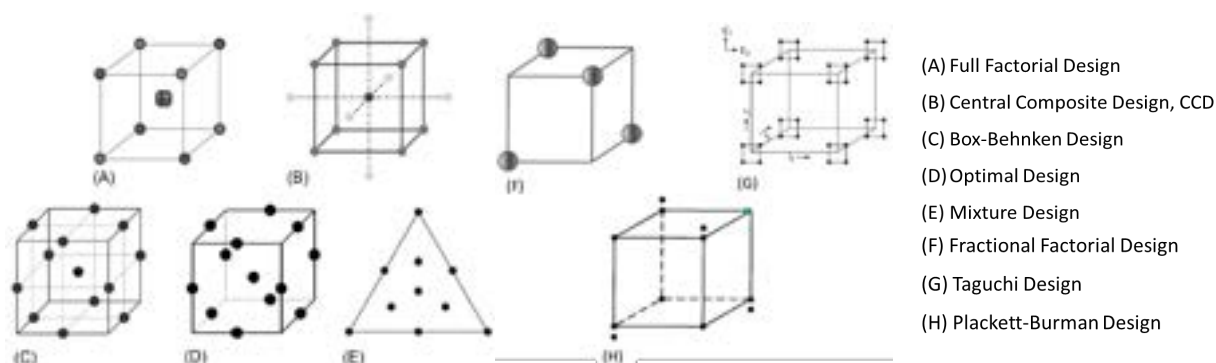
**Liczba eksperymentów**

**Rysunek 9.** Liczba koniecznych do wykonania eksperymentów planów dwuwartościowych pełnych (białe) i frakcyjnych (zielone, żółte, czerwone) [30].

Uwzględniając powyższą prawidłowość, w zależności od celu oraz nakładów czasowych i finansowych stosuje się szereg różnych wieloczynnikowych planów eksperymentów.

Istnieje wiele różnych rodzajów planów eksperymentów, można je rozróżnić na podstawie wyprowadzonego modelu (liniowy lub kwadratowy, z interakcjami lub bez), ilości poziomów czynników oraz celu badania (screening, optymalizacja).

Wśród najbardziej efektywnych do optymalizacji i uzyskania dokładnych modeli matematycznych, pozwalających na analizę efektów głównych i interakcyjnych dwu i więcej wymiarowych przestrzeni eksperymentalnych stosuje się kompletne (pełne) plany czynnikowe (full factorial designs), plany centralne kompozycyjne (central composite design), plany Box-Behnken'a, plany optymalne i plany dla mieszanin, których schematy przedstawiono na **Rysunku 10** (A - E). Natomiast wśród najczęściej stosowanych planów do badań przesiewowych wyróżnia się: ułamkowe (frakcyjne) plany czynnikowe (fractional factorial design), plany Taguchi oraz plany Plackett-Burman'a przedstawione schematycznie na **Rysunku 10** (F-H):



**Rysunek 10.** Schematy planów eksperymentów dla trzech zmiennych wejściowych [31].

Plany czynnikowe, będące podstawą DoE, obejmują eksperymenty dla każdej kombinacji poziomów analizowanych czynników. Pełne projekty czynnikowe mają każdą możliwą kombinację czynników na wyznaczonych poziomach. Wykonywany jest każdy eksperyment.

Natomiast ułamkowe plany czynnikowe stanowią specyficzny podzbiór pełnego planu. Wykonywana jest część eksperymentów pozwalająca na obliczenie określonych współczynników modelu.

Plany czynnikowe dwupoziomowe są stosowane zwykle do badań przesiewowych i pozwalają na określenie efektów głównych i interakcyjnych (ale nie wyższych rzędów), a frakcjonowanie prowadzi do projektów, które dają tylko główne efekty [32].

Projekty dwupoziomowe mogą prowadzić jedynie do liniowych modeli odpowiedzi, a zatem nie mogą dostarczać informacji o maksimach ani żadnych zależnościach nieliniowych. Z kolei wadą pełnych planów czynnikowych na poziomach większych niż dwa jest duża liczba eksperymentów. Projekty, które pozwalają na analizę większej liczby poziomów bez przeprowadzania eksperymentów na każdej kombinacji poziomów czynników, obejmują przestrzeń czynnikową z większą liczbą punktów w pobliżu centrum. Jednym z takich projektów jest plan centralny kompozycyjny (Central Composite Design, CCD) będący złożeniem dwupoziomowego planu czynnikowego z punktami gwiazdnymi i punktem w centrum. Punkty gwiazdne mogą leżeć w równej odległości od centrum lub mogą leżeć na ścianach przestrzeni planu.

Projekt Boxa-Behnken'a zbudowany jest z trzech lub więcej poziomów bez punktów gwiazdnych i ekstremów. Może być stosowany do problemów mających trzy lub więcej czynników, o których wiadomo, że wartości optymalne leżą w środku zakresów czynników [32].

Wraz z rozwojem technik obliczeniowych wymagania stawiane planom eksperymentów polegające na ułatwianiu obliczeń związanych z wyznaczaniem współczynników modelu

stały się mniej istotne. Ważniejsze stało się opracowanie takich metod planowania eksperymentów, które umożliwiały niezależne szacowanie współczynników modelu. Nastąpił rozwój planów optymalnych, w których optymalizowano wartości wariancji określonych parametrów w analizie modelu metodą regresji. Najpopularniejsze plany optymalne to plany: D-, E-, A-, G- oraz V-optymalne. Plan D-optymalny minimalizuje wartość uogólnionej wariancji parametrów modelu. Plan E-optymalny minimalizuje wartość największej wariancji parametrów modelu. Plan A-optymalny minimalizuje średnią wariancję parametrów modelu. Plany G-(V)-optymalne polegają natomiast na minimalizacji największej (średniej) wartości wariancji prognozowanej wartości funkcji modelu w punktach stanowiących plan eksperymentu. Mając listę dopuszczalnych punktów oraz zadaną liczbę układów, program dokona takiego wyboru punktów, aby zoptymalizować odpowiednie kryterium. Takie poszukiwanie najlepszego planu nie jest metodą dokładną, lecz raczej procedurą algorytmiczną, która używa pewnych strategii przeszukiwania w celu znalezienia najlepszego planu w sensie odpowiedniego kryterium optymalizacji [33].

Specjalny rodzaj planu dla mieszanin (mixture design) stosuje się przy analizie mieszaniny składników, które muszą się sumować do wartości stałej. Powszechnie stosowanym sposobem przedstawienia udziałów mieszanin najczęściej złożonych z nie więcej niż trzech składników są wykresy we współrzędnych trójkątnych (potrójnych; ang. triangular, ternary). Mieszanina trzech składników może być jednoznacznie określona poprzez podanie punktu w układzie współrzędnych trójkątnych zdefiniowanych przez trzy zmienne [33]. Przestrzeń planu jest więc płaszczyzną trójkątną.

W przypadku konieczności uwzględnienia dużej liczby zmiennych w celu identyfikacji tych, które wpływają na wielkość wyjściową, można zastosować plan doświadczenia Plackett-Burman'a, który pozwala na zbadanie jak największej liczby głównych efektów przy najmniejszej możliwej liczbie eksperymentów. Jest to budowanie planu doświadczenia o rozdzielczości III z tak małą liczbą układów, jak to tylko możliwe. Stosuje się go od minimum 11 czynników i daje 12 przebiegów eksperymentalnych bez konieczności punktu centralnego [32,33].

W ostatnich latach odnotowano wzrastającą popularność metod planowania Taguchi. Przykłady znaczącej poprawy jakości w wyniku zastosowania tych metod, należą do powszechnie znanych wśród amerykańskich wytwórców [33]. Genichi Taguchi, japoński inżynier, zaproponował kilka podejść do planowania eksperymentów, zwanych metodami Taguchi. Metody te wykorzystują dwu-, trzy-poziomowe i mieszane frakcyjne plany czynnikowe. Taguchi nazywa projekt eksperymentalny „kontrolą jakości off-line”, ponieważ



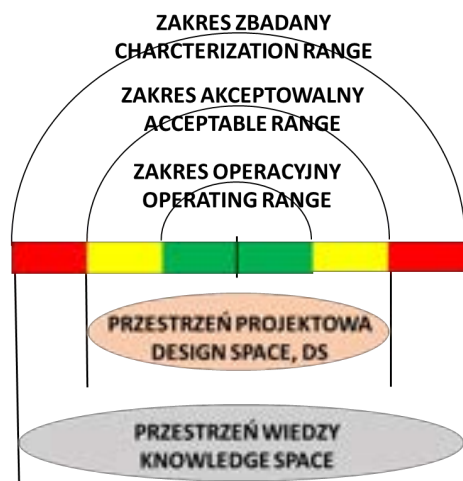
jest to metoda zapewniająca dobrą wydajność na etapie projektowania produktów lub procesów. Jednak niektóre projekty eksperymentalne mogą być wykorzystywane w trybie on-line w trakcie trwania procesu [34,35]. Chociaż wzory „Taguchi” są podobne do układów ułamkowych, to podejście Taguchi wprowadza kilka nowych sposobów konceptualizacji eksperymentu, które są bardzo cenne, szczególnie w rozwoju produktu i inżynierii przemysłowej. Taguchi zalecał stosowanie projektów układów wewnętrznych i zewnętrznych w celu uwzględnienia czynników zakłócających (zewnętrzne), nad którymi mamy kontrolę tylko w laboratorium i czynników badanych (wewnętrzne), które kontrolujemy podczas prowadzenia eksperymentów. Celem jest uczynienie produktu lub procesu, nad którym mamy niewielką kontrolę lub nie mamy jej wcale, bardziej stabilnym. Obrazowo plan Taguchi możemy postrzegać jako konwencjonalny projekt uwzględniający czynniki układu wewnętrznego z dodatkiem „małego” układu czynnikowego zewnętrznego w każdym rogu „pudełka układu wewnętrznego” (**Rysunek 10 (G)**).

Bardzo ważnym aspektem stosowania podejścia DoE jest zachowanie warunków powtarzalności i losowości (randomizacji). Eksperymenty powinny być wykonywane w krótkim czasie na tym samym urządzeniu przez tego samego operatora, czyli w warunkach powtarzalności pomiarów. W celu oszacowania wariancji powtarzalności można powtórzyć cały plan, ale zazwyczaj wykonuje się co najmniej trzy powtórzenia w centrum. Z kolei, aby uniknąć wystąpienia błędu systematycznego ważne jest, aby kolejność wykonania eksperymentów była losowa [32,33].

Rezultatem DoE jest zdefiniowanie przestrzeni projektowej (Design Space, DS.) – takiego zakresu parametrów krytycznych procesu i materiałów (CPPs, CMAs), który zapewnia spełnienie założonych własności produktu (CQAs).

### **5.3.1. Przestrzeń projektowa (Design Space, DS)**

Zdefiniowanie przestrzeni projektowej (Design Space, DS) jest kluczowym etapem zastosowania podejścia QbD w przemyśle farmaceutycznym. Ogólny schemat przestrzeni projektowej procesu przedstawiono na **Rysunku 11**.



**Rysunek 11.** Przestrzeń projektowa procesu (opracowanie własne na podstawie [36]).

DS opisuje wielowymiarowe zależności pomiędzy CQAs i CPPs oraz uwzględnia ich relacje. Zależności te można znaleźć stosując ocenę ryzyka, projektowanie eksperymentów (DoE) i modelowanie. Przestrzeń projektowa jest specyficzna dla operacji jednostkowej lub pojedynczego procesu produkcyjnego i definiuje parametry procesu i ich zakresy, o których wiadomo, że wpływają na jakość produktu. DS można również uznać za łącznik pomiędzy CQAs i CPPs [37]. Jest to sposób na pokazanie rozwoju zrozumienia procesu, a korzyści płynące ze stworzenia przestrzeni projektowej są znaczące chociażby w kwestii przedstawienia organom regulacyjnym.

Najważniejszym punktem w opracowywaniu przestrzeni projektowej jest wykazanie lub ustalenie, że niesklasyfikowane parametry wyłączone z DoE nie są krytycznymi parametrami procesu i nie wchodzi z sobą w interakcje. Do identyfikacji interakcji między parametrami procesu można wykorzystać badanie przesiewowe DoE (screening zmiennych). W przypadku braku interakcji, przedziały pojedynczych zmiennych można bezpośrednio dodać do przestrzeni projektowej jako parametry niekrytyczne.

Takie zdefiniowanie procesu pozwala na bardziej efektywną kontrolę i monitorowanie, a tym samym zapewnia jego przewidywalny przebieg [38,39].

## 6. Założenia i cel pracy

Celem pracy było wykazanie skuteczności i użyteczności zastosowania podejścia QbD oraz zaawansowanych narzędzi statystycznych planowania eksperymentów (DoE) w różnych obszarach rozwoju innowacyjnych substancji czynnych i produktów leczniczych tj:

- opracowania metod analitycznych umożliwiających monitorowanie jakości procesów i produktów na różnych etapach wytwarzania substancji i produktów leczniczych (**Publikacja P1**),
- krytyczna analiza literatury dotycząca opracowania i optymalizacji składu i postaci produktów leczniczych (**Publikacja P2**),
- opracowania i optymalizacji metody syntezy API na różnych etapach rozwoju technologii (**Publikacje P3, P4, P5**).

## 7. Omówienie publikacji w kontekście tematyki pracy doktorskiej

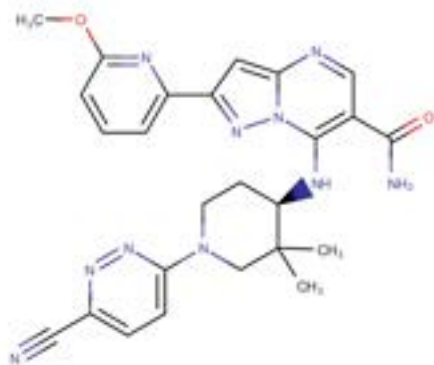
### 7.1. Publikacja P1

Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies;

Gurba-Bryśkiewicz L., Dawid U., Smuga D. A., Maruszak W., Delis M., Szymczak K., Stypik B., Moroz A., Błocka A., Mroczkiewicz M., Dubiel K., Wieczorek M;

Int. J. Mol. Sci., 2022, 23, 10720 <https://doi.org/10.3390/10.3390/ijms231810720>.

Pierwszym z obszarów zastosowania podejścia QbD oraz DoE podjętych w ramach niniejszej rozprawy było opracowanie analitycznej metody chromatograficznej (RP-UHPLC z detekcją UV) służącej do określenia pełnego profilu zanieczyszczeń procesowych i degradacyjnych, innowacyjnej substancji farmaceutycznej CPL409116, której strukturę chemiczną przedstawiono na **Rysunku P1.1**.



**Rysunek P1.1.** Wzór strukturalny CPL409116 (Figure 2 z P1).

Badana API jest dualnym efektywnym inhibitorem kinaz JAK (kinaza Janusa) i ROCK (kinaza związana z Rho) [40-42]. Produkt leczniczy zawierający CPL409116 jako substancję czynną znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych Celon Pharma S.A..

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie nowej szybkiej, prostej i niezawodnej metody analitycznej kontroli czystości wytwarzanej substancji, spełniającej formalne wymagania jakościowe ilościowego określenia pełnego profilu dziewięciu zanieczyszczeń pochodzących z procesu wytwarzania oraz degradacji innowacyjnej substancji farmaceutycznej CPL409116. Moje badania skupiły się na wdrożeniu kompletnego podejścia AQbD, obejmującego etap screeningu, optymalizację i walidację.

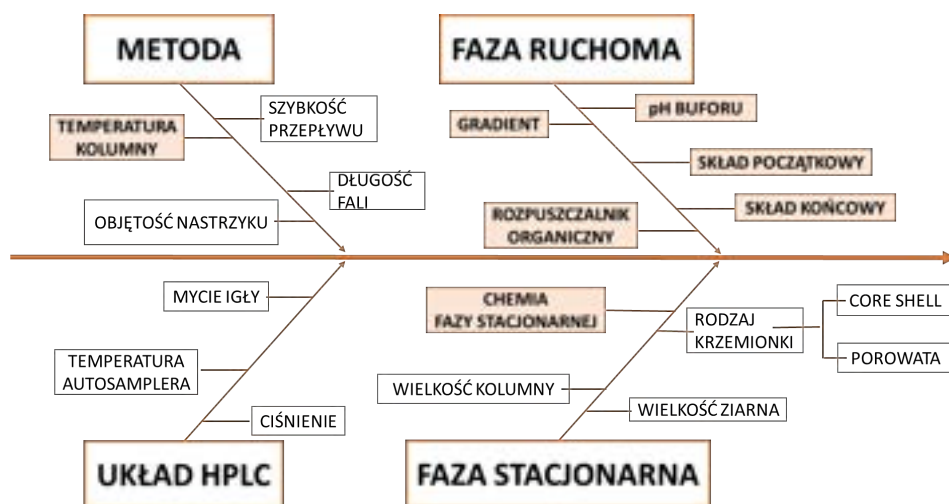
W pierwszym kroku zdefiniowałam analityczny profil docelowy (Analytical Target Profile, ATP) [21–23], który koncentruje się przede wszystkim na:

- zapewnieniu selektywności i specyficzności metody – całkowitym rozdzieleniu API, dziewięciu zanieczyszczeń pokrewnych,
- zapewnieniu odporności metody,
- osiągnięciu wymaganej czułości metody (limit oznaczalności (LOQ) równy lub niższy od 0,05%),
- zagwarantowaniu liniowości, precyzji i dokładności w odniesieniu do wszystkich oznaczanych zanieczyszczeń,
- potwierdzeniu, że opracowywana metoda może być stosowana do rutynowej kontroli jakości, parametry walidacyjne metody spełniają wymagania wytycznej ICH Q2 (R1).

W kolejnym etapie podejścia AQbD przeprowadziłam analizę ryzyka oraz określiłam krytyczne atrybuty metody (Critical Method Attributes, CMAs) i krytyczne parametry metody (Critical Method Parameters, CMPs), jako:

- współczynnik rozdzielczości ( $R_s$ ) między sąsiadującymi pikami powinien być  $\geq 2,0$ ,
- współczynnik symetrii pików ( $A_s$ ) wszystkich analitów powinien mieścić się w zakresie 0,8 – 1,8.

W celu identyfikacji CMPs metody chromatograficznej, które mogłyby potencjalnie mieć wpływ na wybrane CMAs uwzględniłam diagram ości rybiej [21,24,28], przedstawiony schematycznie na **Rysunku P1.2**.



**Rysunek P1.2.** Diagram Ishikawa dla krytycznych parametrów metody chromatograficznej (CMP) (Figure 3 z P1).

Wielowymiarowej optymalizacji podlegały następujące parametry metody (zaciemnione na **Rysunku P1.2**): rodzaj fazy stacjonarnej (osiem kolumn różniących się składem chemicznym i parametrami fazy stacjonarnej), pH składnika wodnego fazy ruchomej, początkowy i końcowy skład procentowy składnika organicznego fazy ruchomej

oraz temperatura kolumny. W tym badaniu wybrałam elucję z gradientem liniowym, który zapewnia zminimalizowanie poszerzenia pików w porównaniu do elucji izokratycznej i zapewnia dokładniejsze i bardziej powtarzalne wyniki. Jako parametr modyfikacji gradientu stosowałam wartość początkowej i końcowej procentowej ilości fazy organicznej, przy zachowaniu stałego czasu gradientu.

Wartości pozostałych parametrów metody ustaliłam na podstawie wstępnych eksperymentów:

- objętość nastrzyku: 1  $\mu$ l,
- czas gradientu: 7 min (czas elucji dla wszystkich związków wynosił poniżej 4 min),
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,5 ml/min,
- rozpuszczalnik organiczny: ACN (MeOH wykluczyłam ze względu na wysoką retencję pików i brak rozdzielania pików dla części badanych związków),
- długość fali detekcji UV: 297 nm jako maksimum absorpcji JAK01 (CPL409116) i ośmiu jego zanieczyszczeń oraz 230 nm do kontroli zanieczyszczenia JAK SM-05.

Przestrzeń eksperymentalną DOE badań przesiewowych zbudowałam na dwóch zmiennych jakościowych: rodzaj kolumny chromatograficznej (8 wartości, C1 – C8) i pH roztworu wodnej fazy ruchomej (4 wartości, pH 2,6; 3,2; 4,0; 6,8) oraz dwóch zmiennych ilościowych ciągłych: początkowa ilość składnika organicznego fazy ruchomej – acetonitrylu (wartości w zakresie od 20% do 25%) i końcowa ilość acetonitrylu (wartości w zakresie od 85% do 90%).

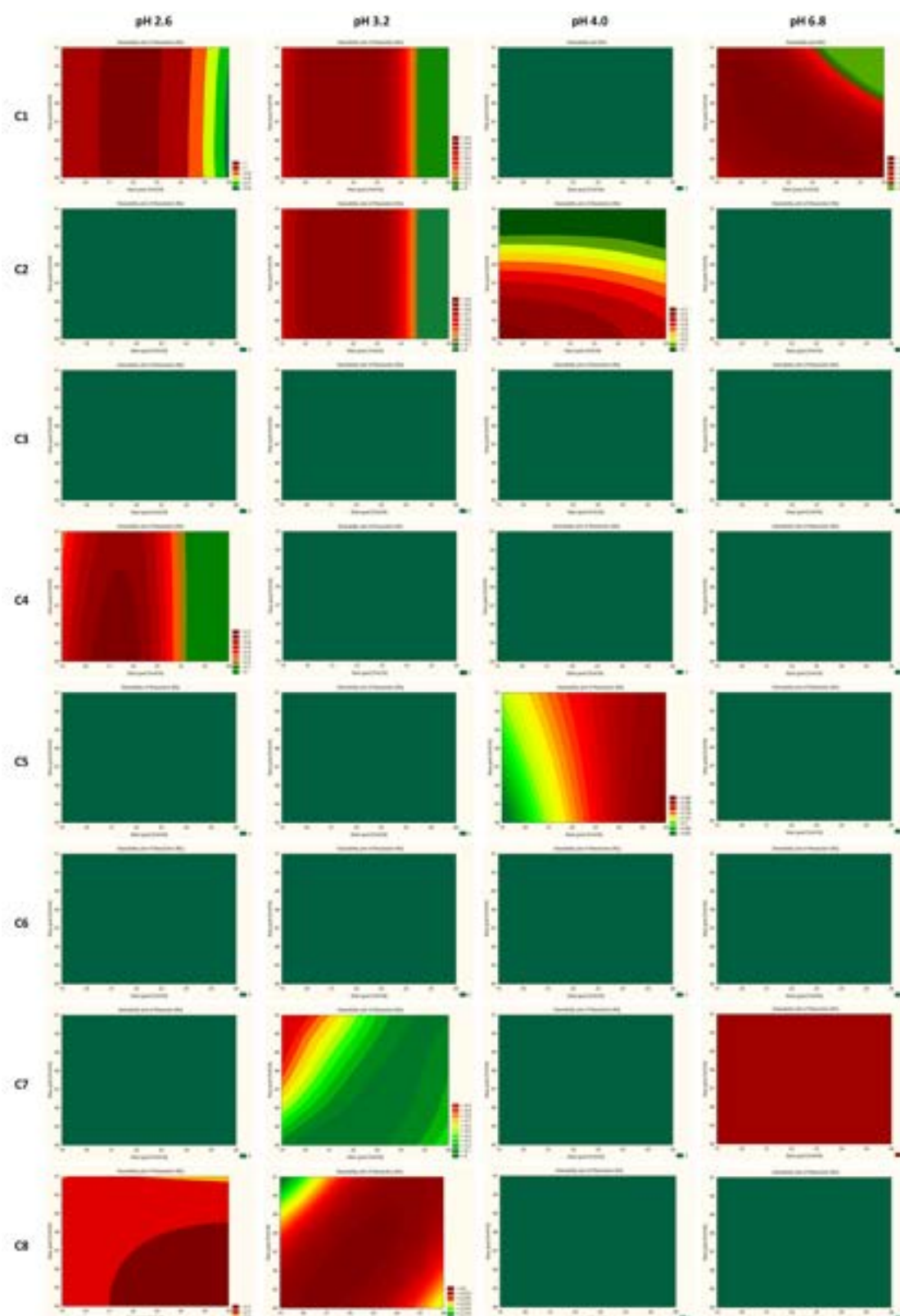
Statystyczny projekt eksperymentalny DoE przeprowadziłam w oparciu o pełny plan frakcyjny  $2^2$  (dwa czynniki: skład gradientu początkowego i końcowego, każdy na dwóch poziomach) z pełnym powtórzeniem dla każdej badanej kolumny i każdego pH wodnej fazy ruchomej. Jako zmienne wyjściowe (krytyczne atrybuty metody) wybrałam współczynniki rozdzielczości pomiędzy sąsiednimi pikami ( $R_s$ ) oraz współczynniki symetrii pików wszystkich analitów ( $A_s$ ). Szybkość przepływu fazy ruchomej, czas gradientu i temperatura kolumny były zmiennymi stałymi kontrolowanymi. Na etapie screeningu przeprowadziłam ogółem 128 eksperymentów wg planu DoE.

Uzyskane wyniki chromatograficzne poddałam odpowiedniej analizie statystycznej za pomocą oprogramowania STATISTICA [33,43,44], które dostarczyły informacji na temat zależności pomiędzy badanymi krytycznymi parametrami metody (CMPs) oraz ich wpływu na krytyczne atrybuty metody (CMAs).

Zweryfikowałam istnienie liniowych efektów głównych, efektów krzywoliniowych i efektów interakcyjnych poszczególnych zmiennych.

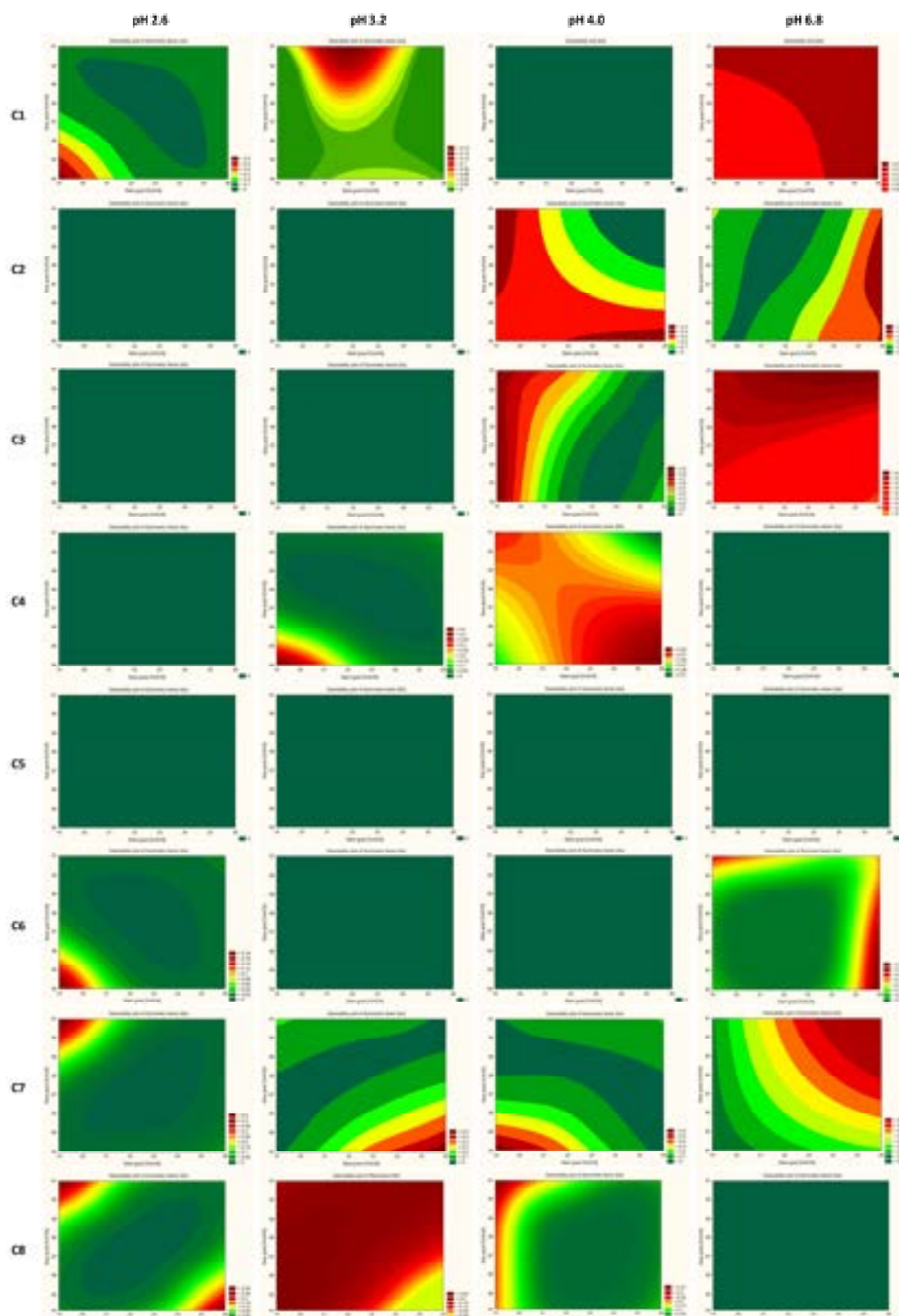
Do wygenerowania 9 modeli współczynników rozdzielczości między wszystkimi parami pików ( $R_s$ ) oraz 10 modeli współczynników symetrii dla wszystkich pików ( $A_s$ ) zastosowałam wielokrotną regresję liniową. Z obliczonych wstępnie modeli usunęłam efekty nieistotne i uwikłane. Oceny istotności każdego badanego parametru metody dokonałam na podstawie wartości  $p$  uzyskanej w analizie ANOVA (poziom istotności  $p < 0,05$ ). Dla wszystkich modeli uzyskałam dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych, ( $R^2$  powyżej 0,99, brak dopasowania (lack of fit) nie istotny statystycznie ( $p > 0,05$ )).

Oceny wyników analizy statystycznej dokonałam na podstawie wartości współczynnika użyteczności (utility factor) stosowanego w programie STATISTICA [33,43,44]. Skumulowane wykresy użyteczności dla zmiennych wyjściowych  $R_s$  i  $A_s$  oraz wielowymiarowe funkcje odpowiedzi (**Rysunku P1.3** i **Rysunku P1.4**) wykorzystałam do określenia przestrzeni projektowej, operacyjnej przestrzeni metody (MODR).



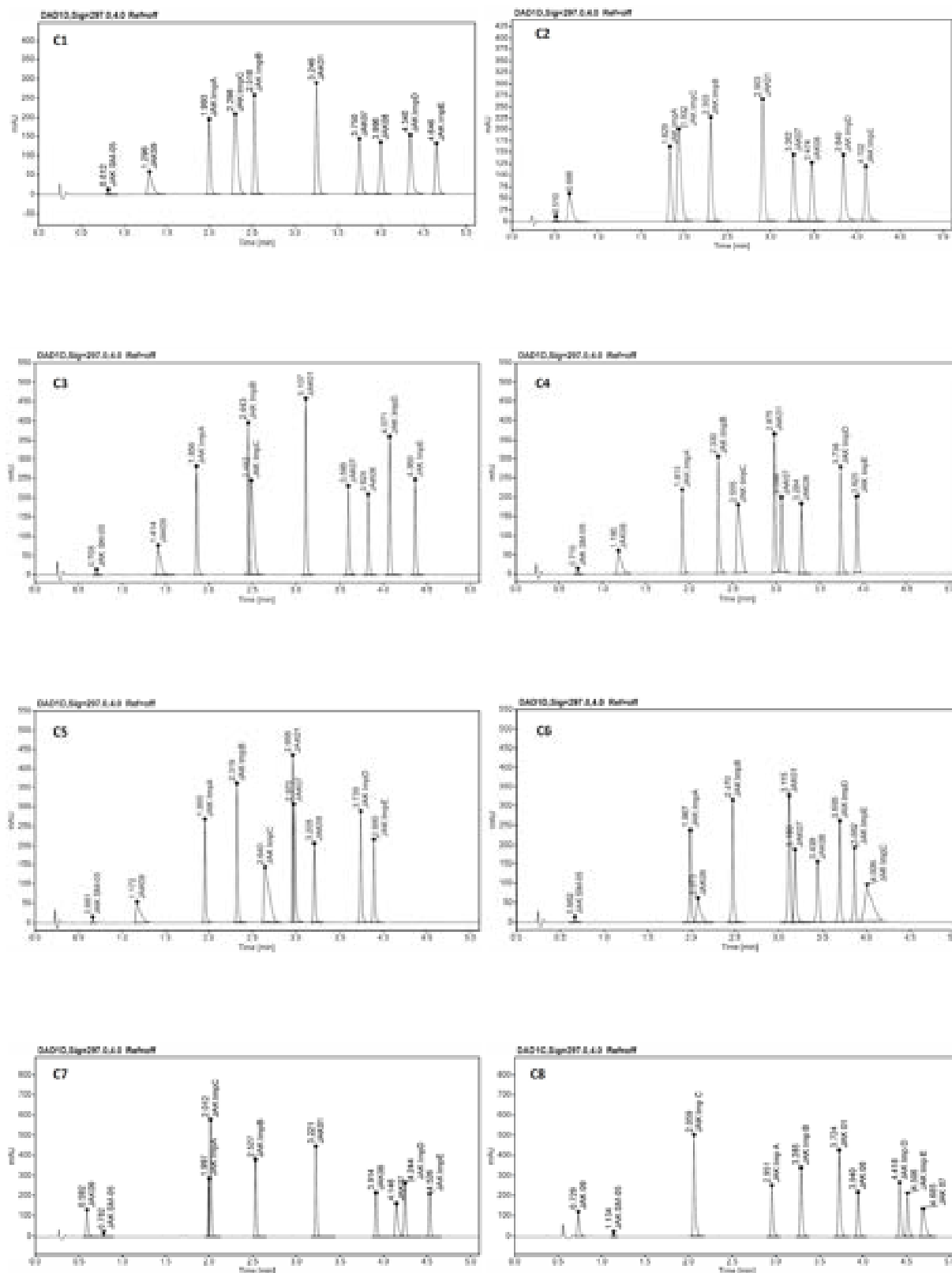
**Rysunek P1.3.** Wyniki eksperymentu przesiewowego pokazujące wpływ interakcji kolumn, % rozpuszczalnika organicznego na początku i na końcu gradientu oraz pH z CMAs jako wykres funkcji użyteczności dla współczynnika rozdzielczości ( $R_s$ ). C1 – ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies), C2 – Kinetex EVO C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Phenomenex), C3 – ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  Waters), C4 – InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2,1 50 mm, 1,9  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies), C5 – Kinetex Bifenyl (2,1 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Phenomenex), C6 – Kinetex PFP (2,1 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Phenomenex), C7 – ACQUITY UPLC CSH C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters) i C8 – ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2,1 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters) (Figure 4 z P1).





**Rysunek P1.4.** Wyniki eksperymentu przesiewowego pokazujące wpływ interakcji kolumn, % rozpuszczalnika organicznego na początku i na końcu gradientu oraz pH z CMAs jako wykres funkcji użyteczności dla współczynnika symetrii ( $A_s$ ). C1 – ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 50 mm, 1,8  $\mu$ m, Agilent Technologies), C2 – Kinetex EVO C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu$ m, Phenomenex), C3 – ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu$ m Waters), C4 – InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2,1 50 mm, 1,9  $\mu$ m, Agilent Technologies), C5 – Kinetex Bifenyl (2,1 50 mm, 1,7  $\mu$ m, Phenomenex), C6 – Kinetex PFP (2,1 50 mm, 1,7  $\mu$ m, Phenomenex), C7 – ACQUITY UPLC CSH C18 (2,1 50 mm, 1,7  $\mu$ m, Waters) i C8 – ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2,1 100 mm, 1,7  $\mu$ m, Waters) (Figure 5 z P1).

Na **Rysunku P1.5** przedstawiłam przykładowe chromatogramy uzyskane przy wybranych parametrach metody z etapu badań przesiewowych.



**Rysunek P1.5.** Przykładowe chromatogramy uzyskane przy wybranych parametrach metody z badań przesiewowych (Figure 6 z P1).

Obliczone optymalne warunki rozdziłu chromatograficznego substancji badanej CPL409116 i jej dziewięciu zanieczyszczeń zamieściłam w **Tabeli P1.3**.

**Tabela P1.3.** Podsumowanie wyników badań przesiewowych (Table 4 z P1).

Column	pH of Buffer	Critical Method Parameters (CMAst)	Optimal Conditions of CMPs	
			Start Gradient [% ACN]	End Gradient [% ACN]
<b>ZORBAX Eclipse Plus C18</b> (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies)	2.6	Symmetry factor of JAK09 and JAK ImpD Resolution of JAK SM-05/JAK09	19-21	84-86
	3.2	Symmetry factor of JAK 09 Symmetry factor of JAK ImpC (>1.77) Symmetry factor of JAK ImpD	21-23	88-90
	4.0	Resolution of JAK ImpC/JAK ImpB (<1.5) Symmetry factor of JAK ImpD (>2.0)	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK ImpE (>1.9) Resolution of JAK ImpC—JAK Imp E	20-23	85-90
<b>Kinetex EVO C18</b> (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex)	2.6	Resolution of JAK ImpA/JAK ImpB (<1.5) Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.8)	not found	not found
	3.2	Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpB (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpD (>1.8)	not found	not found
	4.0	Symmetry factor of JAK09 (<1.7) Symmetry factor of JAK ImpC (<1.7)	20-24	85-87
	6.8	Resolution of JAK ImpB/JAK07	not found	not found
<b>ACQUITY UPLC BEH C18</b> (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Waters)	2.6	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.8) Resolution of JAK ImpC/JAK ImpB (<0.5)	not found	not found
	3.2	Symmetry factor of JAK09 (>2.1) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.9)	not found	not found
	4.0	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.8) Symmetry factor of JAK09 (>1.0)	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK09 (>2.0) Resolution of JAK07/JAK08 (<0.5) Symmetry factor JAK07 (>1.8)	not found	not found
<b>InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl</b> (2.1 × 50 mm, 1.9 µm, Agilent Technologies)	2.6	Resolution of JAK07/JAK01 (<0.6) Symmetry factor of JAK09 (>2.3) Symmetry factor of JAK ImpB (>2.4)	not found	not found
	3.2	Symmetry factor of JAK07 (>2.3) Resolution of JAK07/JAK01 (<1.1) Symmetry factor of JAK09 (>1.9)	not found	not found
	4.0	Symmetry factor of JAK ImpB (>1.9) Symmetry factor of JAK01 (>2.5)	not found	not found
	6.8	Resolution of JAK07/JAK ImpB (<0.8) Symmetry factor of JAK07 (>2.4)	not found	not found
<b>Kinetex Biphenyl</b> (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex)	2.6	Resolution of JAK09/JAK ImpA (<1.6) Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.8)	not found	not found
	3.2	Resolution of JAK08/JAK07 (<0.5) Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>2.1)	not found	not found
	4.0	Resolution of JAK ImpE/JAK ImpD (<0.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.9)	not found	not found
	6.8	Resolution of JAK08/JAK07 (<0.85)	not found	not found
<b>Kinetex PFP</b> (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex)	2.6	Resolution of JAK ImpC/JAK ImpA (<1.8) Symmetry factor of JAK07 (>1.8)	not found	not found
	3.2	Resolution of JAK07/JAK08 (<2.0) Symmetry factor of JAK07 (>1.8)	not found	not found
	4.0	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.6) Symmetry factor of JAK09	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK ImpB Symmetry factor of JAK07	20-23	85-87
<b>ACQUITY UPLC CSH C18</b> (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Waters)	2.6	Resolution JAK ImpE/JAK ImpD (<2.28, >2.00) Symmetry factor of JAK07 (<1.8)	20-21	89-90
	3.2	Resolution JAK ImpE/JAK ImpD (<2.3, >2.00) Symmetry factor of JAK07 (<1.8)	20-23	85-90
	4.0	Resolution JAK07/JAK ImpE (<1.3) Resolution JAK08/JAK01	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK01 (<0.8)	not found	not found

W oparciu o wyniki badań przesiewowych, do dalszego etapu optymalizacji metody wybrałam następujące układy: (1) kolumna C1 – ZORBAX Eclipse Plus C18, pH 2.6, 20% ACN na początku gradientu, 85% ACN na końcu gradientu, (2) kolumna C2 – Kinetex EVO C18, pH 4.0, 21% ACN na początku gradientu, 86% ACN na końcu gradientu,

(3) kolumna C8 – ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl, pH 2.6, 20% ACN na początku gradientu, 85% ACN na końcu gradientu.

W kolejnym etapie opracowywania metody wykonałam analizy dla próbki rzeczywistej substancji JAK01 oraz próbki substancji badanej wzbogaconej domieszkami zanieczyszczeń w ilości 0,15%, na podstawie których do dalszej weryfikacji metody wybrałam kolumnę Zorbax Eclipse Plus C18. Dla wybranej kolumny przeprowadziłam test odporności metody z zastosowaniem podejścia DoE, które pozwoliło na jednoczesną zmianę wielu zmiennych w różnych kombinacjach. Badania statystycznej analizy odporności metody przeprowadzono w oparciu o ułamkowy projekt czynnikowy ( $2^{(4-1)}$ ) z wartościami punktów centralnych i z pełnym powtórzeniem, pozwalający na wykonywanie 18 eksperymentów zamiast 81 w przypadku zastosowania pełnego planu czynnikowego ( $3^4$ ). Eksperymenty w ramach planu DoE prowadziłam w losowej kolejności dla roztworu SST i roztworu testowego zawierającego substancję JAK01 w stężeniu 0,5 mg/ml i zanieczyszczenia JAK01 w stężeniu 0,75 µg/ml odpowiadającym poziomowi 0,15%.

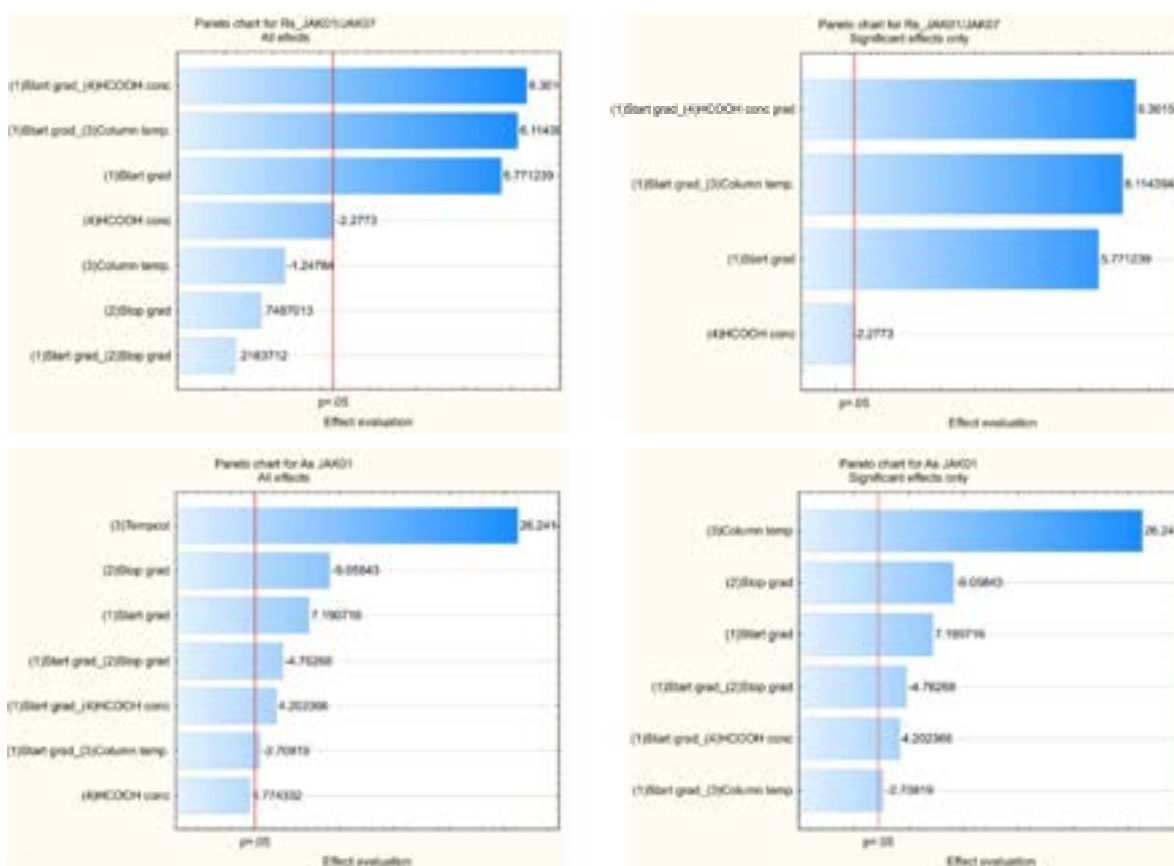
Projekt planu eksperymentu DoE i odpowiadające mu surowe dane są zamieszczone w **Tabeli P1.4**.

**Tabela P1.4.** Plan eksperymentu DoE i odpowiadające mu wyniki surowe dla badania odporności metody. (Table 5 z P1).

Start Gradient [%ACN]	End Gradient [%ACN]	Column Temperature [°C]	Concentration of HClO <sub>4</sub> Solution (mM)	Results of $R_s$												Results of $A_s$											
				JAK Imp. 01	JAK Imp. A	JAK Imp. C	JAK Imp. B	JAK 01	JAK 07	JAK 06	JAK Imp. D	JAK Imp. E	JAK 04	JAK 03	JAK Imp. F	JAK Imp. G	JAK 01	JAK 07	JAK 06	JAK Imp. D	JAK Imp. E						
10.0	86.0	30.0	9.0	11.20	7.93	9.01	1.79	91.79	7.40	4.30	4.2	4.36	1.07	3.05	1.28	1.40	1.25	1.20	1.26	1.17	1.22	1.23					
10.0	86.0	30.0	9.0	1.02	8.27	3.95	1.14	12.23	7.62	1.69	4.57	4.19	1.56	3.79	1.31	1.46	1.26	1.16	1.22	1.18	1.16	1.20					
10.0	86.0	30.0	11.0	6.88	7.86	3.63	2.87	102.30	6.79	2.83	3.76	3.94	1.56	3.43	1.15	1.94	1.14	1.16	1.22	1.26	1.20	1.20					
10.0	86.0	30.0	11.0	3.70	7.90	4.23	2.76	101.75	6.46	2.96	3.63	3.79	1.60	3.03	1.37	1.43	1.49	1.43	1.34	1.39	1.50	1.50					
10.0	86.0	32.0	9.0	6.43	6.71	3.28	3.06	9.50	6.66	2.62	3.40	3.51	1.50	3.47	1.35	1.38	1.35	1.39	1.44	1.49	1.51	1.52					
10.0	86.0	32.0	9.0	2.57	8.32	3.77	3.37	114.02	7.52	1.11	6.16	6.31	1.86	3.69	1.21	1.37	1.19	1.09	1.60	1.39	1.60	1.60					
10.0	86.0	32.0	11.0	6.99	7.22	3.36	3.02	113.60	6.90	1.19	4.25	4.38	1.42	3.47	1.26	1.49	1.66	1.50	1.51	1.46	1.52	1.57					
10.0	86.0	32.0	11.0	2.15	8.28	3.79	3.32	111.69	7.29	3.06	4.14	4.59	1.60	3.64	1.27	1.33	1.63	1.56	1.49	1.45	1.54	1.54					
20.0	85.0	30.0	10.0	3.73	9.32	4.54	3.20	104.04	8.51	3.06	3.43	4.76	1.39	3.72	1.31	1.36	1.41	1.32	1.29	1.23	1.40	1.24					
10.0	86.0	30.0	9.0	31.4	7.07	3.36	2.84	111.51	7.61	4.29	6.09	4.30	1.55	3.34	1.55	1.38	1.27	1.25	1.25	1.22	1.26	1.29					
10.0	86.0	30.0	9.0	1.07	8.15	4.01	1.18	112.05	7.40	1.45	6.85	4.49	1.56	3.79	1.27	1.46	1.25	1.16	1.18	1.19	1.18	1.23					
10.0	86.0	30.0	11.0	7.34	7.29	3.81	2.98	101.91	6.99	3.02	3.88	3.61	1.55	3.43	1.12	1.69	1.19	1.11	1.25	1.12	1.19	1.22					
10.0	86.0	30.0	11.0	2.43	7.73	4.02	3.89	101.32	6.64	2.79	4.06	3.93	1.43	3.62	1.34	1.42	1.41	1.46	1.40	1.41	1.46	1.50					
10.0	86.0	32.0	9.0	6.36	6.79	3.29	3.17	9.51	6.92	2.66	3.59	3.90	1.56	3.44	1.32	1.36	1.31	1.32	1.40	1.42	1.51	1.51					
10.0	86.0	32.0	9.0	2.34	8.37	3.75	3.36	111.27	7.19	2.88	4.02	4.20	1.65	3.66	1.25	1.61	1.77	1.67	1.54	1.54	1.39	1.61					
10.0	86.0	32.0	11.0	6.57	7.56	3.76	3.19	111.13	6.59	3.30	4.00	4.33	1.40	3.50	1.32	1.69	1.57	1.49	1.45	1.53	1.55	1.55					
10.0	86.0	32.0	11.0	2.34	6.20	3.77	3.36	111.77	7.73	3.02	4.01	4.14	1.62	3.66	1.22	1.53	1.65	1.59	1.49	1.46	1.56	1.56					
20.0	85.0	30.0	10.0	3.73	9.26	4.53	3.27	104.30	8.51	3.09	3.43	4.76	1.39	3.72	1.35	1.41	1.39	1.30	1.32	1.23	1.35	1.29					
mean				2.34	6.73	3.26	2.79	9.50	6.66	2.62	3.59	3.50	1.39	3.34	1.12	1.36	1.14	1.11	1.15	1.12	1.16	1.20					
max				11.60	9.32	5.36	3.37	104.30	8.51	4.29	5.43	4.76	1.65	3.79	1.39	1.43	1.27	1.69	1.60	1.39	1.60	1.65					

Oprócz zmiennych analizowanych na etapie badań przesiewowych, dodatkowo zbadałam temperaturę kolumny i stężenie kwasu mrówkowego. Zakres wartości zmiennych został ustalony na podstawie przestrzeni projektowej z etapu screeningu: % ACN na początku gradientu  $20\% \pm 1\%$ , % ACN na końcu gradientu  $85\% \pm 1\%$ ). Stężenie kwasu mrówkowego badano w zakresie  $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ , a temperaturę kolumny w zakresie  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

Graficzna analiza efektów jest przedstawiona na **Rysunku P1.6** jako przykład wykresu Pareto (dla  $R_s$  pomiędzy JAK01 i JAK07 oraz  $A_s$  dla JAK01), który pozwala na identyfikację istotnych składników modelu oraz wielkości i kierunku wpływu badanych zmiennych na krytyczne atrybuty metody, CMAs.



**Rysunek P1.6.** Wykresy Pareto dla  $R_s$  między pikami JAK01 i JAK07 oraz  $A_s$  dla pik JAK01 uzyskane w badaniach odporności metody (Figure 8 z P1).

Na podstawie powyższych wykresów Pareto można stwierdzić, że parametrami metody wpływającymi istotnie statystycznie na współczynnik rozdziału między pikami JAK01 i JAK07 były: efekt interakcji początkowego składu gradientu i stężenia HCOOH w wodnej fazie ruchomej, efekt interakcji początkowego składu gradientu i temperatury kolumny, efekt główny początkowego składu gradientu oraz efekt główny stężenia HCOOH w wodnej fazie ruchomej. Parametry istotnie statystycznie wpływające na współczynnik symetrii pik JAK01 to: temperatura kolumny, końcowy skład gradientu, początkowy skład gradientu, efekt interakcji początkowego i końcowego składu gradientu, efekt interakcji początkowego składu gradientu i stężenia HCOOH w wodnej fazie ruchomej oraz efekt interakcji początkowego składu gradientu i temperatury kolumny.

Analiza uzyskanych wyników posłużyła do oszacowania ostatecznej przestrzeni projektowej opracowywanej metody (MODR).

Wyniki analizy statystycznej wskazują, że, że założone wymagania dla CMA są spełnione w całym badanym zakresie CMPs – współczynniki użyteczności znacznie powyżej 0,0, w pobliżu wartości maksymalnej równej 1,0.

Do zdefiniowania ostatecznej przestrzeni projektowej opracowywanej metody (MODR) obliczyłam mapy prawdopodobieństwa za pomocą symulacji Monte-Carlo [21,22], propagując błąd predykcyjny za pomocą równania modelu na CMA i obliczając prawdopodobieństwo osiągnięcia zamierzonych celów. Próg ryzyka niepowodzenia ustaliłam na 10%.

Ostateczna operacyjna przestrzeń projektowa metody (MODR) odpowiada następującym wartościom analizowanych parametrów metody:  $20\% \pm 1\%$  ACN na początku gradientu,  $85\% \pm 1\%$  ACN na końcu gradientu, stężenie kwasu mrówkowego  $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$  i temperatura kolumny  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

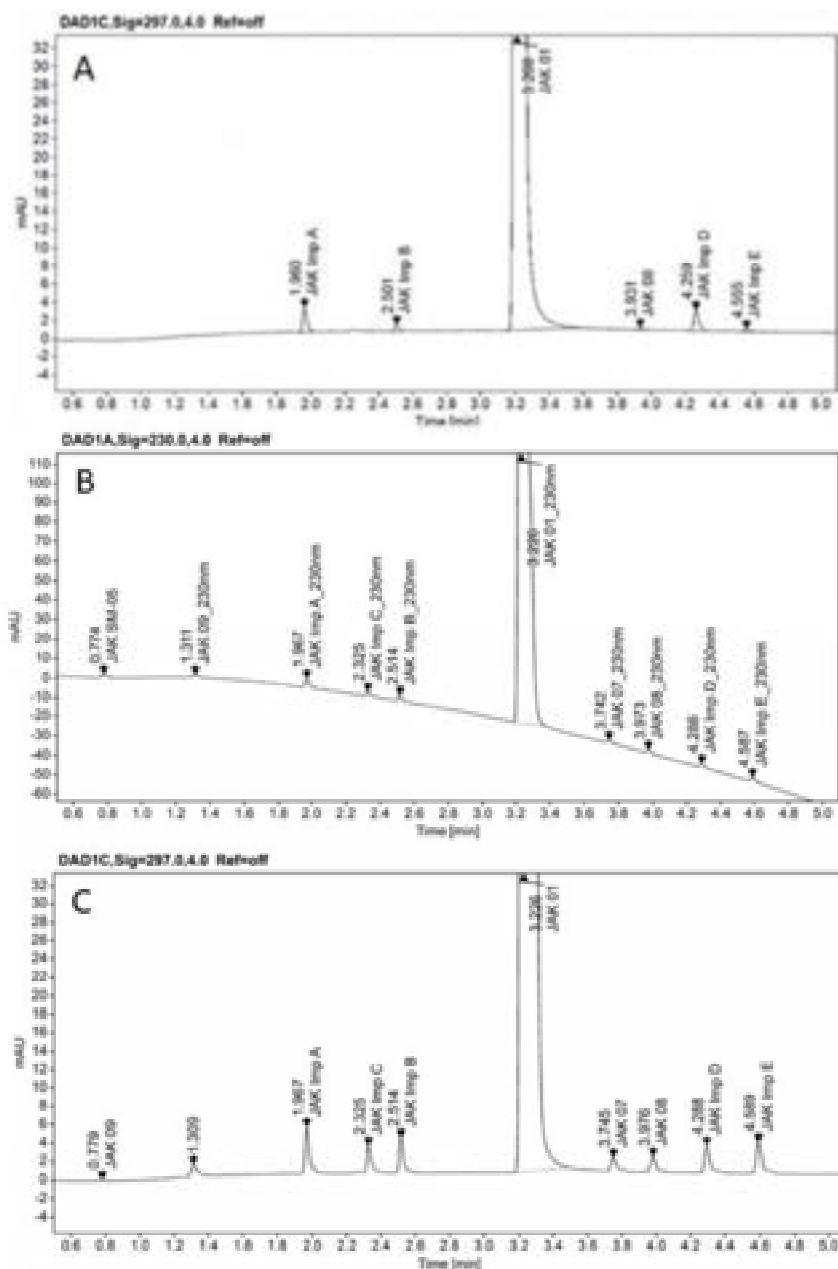
W oparciu o badania odporności opracowałam strategię kontroli metody identyfikując kryteria przydatności systemu.

Ostatnim etapem badań była walidacja opracowanej metody zgodnie z wytycznymi ICH Q2(R1) [45]. Dane walidacyjne są przedstawione w **Tabeli P1.5** Wyniki walidacji potwierdziły odpowiedniość metody do zamierzonego celu. Zgodnie z założeniami opracowana metoda oznaczania zawartości zanieczyszczeń CPL409116 (JAK01) jest specyficzna ( $R_s \geq 2,0$ ), liniowa ( $R = 0,99$ ), precyzyjna ( $RSD < 10,0\%$ ). Wartość stężenia LOQ mieści się w progu raportowania wynoszącym 0,05% dla wszystkich zanieczyszczeń.

**Tabela P1.5.** Podsumowanie wyników walidacji metody (Table 6 z P1).

Parameter	Acceptance Criteria	JAK SM-05	JAK 09	JAK Imp A	JAK Imp C	JAK Imp B	JAK 07	JAK 08	JAK Imp D	JAK Imp E	Compliance with Acceptance Criteria (Yes/No)
Linearity, R	LOQ—120% of the specification limit (for each impurity) Concentration levels $n = 5$ , $R \geq 0,99$	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	Yes
Repeatability, RSD (%)	LOQ—%RSD (area) $\leq 15\%$	6,8	8,5	2,7	4,7	4,2	9,1	3,4	2,5	2,0	Yes
	100% of the specification limit—%RSD (area) $\leq 15\%$	4,5	3,2	0,8	1,8	2,0	3,3	1,8	3,3	1,5	Yes
Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ)	S/N $\geq 3$ ( $n = 3$ ) S/N $\geq 10$ ( $n = 6$ )	6 21	3 12	8 22	9 29	11 31	5 14	5 16	4 8	11 32	Yes Yes
Specificity	Resolution between two neighboring peaks, $R_s \geq 2,0$	-	9,6	12,0	8,4	4,6	9,9	4,1	5,8	5,6	Yes

Opracowaną metodę ostatecznie została zastosowana do analizy rzeczywistej próbki substancji CPL409116 pochodzącej z wielkoskalowego procesu syntetycznego. Na **Rysunku P1.7** przedstawiono chromatogramy roztworu substancji badanej JAK01 i roztworu substancji badanej JAK01 z dodatkiem zanieczyszczeń na poziomie 0,15%.



**Rysunek P1.7.** Chromatogramy roztworu substancji badanej JAK01 (A) i roztworu substancji badanej JAK01 z dodatkiem zanieczyszczeń na poziomie 0.15% przy 230 nm (B) i 297 nm (C), na kolumnie ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) (Figure 9 z P1).

Powyższa praca wykazała skuteczne zastosowanie AQbD oraz DoE do opracowania szybkiej, prostej i niezawodnej chromatograficznej metody analitycznej oznaczania zawartości zanieczyszczeń innowacyjnej substancji aktywnej CPL409116 (JAK01), spełniającej wymagania regulacyjne i z powodzeniem stosowanej do rutynowych oznaczeń.

Zastosowanie podejścia DOE i ułamkowego planu czynnika z punktem środkowym pozwoliło na wykazanie odporności metody za pomocą ograniczonej liczby eksperymentów.

## 7.2. Publikacja P2

Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DoE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery;

Gurba-Bryśkiewicz L., Maruszak W., Smuga D. A., Dubiel K., Wieczorek M.;

Biomedicines, 2023, 11, 2752, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102752>.

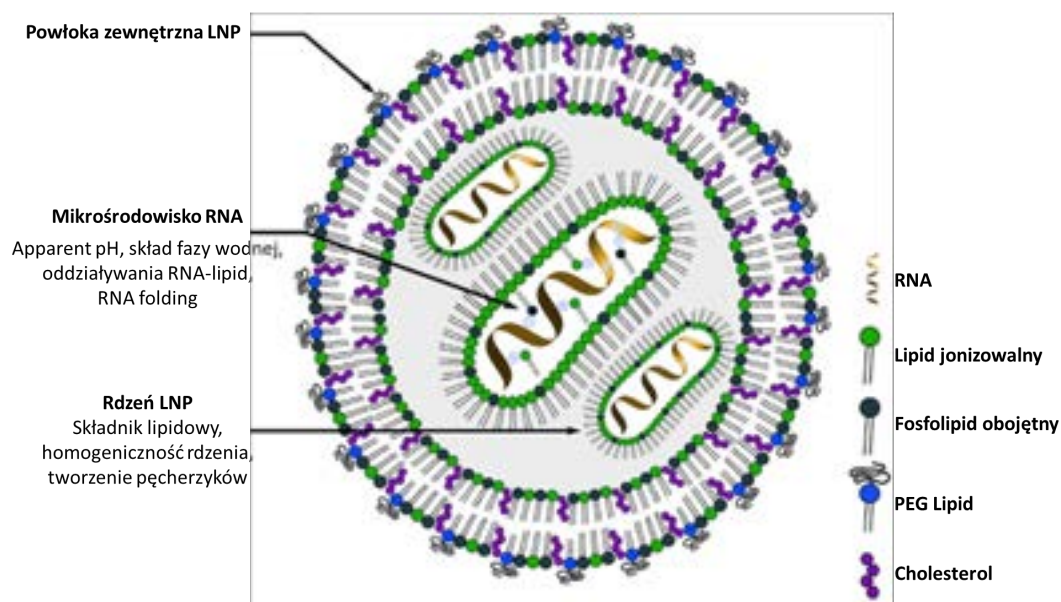
Drugim obszarem zastosowania podejścia QbD oraz DoE zbadanym w oparciu o przegląd literatury w ramach niniejszej rozprawy jest optymalizacja składu produktów farmaceutycznych zawierających nanocząstki lipidowe RNA (RNA-LNP).

W ciągu ostatnich lat w wielu artykułach naukowych opisano rozwój badań nad nanocząsteczkami lipidowymi z RNA do różnych celów klinicznych, np. w profilaktyce chorób zakaźnych, leczeniu chorób rzadkich, genetycznej terapii zastępczej, terapii nowotworowej [46]. Ponadto, pandemia koronawirusa 2019 (COVID-19) oraz pojawienie się bezpiecznych i skutecznych szczepionek RNA sprawiły, że technologia RNA znalazła się w czołówce innowacji medycznych.

W publikacji przeglądowej wchodzącej w skład cyklu pracy doktorskiej przedstawiłam analizę zastosowania podejścia QbD i DoE w rozwoju nanocząstek LNP-RNA na przykładach prac opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat [47-62]. W pierwszej części pracy opisałam koncepcje QbD, oceny ryzyka, projektowania eksperymentów (DoE) i technologii analizy procesowej (PAT). Następnie przedstawiłam przykłady badań wykorzystujących podejście QbD i/lub DoE w celu optymalizacji preparatów zawierających RNA-LNP. Wyniki zamieściłam w **Tabeli 1** w niniejszej publikacji. Przeprowadziłam szczegółową analizę optymalizowanych zmiennych i ich zakresu w podejściu DOE oraz przedstawiłam w **Tabeli 1S** w suplemencie niniejszej publikacji szczegółowe wyniki uzyskane w ramach opisywanych prac.

Implementacja QbD w rozwoju nanocząstek lipidowych z RNA jest ściśle powiązana z ich strukturą (**Rysunek P2.1**) oraz głównym celem terapeutycznym.





**Rysunek P2.1.** Schemat poglądowy struktury układu RNA-LNP (opracowanie własne na podstawie [47]) (Figure A z P2).

Główne elementy składowe podejścia QbD, zdefiniowane podobnie w różnych opublikowanych badaniach, obejmują następujące parametry [48]:

- QTPP: bezpieczeństwo i skuteczność,
- CQAs: wielkość cząstek z-average, współczynnik polidispersyjności PDI, potencjał zeta, efektywność enkapsulacji, wydajność ładowania, stabilność, warunki przechowywania, skład lipidowy,
- CMAs: stosunek N/P, rodzaj lipidów, nietoksyczność, biodegradowalność,
- Krytyczne parametry procesu (CPPs): temperatura, mikroprzepływy, filtracja.

Z uwagi na złożoną budowę RNA-LNP, wiele parametrów składu wpływa na bezpieczeństwo i efektywność i wymaga optymalizacji. W tym celu zostało wdrożonych wiele różnych rodzajów planów eksperymentalnych. W pięciu pracach zastosowano pełne plany czynnikiowe (full factorial design, FFD) [49,50,56,63,64]. Frakcyjne plany czynnikiowe (fractional factorial design, FFD) z punktem centralnym wykorzystali w swoich badaniach Cun D. i in. [65] oraz Young R.E. [58], a z kolei Kauffman K.J. i in. [63] oraz Hashiba A. i in. [66] zastosowali frakcyjny projekt czynnikiowy Taguchi. Plan Box- Behnken'a przeprowadzono w pracach Ly H.H. [60] oraz Terada T. i in. [67]. Optymalizację w oparciu o plan I-optymalny przeprowadzili Thanki K. i inni [49,50] oraz Lokras A. [46], a z kolei plan D-optymalny zastosował Bastogne T. i inni [60]. Definitive screening design (DSD) przeprowadzono w trzech pracach [58,60,63]. Plan centralny kompozycyjny (Central Composite Design, CCD) wykorzystał Zheng Q. [51].

W ramach wykorzystania podejścia DoE zastosowano szeroką gamę analiz matematycznych i statystycznych oraz metod modelowania. Korelacje badano w pracach [68,69]. Metodę analizy regresji najmniejszych kwadratów zastosowano w publikacjach [52,56,58,63,64,66]. Analizę wariancji ANOVA przeprowadzono w badaniach [46,50,51,53,60,66]. Metodologię powierzchni odpowiedzi (Response Surface Methodology, RSM) zastosowano do analizy wyników DoE w pracach [48,54,62]. Tradycyjne testy i modelowanie statystyczne oparte na ANOVA i analizie regresji zostały zastąpione przez metody sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego, np. sieci neuronowe [56], a do oceny predykcji modelu wykorzystano metodę estymacji Bayesowskiej, kontrolę predykcyjną i korelację krzyżową. Z metodologicznego punktu widzenia największą innowacyjnością w farmacji jest rozwój samouczących się modeli grupujących (Self Validated Ensemble Model, SVEM), szczególnie w powiązaniu z projektowaniem mieszanin [55].

Praca stanowi przegląd stosowania podejścia QbD do opracowywania nanoukładów lipidowych zawierających różne typy RNA, w odniesieniu do obowiązujących wymogów regulacyjnych oraz przy użyciu nowoczesnych matematycznych i statystycznych metod projektowania. Zebrane konkluzje są użytecznym narzędziem dla badaczy i wytwórców w obszarze farmaceutycznym.

### 7.3. Publikacja P3

The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (CPL302415);

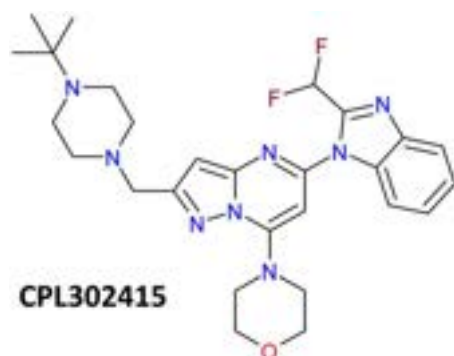
Michałek S., Gurba-Bryśkiewicz L., Maruszak W., Zagozda M., Maj A. M., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;

RSC Adv., 2022, 12, 33605-33611, <https://doi.org/10.1039/d2ra07003k>.

Kolejnym obszarem skutecznego wykorzystania metod DoE w ramach niniejszej pracy doktorskiej była optymalizacja warunków reakcji syntezy API (CPL302415) w reaktorze przepływowym.

CPL302415 to związek opracowany przez firmę Celon Pharma S.A. Należy do pierwszej klasy inhibitorów PI3K (3-kinazy fosfoinozytydu) zawierającej cztery heterodimeryczne białka (PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$ , PI3K $\delta$ ) i uważanej za efektywną w leczeniu wielu chorób, takich jak SLE (toczeń rumieniowaty układowy), stwardnienie rozsiane, astma, choroby zapalne, autoimmunologiczne i układu oddechowego [70-75].

Związek CPL302415 jest inhibitorem kinazy PI3K $\delta$  oparty na rdzeniu pirazolo[1,5-a]pirymidynowym (**Rysunek P3.1**) obecnie będący w fazie badań przedklinicznych Celon Pharma S.A. w terapii toczenia rumieniowatego w podaniu doustnym.



**Rysunek P3.1.** Wzór strukturalny CPL302415 (Fig. 1 z P3).

Synteza CPL302415 w skali laboratoryjnej została opisana w publikacji Stypik, Michałek et al. [74]. W procesie tym związek otrzymywany jest z komercyjnie dostępnego substratu (SM) w 4-etapowej syntezie.

Etap utleniania alkoholu pierwszorzędowego, {5-[2-(difluorometylo)-2,3-dihydro-1H-1,3-benzodiazol-1-ilo]-7-(morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-a]pirymidyn-2-ylo}metanolu (1) do 5-[2-

(difluorometylo)-1H-benzimidazol-1-ilo]-7-(morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-a]pirymidyno-2-karbaldehydu (3) jest krytycznym etapem w syntezie CPL302415.

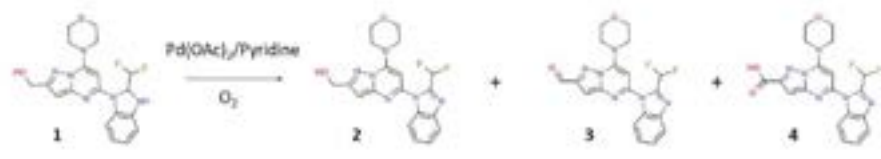
Selektywne utlenianie prekursorów farmaceutycznych, które często są złożonymi cząsteczkami organicznymi zawierającymi wiele grup funkcyjnych, jest na ogół bardzo wymagające [75]. Celem badań było opracowanie parametrów prowadzenia katalitycznego selektywnego utleniania grupy alkoholowej do aldehydu z dużą wydajnością, a także utworzenie jednego podwójnego wiązania w pierścieniu benzimidazolowym, co jest bardzo ważne dla stabilności CPL302415. Dodatkowo etap utleniania powinien być zrównoważony pod względem ekonomicznym i środowiskowym oraz łatwy do zaimplementowania w produkcji na dużą skalę farmaceutycznej substancji aktywnej (API) (CPL302415). Etap ten sprawiał najwięcej trudności także ze względu na niską rozpuszczalność substratu w większości rozpuszczalników organicznych.

W ramach badań związanych z etapem utleniania alkoholu do aldehydu, będącego bezpośrednim substratem do otrzymania CPL302415, opracowano reakcję w reaktorze przepływowym z wykorzystaniem gazowego tlenu, preferowanego na dużą skalę ze względu na niski koszt i niewielki wpływ na środowisko oraz octanu palladu Pd(OAc)<sub>2</sub>, jako taniego i przyjaznego dla środowiska katalizatora. [76-83].

Badania przepływowe przeprowadzono przy użyciu połączonych dwóch systemów Vapourtec easy-Medchem składających się z pomp perystaltycznych razem z czterema reaktorami rurowymi PFA (10 mL, średnica wewnętrzna = 1 mm).

Do określenia krytycznych parametrów procesu i ich interakcji oraz ustalenia optymalnych warunków reakcji dla uzyskania wysokiej wydajności i niskich poziomów zanieczyszczeń zastosowałam podejście DoE.

W pierwszym etapie przeprowadziłam screening parametrów na podstawie ułamkowego planu sześcioczynnikowego dwupoziomowego ( $2^{6-3}$ ) (Tabela P3.1) zawierającego dziesięć eksperymentów i dwa powtórzenia w punkcie centralnym dla zbadania odtwarzalności.

**Tabela P3.1.** Parametry wejściowe i wyniki uzyskane na podstawie planu  $2^{(6-3)}$  (Table 1 z P3).


Entry	Catalyst loading (mol%)	Pyridine eq. per catalyst	T (°C)	PO <sub>2</sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	V of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of 1 <sup>a</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 3 <sup>b</sup> (%)	Yield of 4 <sup>b</sup> (%)
1	5	1.3	80	5	1.0	1.0	9.7	7.4	2.3	0.0
2	5	1.3	120	5	0.1	0.1	12.1	0.0	12.2	0.0
3	5	4	80	2	0.1	1.0	39.0	38.9	0.0	0.0
4	5	4	120	2	1.0	0.1	4.8	4.8	0.0	0.0
5	22.5	2.65	100	3.5	0.55	0.55	51.6	0.0	51.6	0.0
6	22.5	2.65	100	3.5	0.55	0.55	51.1	0.0	51.1	0.0
7	40	1.3	80	2	1.0	0.1	21.7	0.0	21.6	0.0
8	40	1.3	120	2	0.1	1.0	89.2	0.0	89.2	0.0
9	40	4	80	5	0.1	0.1	44.2	0.0	44.2	0.0
10	40	4	120	5	1.00	1.0	60.6	0.0	60.6	0.0

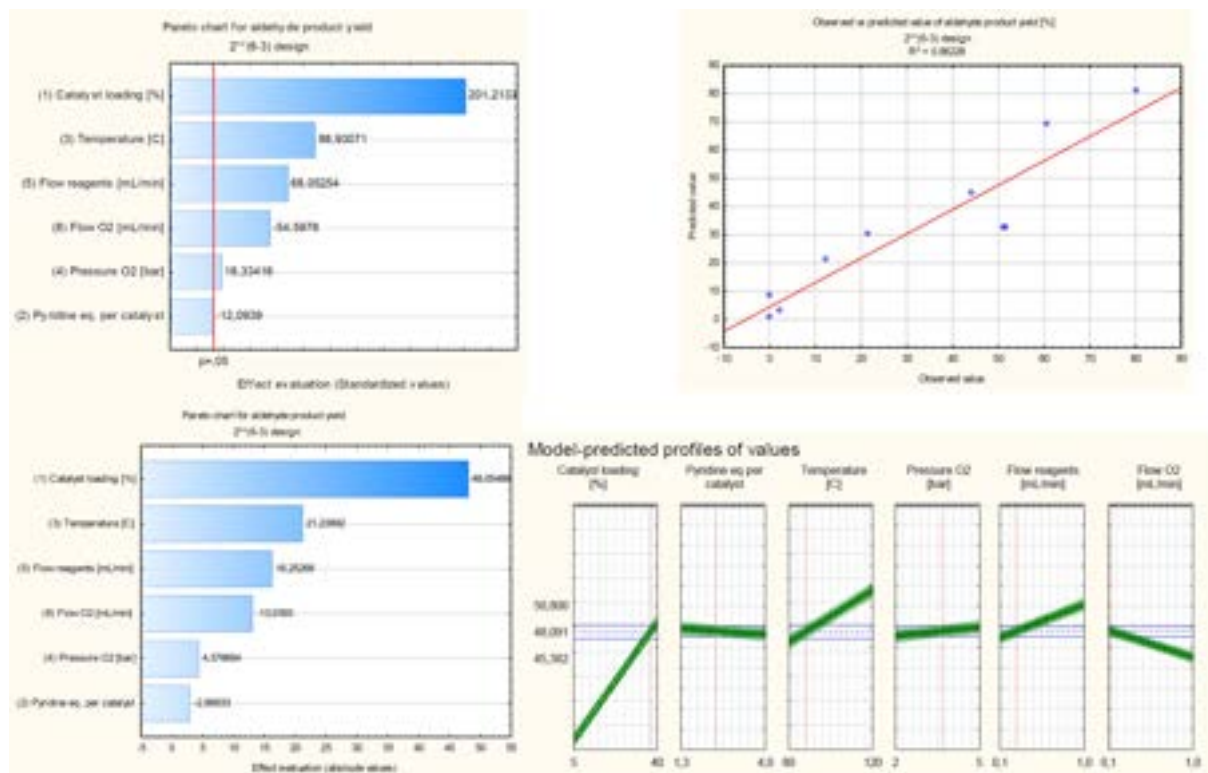
<sup>a</sup> Standard reaction conditions: 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/caprolactone = 1:1. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for details see supplementary material.

Optymalizacji wielowymiarowej poddałam parametry wejściowe w następujących zakresach: temperatura 80-120°C, przepływ reagentów oraz tlenu 0,1-1 ml/min, ilość katalizatora 5-40 %mol, ilość ekwiwalentów pirydyny względem katalizatora od 1,3 do 4, ciśnienie układu 2-5 bar.

Aby ułatwić odpowiednie wymieszanie strumieni i zapewnić właściwy stosunek substrat/katalizator, przepływy katalizatora i roztworu substratu były identyczne. Aby uzyskać rozpuszczalność wszystkich składników reakcji, substrat 1 rozpuszczono w mieszaninie toluenu i kaprolaktonu w niskim stężeniu (0,0125 M). Utlenianie prekursora CPL302415 tlenem cząsteczkowym w przepływie może prowadzić do wielu produktów: alkoholu z odzyskanym podwójnym wiązaniem w pierścieniu benzimidazolowym (2), pożądanego aldehydu z odzyskanym podwójnym wiązaniem (3) i nadmiernie utlenionego produktu kwasowego (4). W badaniach w ramach niniejszej pracy zaobserwowano głównie produkty 2 i 3, a produkt kwasowy powstał w bardzo ograniczonej ilości w określonych warunkach.

Na podstawie wyników badań przesiewowych DoE (**Tabela P3.1**) wygenerowałam model matematyczny z głównymi efektami liniowymi dla wydajności produktu 3 z dobrym dopasowaniem do danych eksperymentalnych,  $R^2 = 0,86$ . Analiza ANOVA pokazała, że ilość katalizatora, temperatura, szybkość przepływu reagentów i ciśnienie O<sub>2</sub> mają statystycznie istotny ( $p < 0,05$ ) wpływ na wydajność powstawania produktu 3. Najważniejszy pozytywny wpływ ( $p = 0,0032$ ) na wydajność aldehydu miała ilość katalizatora. Korzystny wpływ na wydajność syntezy 3 miała również temperatura ( $p = 0,0072$ ) i prędkość przepływu odczynników ( $p = 0,0094$ ). Prędkość przepływu O<sub>2</sub> miała natomiast negatywny wpływ

( $p = 0,0116$ ). Ciśnienie  $O_2$  miało niewielki pozytywny wpływ ( $p = 0,0347$ ), natomiast wpływ ekwiwalentu pirydyny względem katalizatora był bliski granicy poziomu istotności ( $p = 0,052$ ) (**Rysunek P3.2**).



**Rysunek P3.2.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej dla planu  $2^{(6-3)}$  (Figure S1 z P3).

W kolejnym etapie stosowania DoE zaplanowałam badania optymalizacyjne z zastosowaniem planu centralnego kompozycyjnego (CCD) i metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM). Optymalizacji poddałam trzy parametry, które na podstawie badania przesiewowego DoE miały największy wpływ na wydajność reakcji: ilość katalizatora, temperatura i szybkość przepływu odczynników (**Tabela P3.2**).

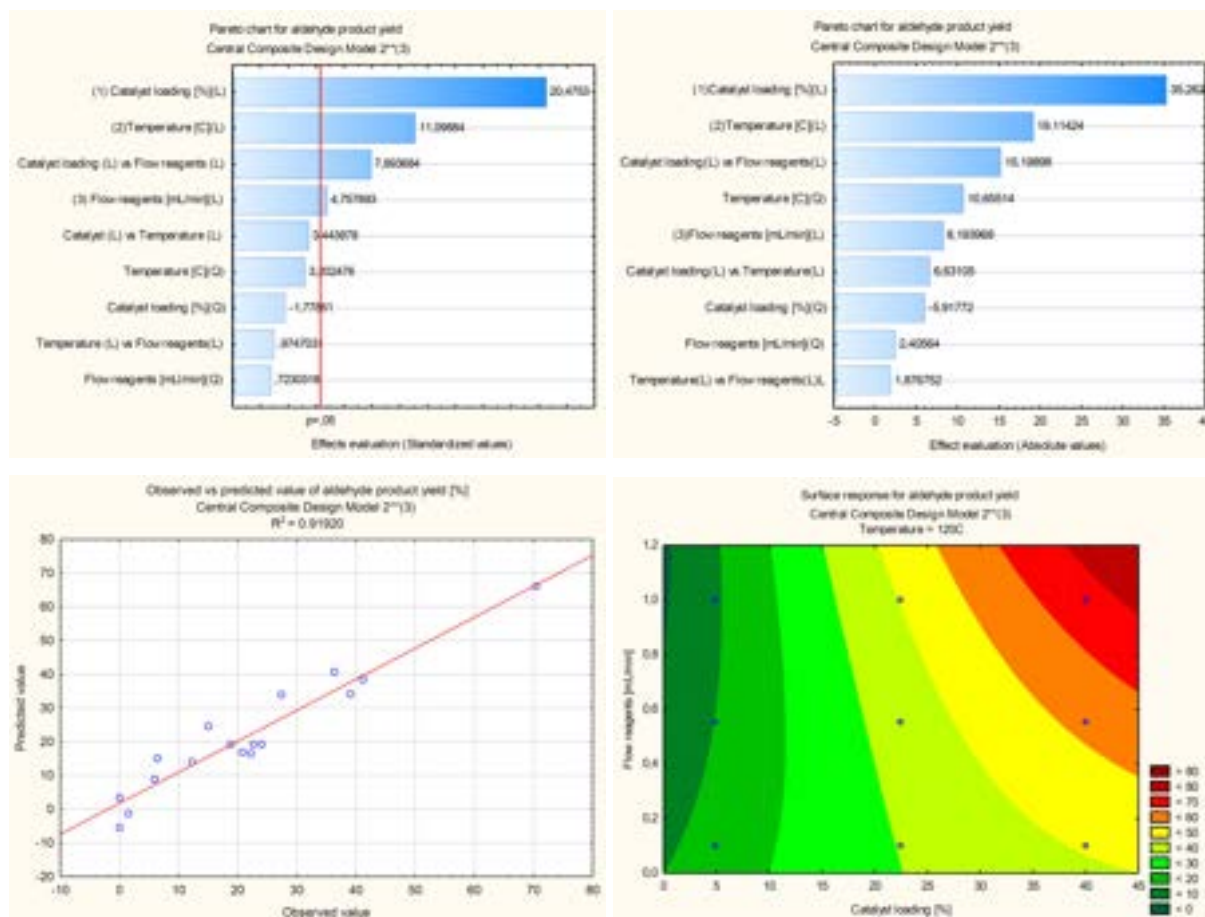
**Tabela P3.2.** (odpowiada Table 2) Parametry wejściowe i wyniki na podstawie planu centralnego kompozycyjnego (CCD) i modelu powierzchni odpowiedzi (RSM).

Entry	Catalyst loading (mol%)	T (°C)	V of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of 1 <sup>a</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 3 <sup>b</sup> (%)
1	5	80	0.1	0.4	0.4	0.0
2	5	80	1.0	17.0	17.0	0.0
3	5	120	0.1	12.3	0.0	12.2
4	5	120	1.0	6.4	0.4	6.0
5	40	80	0.1	20.8	0.0	20.8
6	40	80	1.0	41.2	0.0	41.2
7	40	120	0.1	36.3	0.0	36.3
8	40	120	1.0	70.4	0.0	70.4
9	5	100	0.55	6.0	4.4	1.6
10	40	100	0.55	27.4	0.0	27.4
11	22.5	80	0.55	6.5	0.0	6.5
12	22.5	120	0.55	39.1	0.0	39.1
13	22.5	100	0.1	22.3	0.0	22.3
14	22.5	100	1.0	15.0	0.0	15.0
15	22.5	100	0.55	24.1	0.0	24.1
16	22.5	100	0.55	22.6	0.0	22.6
17	22.5	100	0.55	22.6	0.0	22.6

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate 1 = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/capro lactone = 1 : 1; P<sub>O<sub>2</sub></sub> = 5 bar; catalyst/pyridine = 1/1.3; V<sub>O<sub>2</sub></sub> = 0.1 mL min<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for details see ESI.

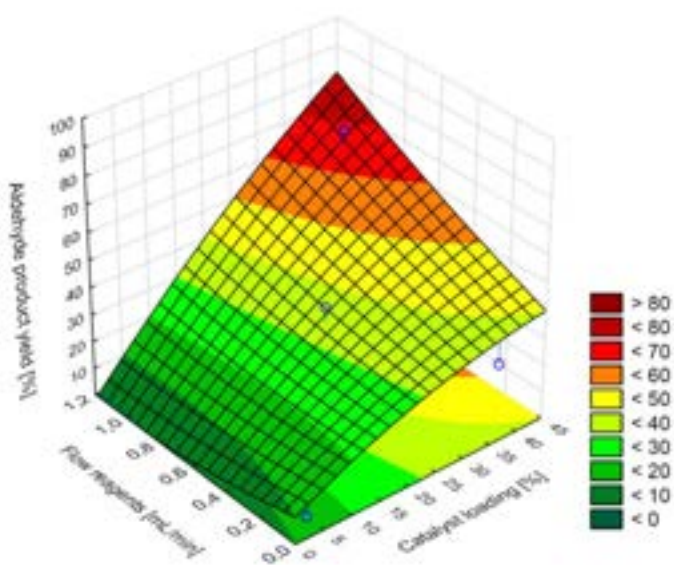
Wartości pozostałych parametrów dobrałam tak, aby zmaksymalizować wydajność produktu aldehydu w oparciu o wyniki etapu analizy przesiewowej. Ciśnienie tlenu ustawiono na 5 bar (im wyższe, tym wyższa wydajność), przepływ tlenu na 0,1 ml/min (im niższa, tym większa wydajność), a ekwiwalent pirydyny względem katalizatora na 1,3 (brak istotnego wpływu na wydajność).

Uzyskałam bardzo dobre dopasowanie modelu CCD do danych eksperymentalnych, R<sup>2</sup> = 0,92. Główne statystycznie istotne efekty badanych parametrów na wydajność powstawania aldehydu miały charakter liniowy, podobnie jak te uzyskane z frakcyjnego planu czynnikowego. Stwierdziłam jednak dodatkowy wpływ interakcji ilości katalizatora z szybkością przepływu odczynników, jako istotny statystycznie efekt dodatni (p = 0,0157). Efekty kwadratowe nie wykazały istotności statystycznej (**Rysunek P3.3**). Ilość katalizatora miała najbardziej pozytywny wpływ (p = 0,0024) na wydajność produktu w oparciu o model CCD (RSM). Temperatura (p = 0,0080) i przepływ reagentów (p = 0,0414) wykazały również istotny pozytywny efekt.



**Rysunek P3.3.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej dla planu centralnego kompozycyjnego (CCD) i modelu powierzchni odpowiedzi (RSM) (Figure S2 z P3).

Jak wynika z modelu CCD, maksymalne przewidywane wydajności syntezy aldehydu w badanym zakresie nie przekraczały 80% przy maksymalnej ilości katalizatora (40%), temperatury (120°C) i przepływu reagentów (1,0 ml/min) (**Rysunek P3.4**).



**Rysunek P3.4.** Powierzchnia odpowiedzi wydajności powstawania aldehydu uzyskana na podstawie planu centralnego kompozycyjnego 2<sup>3</sup>, temperatura = 120°C, P<sub>O2</sub> = 5 bar, V<sub>O2</sub> = 0,1 ml/min (Figure 2 z P3).



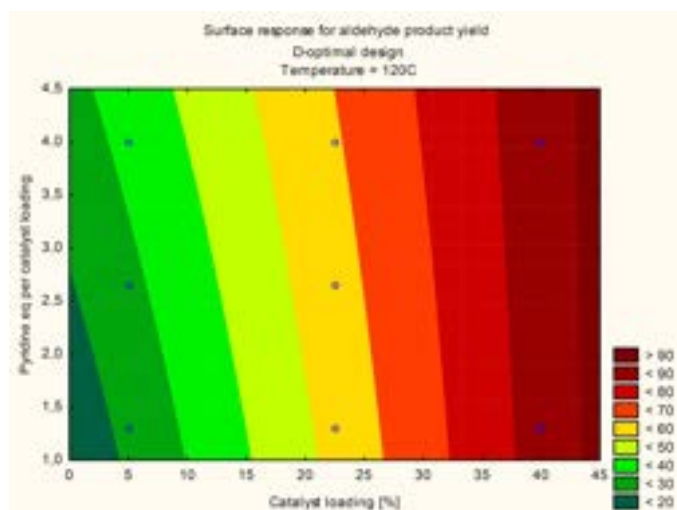
Bazując na danych literaturowych [84] oraz doświadczeniach z reakcjami katalitycznymi wątpliwości wzbudził brak zależności efektywności reakcji od ekwiwalentu pirydyny względem katalizatora. W celu potwierdzenia tego efektu zostały przeprowadzone dodatkowe eksperymenty DoE zgodnie z planem D- optymalnym z trzema zmiennymi parametrami: katalizator, ekwiwalent pirydyny względem katalizatora i przepływ odczynników (**Tabela P3.3**).

**Tabela P3.3.** Parametry wejściowe i wyniki na podstawie planu D- optymalnego (Table 3 z P3).

Entry	Catalyst loading (mol%)	Pyridine eq. per catalyst	V of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of 1 <sup>b</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 3 <sup>b</sup> (%)
1	5	1,3	0,1	51,3	0,0	44,2
2	5	1,3	1,0	22,1	1,1	19,5
3	5	2,65	0,55	19,7	0,0	18,4
4	5	4	1,0	44,3	1,7	36,5
5	22,5	1,3	0,55	63,6	0,0	37,7
6	22,5	2,65	1,0	70,4	0,0	70,4
7	22,5	4	0,1	83,0	0,0	70,1
8	40	1,3	0,1	97,5	3,3	52,1
9	40	1,3	1,0	92,4	0,0	81,2
10	40	4	1,0	88,5	1,6	79,4

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate 1 = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/caprolactone = 1 : 1; P<sub>O<sub>2</sub></sub> = 5 bar; T = 120 °C; V<sub>O<sub>2</sub></sub> = 0.1 mL min<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for.

Ciśnienie tlenu ustawiono na 5 bar, przepływ tlenu na 0,1 ml/min, a temperaturę na 120°C. Otrzymany model potwierdził, że ekwiwalent pirydyny względem katalizatora ma niewielki wpływ na wydajność reakcji (**Rysunek P3.5**).



**Rysunek P3.5.** Powierzchnia odpowiedzi wydajności powstawania aldehydu uzyskana na podstawie planu D- optymalnego, temperatura = 120°C (Figure S3 z P3).

Ponadto, uzyskane wyniki potwierdziły, że w badanym zakresie maksymalna przewidywana wydajność wynosi 85% przy maksymalnej wartości ilości katalizatora 40%, przepływie odczynników 1,0 ml/min i ekwiwalencie pirydyny względem katalizatora wynoszącym 4 (84% dla równoważnika pirydyny względem katalizatora 1,3).

---

Zastosowanie różnych narzędzi podejścia DoE umożliwiło znalezienie istotnych czynników wpływających na efektywność procesu oraz określenie zakresu operacyjnego dającego maksymalne wydzielanie produktu.

Katalityczne utlenianie alkoholu 1 tlenem w przepływie gazu i cieczy w obecności Pd(OAc)<sub>2</sub>/pirydyny charakteryzuje się wyższą wydajnością, lepszą oszczędnością, mniejszym wpływem na środowisko i mniejszym zużyciem energii. Ponadto strumień reagentów z procesu utleniania może zostać wykorzystany do kolejnego etapu syntezy, eliminując konieczność izolacji produktów oraz ich oczyszczania. Uzyskane za pomocą DoE wyniki pozwoliły udoskonalić proces syntezy CPL302415 w porównaniu do dwóch już istniejących metod stechiometrycznych.

#### 7.4. Publikacja P4

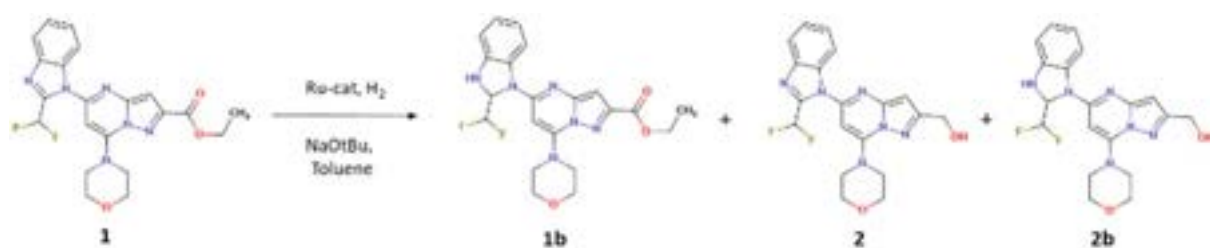
Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415);

Michałek S., Maj M. A.; Gurba-Bryśkiewicz L., Maruszak W., Zagozda M., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;

React. Chem. Eng., 2023, Advanced Article, <https://doi.org/10.1039/D2RE00561A>.

W **Publikacji 4** wchodzącej w skład cyklu niniejszej pracy doktorskiej zastosowałam metody DoE do optymalizacji kolejnego etapu reakcji syntezy CPL302415, redukcji w reaktorze przepływowym. Celem badań było opracowanie katalitycznej lub stechiometrycznej reakcji redukcji grupy estrowej w 5-[2-(difluorometylo)-1H-benzimidazol-1-ilo]-7-(morfolin-4-ylo)pirazolopirymidyno-2-karboksylanie (1) do odpowiedniego alkoholu pierwszorzędowego, {5-[2-(difluorometylo)-1H-1,3-benzodiazol-1-ilo]-7-(morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-a]pirymidyn-2-yl}metanolu (2), w procesie ciągłego przepływu tak, aby możliwe było połączenie procesu w sekwencję teleskopową z etapem utleniania alkoholu (2) do aldehydu (3), opisanym w **Publikacji P3**.

Uwodornienie grupy estrowej substratu (1) może prowadzić do powstania wielu produktów: substratu z uwodornionym pierścieniem benzimidazolowym (1b) (**Rysunek P4.1**), pożądanego alkoholu z podwójnym wiązaniem w pierścieniu benzimidazolowym (2) oraz alkoholu ze zredukowanym wiązaniem podwójnym w pierścieniu benzimidazolowym (2b).



**Rysunek P4.1.** Schemat reakcji redukcji estru 1 katalizowanej Ru (Table 1 z P4).

W celu optymalizacji warunków reakcji i uzyskania maksymalnej wydajności produktu (2) przy minimalizacji ilości produktu ubocznego (2b) wykorzystałam podejście projektowania eksperymentów (DoE).

Zastosowałam plan centralny kompozycyjny (CCD) 2<sup>4</sup> z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Reakcja była prowadzona na katalizatorze Ru-PNN. W optymalizacji wielowymiarowej wzięłam pod uwagę

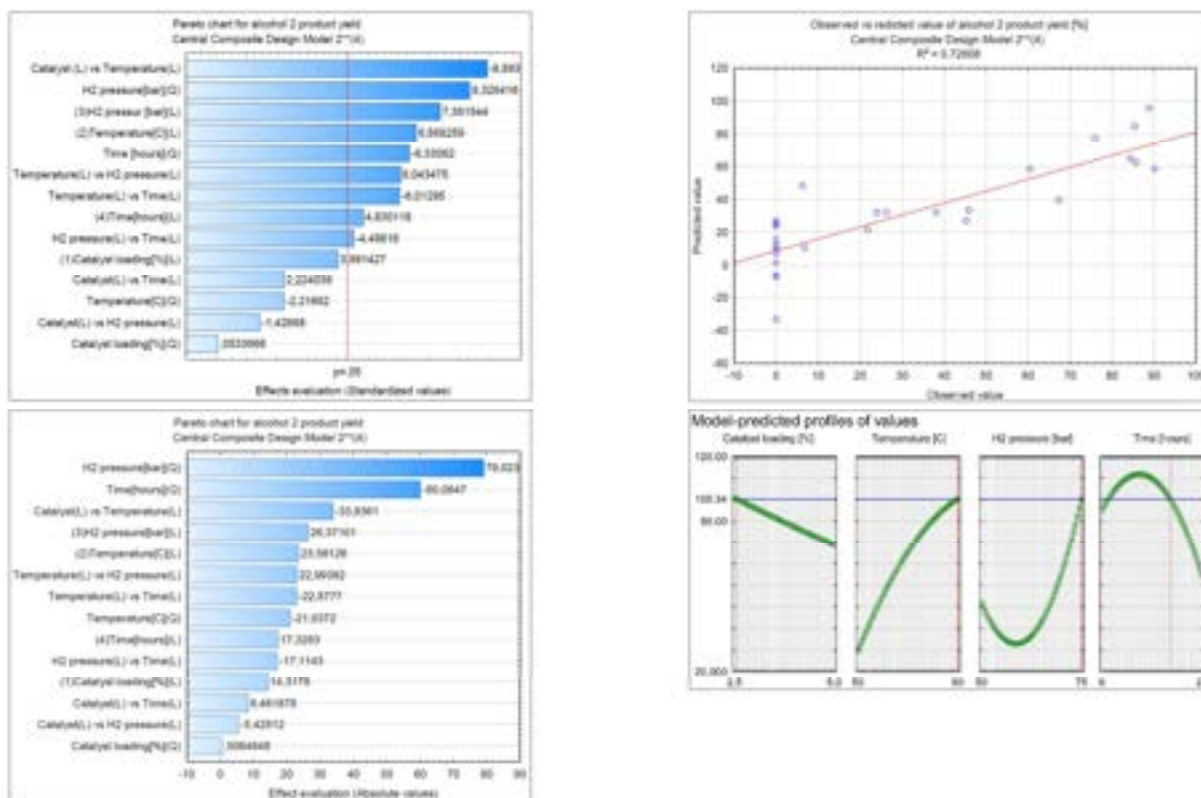
następujące czynniki: ilość katalizatora (w zakresie 2,5 – 5%), temperatura (w zakresie 50 – 80 °C), ciśnienie wodoru H<sub>2</sub> (w zakresie 50 – 75 bar) oraz czas reakcji (w zakresie 6 – 24 godziny) (**Tabela P4.1**).

**Tabela P4.1.** Wyniki reakcji redukcji estru 1 katalizowanej Ru-PNN uzyskane na podstawie dla planu centralnego kompozycyjnego CCD 2<sup>4</sup> (Table S2 z P4).

Entry	Catalyst loading (%)	T (°C)	PH <sub>2</sub> (bar)	Time (h)	% of 1 <sup>a</sup>	% of 1b <sup>a</sup>	% of 2 <sup>a</sup>	% of 2b <sup>a</sup>	Σ % of 2+2b <sup>a</sup>
1	2.5	50	50	6	98.50	0	0	0	0
2	2.5	50	50	24	98.56	0	0	0	0
3	2.5	50	75	6	97.74	0	0	0	0
4	2.5	50	75	24	96.44	0	0	0	0
5	2.5	80	50	6	96.77	0	0	0	0
6	2.5	80	50	24	1.17	0	45.29	52.64	97.93
7	2.5	80	75	6	2.08	0	88.86	0.75	89.61
8	2.5	80	75	24	0.00	0	84.31	15.69	100.00
9	5.0	50	50	6	93.38	0	0.00	0	0
10	5.0	50	50	24	1.86	0	75.95	0	75.95
11	5.0	50	75	6	89.08	0	0.00	0	0
12	5.0	50	75	24	1.09	0	90.15	2.29	92.44
13	5.0	80	50	6	92.58	0	0.00	0	0
14	5.0	80	50	24	4.45	0	21.81	66.20	88.01
15	5.0	80	75	6	3.17	0	85.77	6.97	92.74
16	5.0	80	75	24	0.00	0	6.30	88.53	94.83
17	2.5	65	62.5	15	98.04	0	0.00	0	0
18	5.0	65	62.5	15	5.02	0	67.35	21.73	89.08
19	3.75	50	62.5	15	94.67	0	0.00	0	0
20	3.75	80	62.5	15	12.62	0	45.81	39.06	84.87
21	3.75	65	50	15	0.94	0	60.44	35.22	95.66
22	3.75	65	75	15	1.55	0	85.43	9.93	95.36
23	3.75	65	62.5	6	96.34	0	0.00	0	0
24	3.75	65	62.5	24	0.00	0	6.76	93.24	100.00
25 (C)	3.75	65	62.5	15	0.00	0	26.31	69.32	95.63
26 (C)	3.75	65	62.5	15	0.45	0	38.18	57.11	95.29
27 (C)	3.75	65	62.5	15	0.00	0	23.99	76.01	100.00

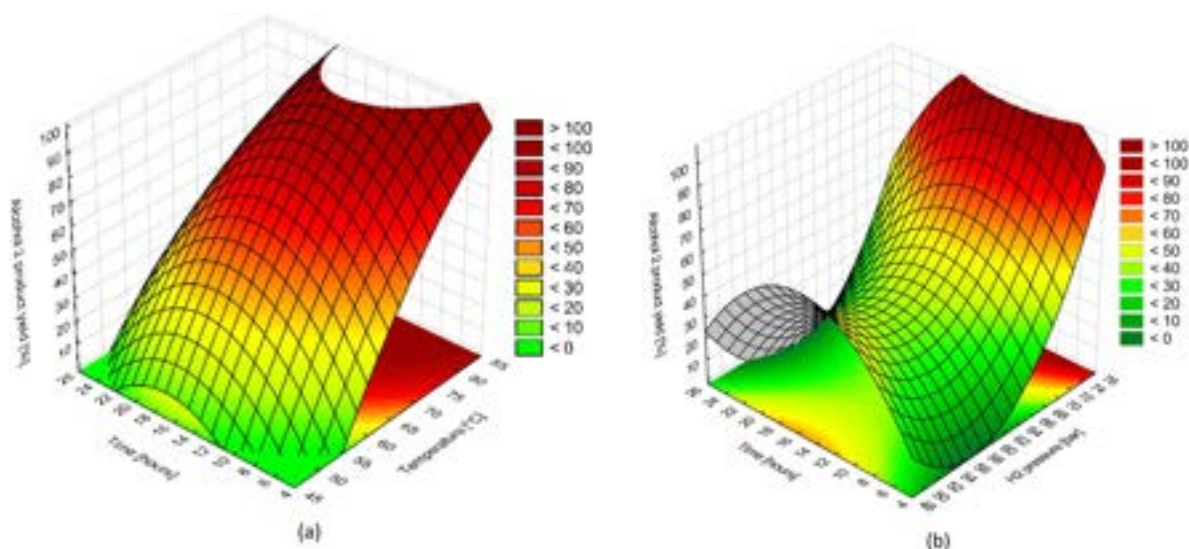
<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate 1 = 150 mg (0.339 mmol); catalyst/NaOtBu = 1/10; Toluene = 8 mL; <sup>a</sup> determined by UHPLC.

Dopasowanie otrzymanego modelu CCD wyniosło  $R^2 = 0,73$ . Na podstawie wyników analizy ANOVA wykazałam, że wydajność reakcji redukcji zależy istotnie statystycznie od następujących czynników: efektu interakcji ilości katalizatora z temperaturą (efekt ujemny,  $p = 0,0124$ ), ciśnienia H<sub>2</sub> (dodatni efekt liniowy,  $p = 0,0180$  i dodatni efekt kwadratowy  $p = 0,0141$ ), temperatury (dodatni efekt liniowy,  $p = 0,0224$ ), czasu reakcji (ujemny efekt kwadratowy,  $p = 0,0240$ ) (**Rysunek P4.2**).



**Rysunek P4.2.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej dla planu centralnego kompozycyjnego (CCD) <sup>24</sup> (Figure S1 z P4).

Jak wynika z modelu CCD, przewidywaną wydajność produktu (2) powyżej 98% można uzyskać przy ilości katalizatora 2,5%, w temperaturze 80°C, przy ciśnieniu H<sub>2</sub> 75 bar i przy czasie prowadzenia reakcji (w zakres od 6,5 do 18,5 godziny, maksimum wydajności uzyskano do 12,8 godziny) (**Rysunek P4.3 a i b**). Generalnie, dla ilości katalizatora 2,5% i przy ciśnieniu H<sub>2</sub> 75 barów (**Rysunek P4.3 a**) w całym zakresie temperatur zaobserwowałam maksymalną wydajność reakcji syntezy alkoholu (2) przy czasie reakcji w zakresie od 6 do 20 godzin. Przy krótszym czasie reakcji substrat (1) nie został zużyty całkowicie, ale z drugiej strony przy czasie powyżej 20 godzin, wygenerowano więcej produktu ubocznego (2b). W temperaturze poniżej 60°C wydajność alkoholu (2) nie przekraczała 60%. Dla ilości katalizatora 2,5% i temperatury 80°C obserwowano dość wąski optymalny zakres ciśnienia H<sub>2</sub>. Maksymalną wydajność produktu (2) osiągnięto przy ciśnieniu około 73–75 barów, a przy ciśnieniu H<sub>2</sub> poniżej 70 barów wydajności nie przekraczały 60%.



**Rysunek P4.3.** Powierzchnia odpowiedzi wydajności powstawania alkoholu 2 uzyskana na podstawie planu centralnego kompozycyjnego  $2^4$ , (a) ilość katalizatora = 2,5%, ciśnienie  $H_2$  = 75 bar, (b) ilość katalizatora = 2,5%, temperatura = 80°C (Figure 3a i 3b z P4).

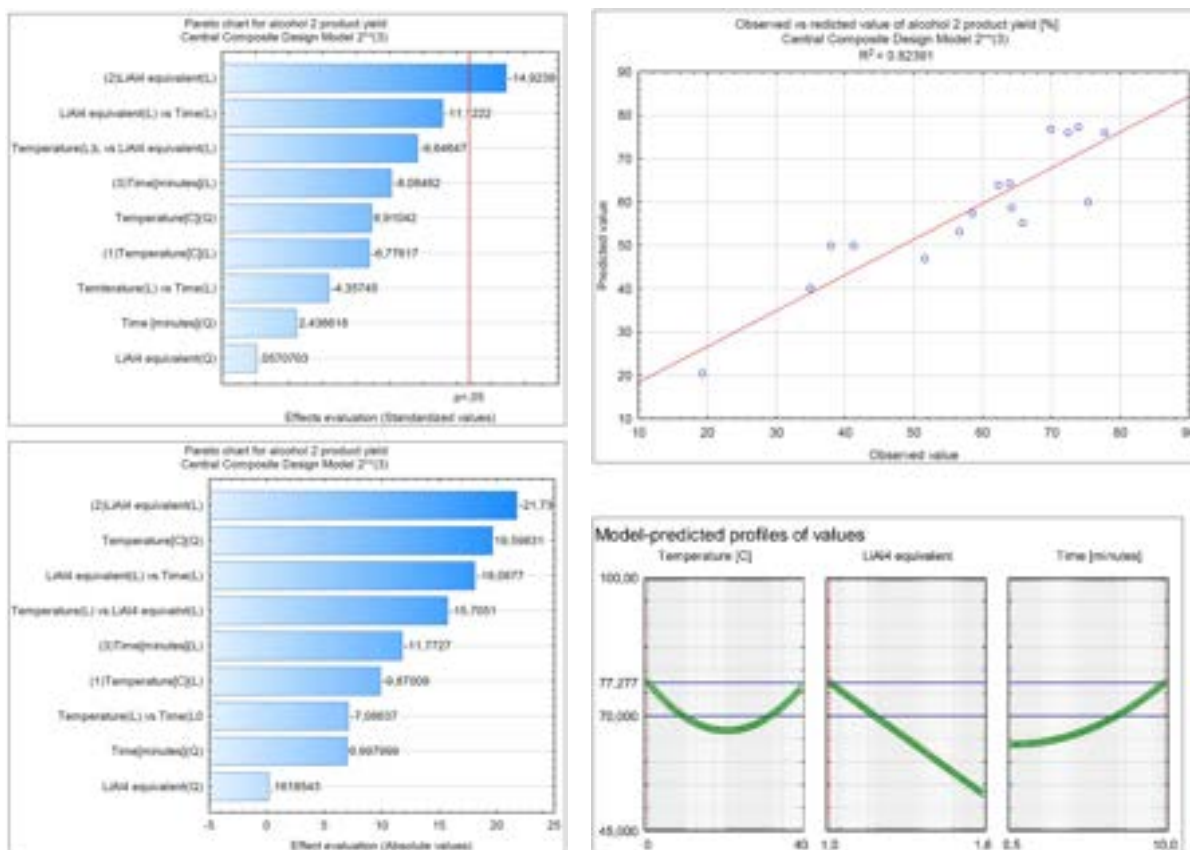
Podejście DoE w ramach **Publikacji P4** zastosowałam również do optymalizacji alternatywnej, w stosunku do katalitycznej, reakcji redukcji estru (1) do alkoholu (2) w reaktorze przepływowym z zastosowaniem  $LiAlH_4$ . Eksperymenty zostały wykonane według planu centralnego kompozycyjnego (CCD)  $2^3$ . Optymalizacji poddałam trzy czynniki: temperaturę (w zakresie 0 – 40°C), czas reakcji (w zakresie 0,5 – 10 min) oraz ilość ekwiwalentów  $LiAlH_4$  (w zakresie 1,0 – 1,6). Szczegółowy plan eksperymentów oraz uzyskane wyniki są przedstawione w **Tabeli P4.2**.

**Tabela P4.2.** Parametry wejściowe i wyniki uzyskane na podstawie planu centralnego kompozycyjnego (CCD)  $2^3$  dla reakcji redukcji estru 1 w obecności LAH (Table 2 z P4).

Reaction conditions <sup>a</sup>				Results <sup>b</sup> (%)			
Entry	T (°C)	Eq LAH	Time (min)	Conversion of 1	Yield of 2	Yield of 2b	Yield of 2 + 2b
1	0	1.0	0.5	77.8	62.3	4.0	66.3
2	0	1.6	0.5	95.0	77.8	7.6	85.4
3	0	1.0	10.0	93.7	73.9	9.2	83.1
4	0	1.6	10.0	99.3	56.6	26.7	83.3
5	40	1.0	0.50	85.1	70.0	5.0	75.0
6	40	1.6	0.50	99.6	58.5	21.9	80.4
7	40	1.0	10.0	88.2	72.4	5.6	78.0
8	40	1.6	10.0	99.8	19.3	45.2	64.5
9	0	1.3	4.75	98.8	63.9	20.6	84.5
10	40	1.3	4.75	99.0	65.8	16.2	82.0
11	20	1.3	0.50	99.4	64.2	19.9	84.1
12	20	1.3	10.0	99.4	38.0	37.6	75.6
13	20	1.0	4.75	92.0	75.3	7.3	82.7
14	20	1.6	4.75	99.7	34.9	29.7	64.6
15	20	1.3	4.75	99.7	38.0	37.6	75.6
16	20	1.3	4.75	99.7	41.2	33.0	76.2

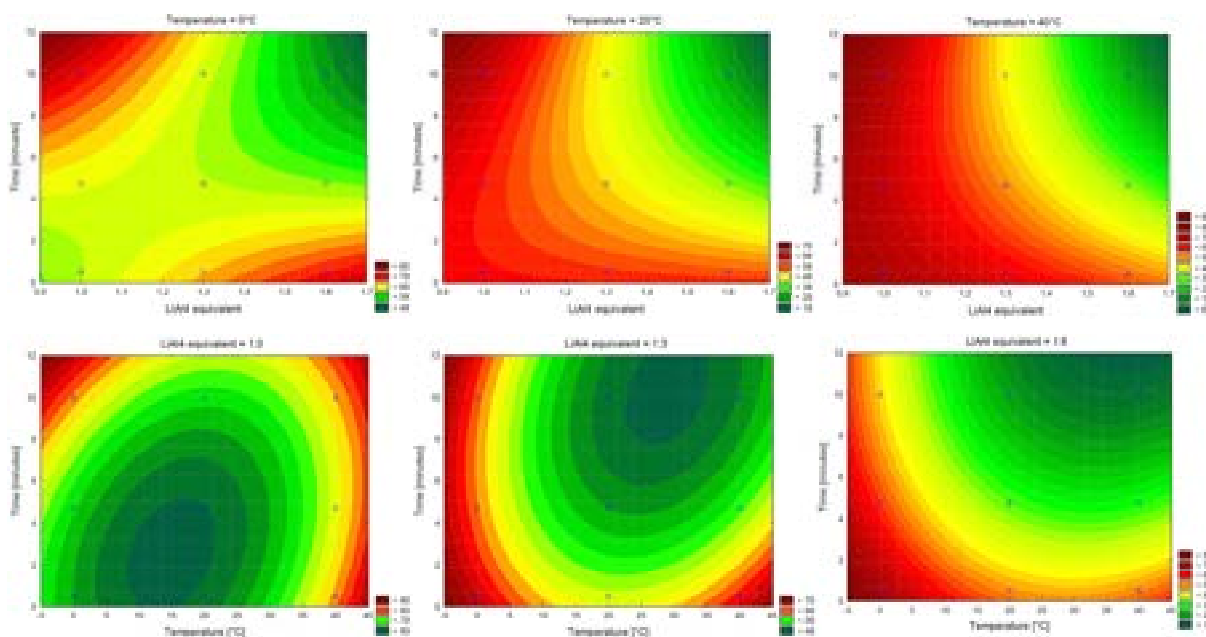
<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate 1 = 50 mg (0.11 mmol); dissolved in 2 mL THF. <sup>b</sup> % determined by UHPLC; for details, see the ESI†

Dopasowanie otrzymanego modelu CCD wyniosło  $R^2 = 0,82$ . Na podstawie wyników analizy ANOVA wykazałam, że wydajność reakcji redukcji zależy istotnie statystycznie jedynie od ilości ekwiwalentów  $LiAlH_4$  (negatywny efekt liniowy,  $p = 0,0426$ ) (**Rysunek P4.4**).



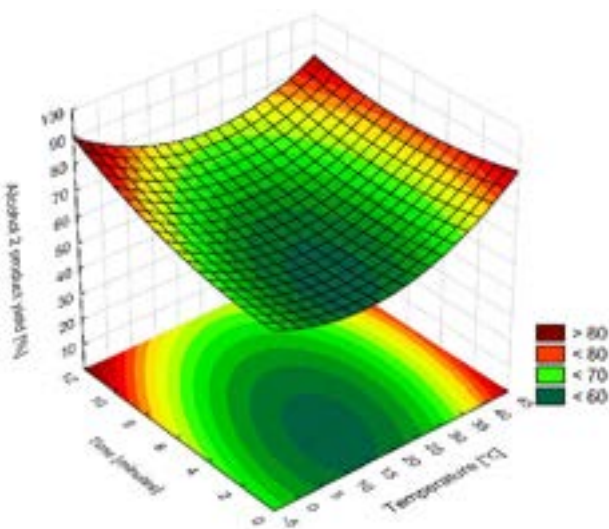
**Rysunek P4.4.** Podsumowanie wyników analizy statystycznej planu centralnego kompozycyjnego (CCD) 2<sup>3</sup> dla reakcji redukcji estru 1 w obecności LAH (Figure S3 z P4).

Kolejnymi czynnikami wpływającymi na wydajność reakcji były efekty interakcyjne ekwiwalentu LiAlH<sub>4</sub> z temperaturą i czasem prowadzenia reakcji. Efekty te były negatywne, ale nie wykazały istotności statystycznej. Według modelu temperatura nie miała istotnego wpływu na konwersję substratu i ilość utworzonego (2b), ale miała istotny statystycznie pozytywny wpływ liniowy na ilość produktów ubocznych (im wyższa temperatura, tym więcej zanieczyszczeń). Zależności wydajności reakcji od zmieniających się wartości optymalizowanych parametrów przedstawiono na **Rysunku P4.5**.



**Rysunek P4.5.** Wybrane wykresy powierzchni odpowiedzi wydajności powstawania alkoholu 2 uzyskane na podstawie planu centralnego kompozycyjnego (CCD)  $2^3$  dla reakcji redukcji estru 1 w obecności LAH (Figure S4 z P4).

Na podstawie uzyskanego modelu obliczyłam, że maksymalna przewidywana wydajność reakcji syntezy alkoholu (2) w badanym zakresie wynosiła 77,3% przy minimalnej wartości temperatury ( $0^\circ\text{C}$ ), minimalnej wartości ekwiwalentu  $\text{LiAlH}_4$  (1,0) i maksymalnym czasie (10 min) (**Rysunek P4.6**).



**Rysunek P4.6.** Powierzchnia odpowiedzi wydajności powstawania alkoholu 2 uzyskane na podstawie planu centralnego kompozycyjnego (CCD)  $2^3$  dla reakcji redukcji estru 1 w obecności LAH, ekwiwalent  $\text{LiAlH}_4 = 1,0$  (Figure 5 z P4).

Z uwagi na fakt, że chłodzenie nie jest preferowane w procesie przepływowym i utrzymanie optymalnej na podstawie modelu temperatury  $0^\circ\text{C}$  byłoby kłopotliwe, obliczyłam, przy jakich wartościach ekwiwalentu  $\text{LiAlH}_4$  i czasu reakcji można byłoby uzyskać maksymalną wydajność syntezy produktu (2) w bardziej użytkowej temperaturze



20°C. Przy minimalnej wartości równoważnika  $\text{LiAlH}_4$  (1,0) i maksymalnym czasie (10 minut) i temperaturze 20°C, teoretyczna aproksymowana na podstawie modelu wydajność reakcji syntezy (2) wyniosła 67%. W celu weryfikacji wyników teoretycznych przeprowadzono reakcje przez 10 minut, z użyciem 1,0 ekwiwalentu  $\text{LiAlH}_4$  i w temperaturze 0°C oraz 20°C. W temperaturze 0°C uzyskano pełną konwersję substratu (1) i wydajność reakcji zbliżoną do obliczonej, wynoszącą 70,3% (2) i 20,6% (2b). Dla reakcji prowadzonej w temperaturze 20°C uzyskana rzeczywista sumaryczna wydajność dla obu zredukowanych produktów (2 i 2b) była zgodna z teoretyczną, a wydajności poszczególnych alkoholi nieznacznie odbiegały od wartości teoretycznych i wynosiły odpowiednio 53,8% (2) oraz 32,4% (2b). Pomimo niezadowolających wstępnych wyników selektywności reakcji redukcji prowadzonej w temperaturze 20°C, ale z uwagi na fakt, że warunki te byłyby niezwykle korzystne z punktu widzenia prowadzenia procesu w większej skali (nie wymagałyby zastosowania żadnych dodatkowych elementów chłodzących ani grzewczych) przeprowadzono syntezę w skali 1 g. Uzyskano 83% wydajności pożądanego produktu (2) z zadowalającą selektywnością.

Zastosowanie podejścia DoE pozwoliło poznać i skutecznie zoptymalizować prowadzenie procesu redukcji otrzymywania alkoholu (2) w reaktorze przepływowym, stanowiącego drugi etap wytwarzania innowacyjnej substancji czynnej CPL302415.

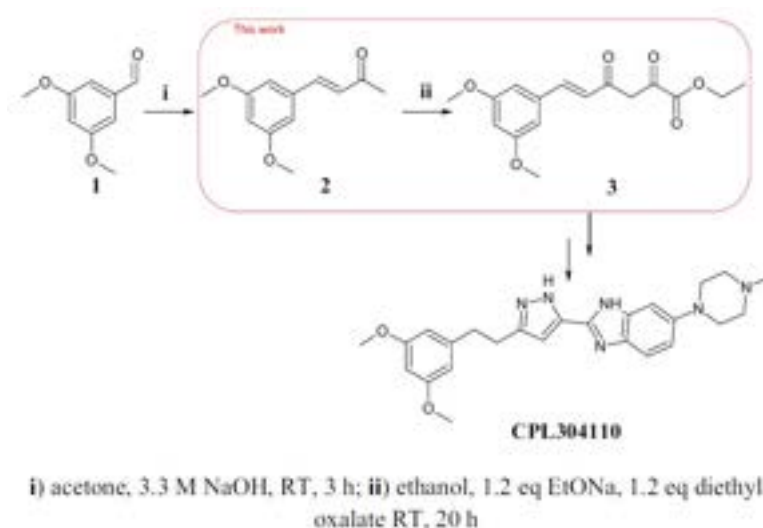
## 7.5. Publikacja P5

Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor;

Michałek S.; Powała A.; Gurba-Bryśkiewicz L.; Piórkowska N.; Olejkowska P.; Yamani A.; Ochal Z.; Dubiel K.; Wieczorek M.;

Monatsh Chem, 2023, 154, 1307–1314, <https://doi.org/10.1007/s00706-023-03121-z>.

**Publikacja 5** wchodząca skład cyklu niniejszej pracy doktorskiej przedstawia zastosowanie podejścia DoE do optymalizacji jednego z etapów syntezy związku CPL304110, inhibitora pan-FGFR [85] (**Rysunek P5.1**) z wykorzystaniem reaktorów przepływowych.



**Rysunek P5.1.** Schemat reakcji kondensacji Claisena w syntezie związku CPL304110 (Scheme 1 z P5).

Wstępnie opracowany etap syntezy w reaktorze okresowym z użyciem etanolu jako rozpuszczalnika oraz etanolanu sodu jako zasady trwał 20 h w temperaturze pokojowej, a wydajność otrzymywania produktu po oczyszczeniu wynosiła 73%. Badania w ramach niniejszej publikacji miały na celu skrócenie czasu prowadzenia reakcji oraz podwyższenie wydajności.

Optymalizację parametrów reakcji w reaktorze przepływowym przeprowadziłam w oparciu o plan centralny kompozycyjny (CCD)  $2^4$  z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Optymalizacji poddałam następujące parametry: temperatura w zakresie 20 – 40°C, czas 2 – 8 min., ilość ekwiwalentów zasady oraz szczawianu dietylu 1,0 – 1,4. W celu minimalizacji ilości wykonywanych eksperymentów, ilość ekwiwalentów szczawianu etylu i etanolanu sodu potraktowałam wstępnie jako jeden parametr.

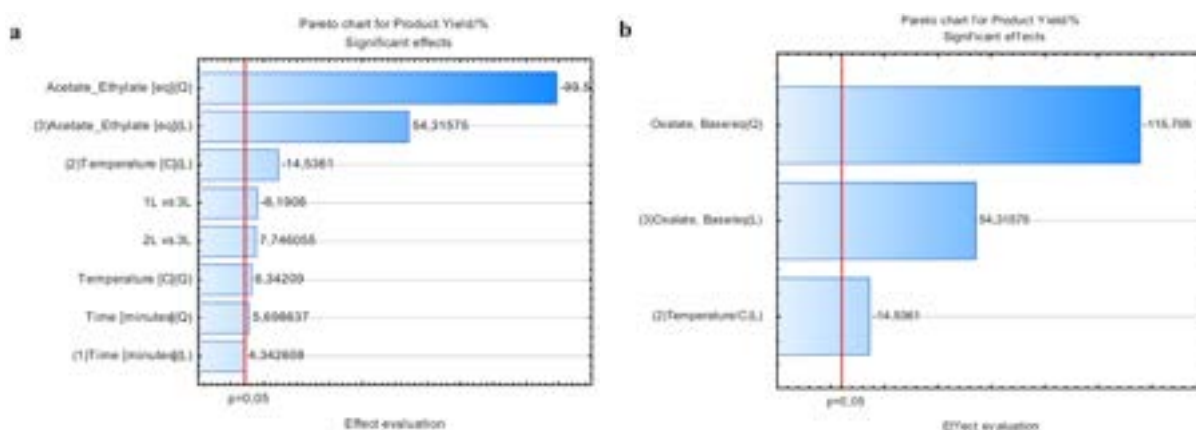
Plan eksperymentów i uzyskane wyniki przedstawione są w **Tabeli P5.1**.

**Tabela P5.1.** Parametry wejściowe i wyniki uzyskane na podstawie planu centralnego kompozycyjnego (CCD)  $2^4$  (Table 1 z P5).

Entry	Time /min	Temperature/°C	Diethyl oxalate and sodium ethoxide equivalents	Conversion/%	Product yield/%
1	2	20	1.0	88.1	83.6
2	2	20	1.4	93.9	90.1
3	2	40	1.0	85.9	81.2
4	2	40	1.4	91.9	88.5
5	8	20	1.0	91.5	86.0
6	8	20	1.4	93.7	88.9
7	8	40	1.0	86.7	82.2
8	8	40	1.4	92.8	88.6
9	2	30	1.2	99.4	96.0
10	8	30	1.2	99.6	96.2
11	5	20	1.2	99.7	96.5
12	5	40	1.2	99.5	95.9
13	5	30	1.0	84.1	79.0
14	5	30	1.4	93.4	88.6
15 (C)	5	30	1.2	99.8	97.0
16 (C)	5	30	1.2	99.7	97.0
17 (C)	5	30	1.2	99.7	97.3

\*Yield determined by UHPLC

Uzyskałam model o bardzo wysokim współczynniku dopasowania,  $R^2 = 0,96$ . Na podstawie analizy statystycznej wyników stwierdziłam, że większość badanych efektów ma istotny statystycznie wpływ na wydajność produktu (**Rysunek P5.2 a**). Do dalszej analizy wybrałam trzy najsilniejsze efekty: ekwiwalent szczawianu dietylu i etanolanu sodu (negatywny efekt kwadratowy), ekwiwalent szczawianu dietylu i etanolanu sodu (pozytywny efekt liniowy) oraz temperatura (negatywny efekt liniowy) (**Rysunek P5.2 b**).



**Rysunek P5.2.** Wykres Pareto dla **a** wszystkich istotnych statystycznie efektów, **b** dla trzech najsilniejszych istotnych statystycznie efektów (Fig.1 z P5).

Optymalne parametry reakcji obliczone na podstawie modelu wyniosły odpowiednio: temperatura = 20°C, ekwiwalent szczawianu dietylu i etanolanu sodu = 1,23, czas reakcji w całym badanym zakresie od 2 do 8 min.

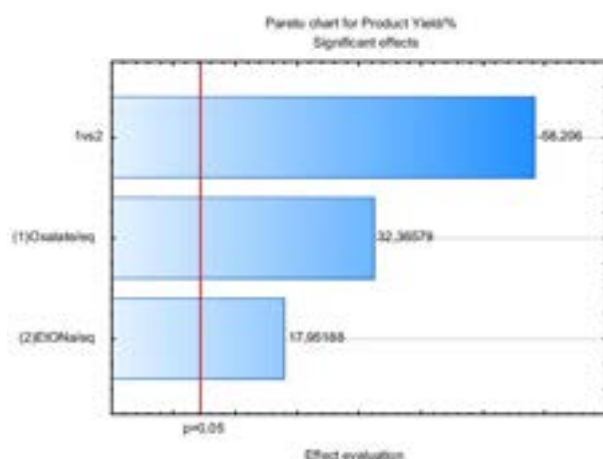
Z uwagi na fakt, że ekwiwalent szczawianu dietylu i etanolanu sodu okazał się czynnikiem najsilniej i istotnie statystycznie wpływającym na wydajność, przeprowadziłam dodatkową optymalizację DoE dla ekwiwalentów szczawianu dietylu i etanolanu sodu jako osobnych zmiennych. Zastosowałam pełny dwuczynnikowy plan eksperymentów  $2^2$  z trzema powtórzeniami w punkcie centralnym (**Tabela P5.2**).

**Tabela P5.2.** Parametry wejściowe i wyniki uzyskane dla planu kompletnego  $2^2$  (Table 2 z P5).

Entry	Time/min	Temperature/°C	Diethyl oxalate eq	Sodium ethoxide eq	Conversion/%	Product yield/%
1	5	30	1.0	1.4	98.6	93.5
2	5	30	1.4	1.0	98.9	96.3
3	5	30	1.0	1.0	84.1	79.0
4	5	30	1.4	1.4	93.4	88.6
5(C)	5	30	1.2	1.2	99.7	97.0
6(C)	5	30	1.2	1.2	99.7	97.0
7(C)	5	30	1.2	1.2	99.9	97.3

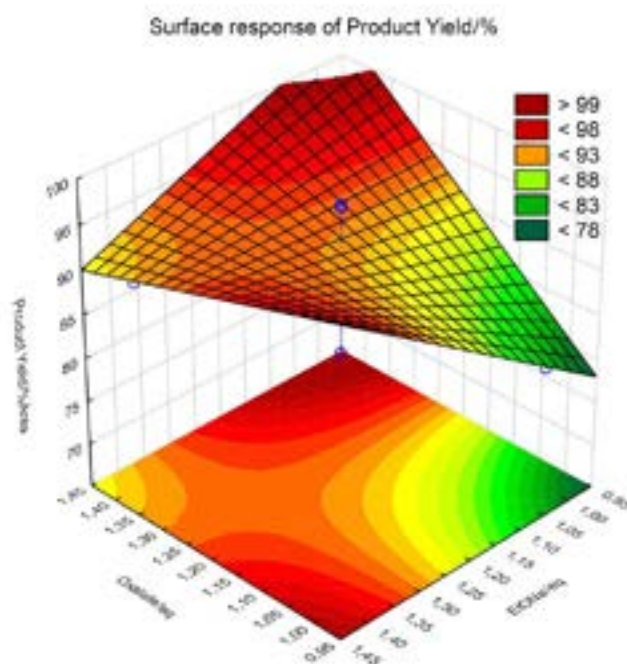
\*Yield determined by UHPLC

Temperatura i czas reakcji wyniosły odpowiednio 30°C i 5 minut. Ze względu na mały zbiór danych uzyskany model nie posiada idealnego dopasowania ( $R^2 = 0,63$ ), ale dostarcza wystarczającej informacji o ogólnej liniowej zależności pomiędzy badanymi zmiennymi. Zarówno osobno ekwiwalent szczawianu dietylu i etanolanu sodu (efekty pozytywne) jak również ich interakcja (efekt negatywny) mają istotny statystycznie wpływ na wydajność produktu (**Rysunek P5.3**).



**Rysunek P5.3.** Wykres Pareto dla istotnych statystycznie efektów (plan DoE  $2^2$ ) (Fig.3 z P5).

Optymalne, maksymalne wydajności produktu wyznaczone na podstawie modelu uzyskano w przypadku gdy jeden lub oba ekwiwalenty były powyżej 1,2. Dla wartości ekwiwalentów powyżej 1,3, wydajność nieznacznie maleje (**Rysunek P5.4**).



**Rysunek P5.4.** Powierzchnia odpowiedzi wydajności syntezy produktu (plan DOE  $2^2$ ) (Fig 4 z P5).

Zastosowanie DoE pozwoliło skutecznie zoptymalizować parametry syntezy w reaktorze przepływowym w kilku eksperymentach. Czas reakcji skrócono do 2 min przy zadowalającej wydajności 84%, wysokiej wydajności przestrzenno-czasowej ( $3720 \text{ kg/h m}^3$ ) i łącznym przerobie produktu wynoszącym  $74,4 \text{ g/h}$ . Przeprowadzone badania stanowią także podstawę do przeniesienia dalszych etapów syntezy CPL304110 do przepływu ciągłego i połączenia ich w proces teleskopowy.

## 8. Podsumowanie i wnioski

Zaprezentowane publikacje będące podstawą niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają osiągnięcie założeń pracy. Przedstawione przykłady zastosowania podejścia QbD, AQbD oraz narzędzi statystycznych planowania eksperymentów (DoE) w różnych obszarach rozwoju innowacyjnych substancji czynnych i produktów leczniczych stanowią dowód na efektywność i użyteczność tych podejść. Pozwalają na lepsze zrozumienie produktu i procesu, a tym samym opracowanie bardziej wydajnych procesów.

Skuteczność zastosowania podejścia AQbD oraz DoE wykazałam przy opracowaniu metody UHPLC ilościowego oznaczania pełnego profilu dziewięciu zanieczyszczeń innowacyjnej substancji farmaceutycznej CPL409116 (inhibitor JAK/ROCK). Przeprowadziłam badania przesiewowe, w oparciu o pełny plan czynnikowy  $2^2$ . Do zbadania odporności metody zastosowałam ułamkowy planu czynnikowy  $2^{(4-1)}$ . Symulację Monte-Carlo zastosowałam do obliczenia prawdopodobieństwa, że parametry CMA spełnią wymagania specyfikacji. Wygenerowałam operacyjny zakres metody (MODR): kolumna Zorbax Eclipse Plus C18, wodna faza ruchoma 10 mM  $\pm$  1mM wodny roztwór HCOOH o pH 2,6, 20%  $\pm$  1% ACN na początku i 85%  $\pm$  1% ACN na końcu gradient i temperatura kolumny 30°C  $\pm$  2°C. Metodę zwalidowałam zgodnie z wytyczną ICH Q2(R1). Opracowana metoda spełniła wymagania liniowości, precyzji i odporności. LOQ wyniosło 0,05%, a LOD 0,02% dla wszystkich zanieczyszczeń.

Skuteczne wykorzystanie koncepcji QbD i/lub DoE do optymalizacji składu i postaci produktów leczniczych przedstawiłam w pracy przeglądowej na przykładzie rozwoju nanocząstek lipidowych do dostarczania różnych rodzajów RNA. Dokonałam analizy i porównania metod DoE oraz aspektów QbD stosowanych w prezentowanych pracach optymalizacyjnych [47-62].

Kolejnym obszarem branży farmaceutycznej, gdzie wykazałam efektywność i korzyść stosowania podejścia DoE jest synteza innowacyjnych API. Za pomocą DoE skutecznie zoptymalizowałam prowadzenie dwóch etapów procesu wytwarzania innowacyjnej substancji czynnej CPL302415 (inhibitora PI3K $\delta$ ) w reaktorach przepływowych: etapu utleniania katalizowanego Pd oraz etapu redukcji grupy estrowej. W pierwszym etapie optymalizacji reakcji utleniania zostały przeprowadzone badania przesiewowe na podstawie ułamkowego planu sześcioczynnikowego dwupoziomowego ( $2^{(6-3)}$ ) z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym. Parametry, które na podstawie badania przesiewowego, miały największy wpływ na wydajność reakcji poddano szczegółowej optymalizacji stosując plan centralny kompozycyjny (CCD) i metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Dodatkowe

eksperymenty, zgodnie z planem D- optymalnym z trzema zmiennymi parametrami, zostały przeprowadzone, w celu potwierdzenia braku wpływu ekwiwalentu pirydyny względem katalizatora.

Optymalizacja reakcji redukcji na katalizatorze Ru-PNN została przeprowadzona w oparciu o plan centralny kompozycyjny (CCD)  $2^4$  z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Podejście DoE zastosowałam również do optymalizacji reakcji alternatywnej w stosunku do katalitycznej, redukcji estru do alkoholu w reaktorze przepływowym z zastosowaniem  $\text{LiAlH}_4$ . Eksperymenty zostały wykonane zgodnie z planem centralnym kompozycyjnym (CCD)  $2^3$  dla trzech czynników.

Odpowiednie zastosowanie różnych narzędzi podejścia DoE do określonych celów pozwoliło określić krytyczne parametry wpływające na efektywność optymalizowanych etapów reakcji syntezy CPL302415 oraz określić zakresy operacyjne pozwalające na uzyskanie maksymalnej wydajności produktów.

Skuteczne zastosowanie podejścia DoE wykazałam także podczas optymalizacji parametrów syntezy innowacyjnej substancji aktywnej CPL304110 (inhibitora pan-FGFR) w reaktorze przepływowym. W oparciu o plan centralny kompozycyjny (CCD)  $2^4$  z dwoma powtórzeniami w punkcie centralnym oraz metodologię powierzchni odpowiedzi (RSM). Przeprowadziłam także optymalizację DoE dla ekwiwalentów szczawianu dietylu i etanolanu sodu jako osobnych zmiennych. Zastosowałam pełny dwuczynnikowy plan eksperymentów  $2^2$  z trzema powtórzeniami w punkcie centralnym. Zastosowane podejście DoE pozwoliło na uzyskanie maksymalnej wydajności produktu 84% przy skróceniu czasu prowadzenia reakcji do 2 min, w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  i ekwiwalencie szczawianu dietylu i etanolanu sodu 1,23.

Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdziłam, że zastosowanie narzędzi DoE, najbardziej innowacyjnego elementu QbD, wymagającego specjalistycznej wiedzy matematyczno-statystycznej oraz odpowiednich narzędzi obliczeniowych, dostarczyło pewnych, opartych na obliczeniach, danych i wiedzy o zależnościach między parametrami wpływającymi na jakość produktu i efektywność procesu. Szeroki wachlarz narzędzi statystycznych w obszarze DoE pozwolił na elastyczny dobór odpowiednich planów eksperymentalnych do określonych celów i możliwości czasowo – finansowych.

Wdrożenie naukowych podejść QbD i DoE do branży farmaceutycznej doskonale wpisuje się w aktualny szybki rozwój narzędzi matematyczno – informatycznych (m.in. uczenie maszynowe, sztuczna inteligencja) i otwiera możliwości dalszego doskonalenia

i rozwoju zaawansowanych statystycznych metod opracowywania, optymalizacji i monitorowania procesów w obszarze wytwarzania farmaceutycznego.



## 9. Bibliografia

1. Deidda, R.; Orlandini, S.; Hubert, P.; Hubert, C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 161, 110–121.
2. Rathore, A.S.; Winkle, H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 26–34.
3. Rathore, A.S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* 2009, 27, 546–553.
4. Yu, L.X.; Amidon, G.; Khan, M.A.; Hoag, S.W.; Polli, J.; Raju, G.K.; Woodcock, J. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 2014, 16, 771–783.
5. Yu, L. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res.* 2007, 25, 781–791.
6. Csoka, I.; Pallagi, E.; Paal, T.L. Extension of quality-by-design concept to the early development phase of pharmaceutical R&D processes. *Drug Discov. Today* 2018, 23, 1340–1343.
7. Food and Drug Administration. *Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century—A Risk-Based Approach; Final Report; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2004.*
8. Zhang, L.; Mao, S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian J. Pharm. Sci.* 2017, 12, 1–8.
9. ICH Q8(2R), *Pharmaceutical Development; International Conference on Harmonization: London, UK, 2009.*
10. ICH Q9(R1), *Quality Risk Management; INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE: London, UK, January 2023.*
11. ICH Q10, *Pharmaceutical Quality System; International Conference on Harmonization: London, UK, 2008.*
12. ICH Q11, *Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities); International Conference on Harmonization: London, UK, 2011.*
13. Beg, S.; Rahman, M.; Kohli, K. Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products. *Drug Discov. Today* 2019, 24, 717–725.
14. Cuhna, S.; Costa, C.P.; Moreira, J.N.; Lobo, J.M.S.; Silva, A.C. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2020, 27, 102206.
15. <https://ourhealthfirst.in/turn-your-problems-into-your-opportunities-and-break-the-barriers/> (accessed on 06 April 2024).
16. Aksu, B.; Mesut, B. Quality by design (QbD) for pharmaceutical area. *J. Fac. Pharm. Istanbul.* 2015, 45, 233–251.
17. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 141–158.
18. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, The use of experimental design in separation science, *Acta Chromatogr.* 21 (2009) 161–201.
19. P.F. Sahu, N.R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Sain, C.S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 590–611.

20. Dispas, A.; Avohou, H.T.; Lebrun, P.; Hubert, P.; Hubert, C. Quality by design approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 101, 24–33.
21. Pasquini, B.; Orlandini, S.; Furlanetto, S.; Gotti, R.; Del Bubba, M.; Boscaro, F.; Bertaccini, B.; Douša, M.; Pieraccini, G. Quality by Design as risk-based strategy in pharmaceutical analysis: Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of nintedanib and its impurities. *J. Chromatogr. A* 2020, 1611, 460615.
22. Pawar, A.; Pandita, N. Statistically Designed, Targeted Profile UPLC Method Development for Assay and Purity of Haloperidol in Haloperidol Drug Substance and Haloperidol 1 mg Tablets. *Chromatographia* 2020, 83, 725–737.
23. Hibbert, D.B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* 2012, 910, 2–13.
24. Kochling, J.; Wu, W.; Hua, Y.; Guan, Q.; Castaneda-Merced, J. A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC-MS methods development for protein analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 125, 130–139.
25. Gaudin, K.; Ferey, L. Quality by Design: A Tool for Separation Method Development in Pharmaceutical Laboratories. *LCGC* 2016, 29, 16–25.
26. Tome, T.; Žigart, N.; Časar, Z.; Obreza, A. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Org. Process Res. Dev.* 2019, 23, 1784–1802.
27. Jackson, P.; Borman, P.J.; Campa, C.; Chatfield, M.J.; Godfrey, M.; Hamilton, P.R.; Hoyer, W.; Norelli, F.; Orr, R.; Schofield, T. Using the analytical target profile to drive the analytical method lifecycle. *Anal. Chem.* 2019, 91, 2577–2585.
28. Sahu, P.K.; Ramisetti, N.R.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, C.S.; Panda, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 147, 590–611.
29. DOE – komputerowe wspomaganie planowania i analizy statystycznej badań innowacyjnych, StatSoft Polska, Materiały szkoleniowe, 2016.
30. <https://design-expert-32-bit.software.informer.com/10.0/> (accessed on 06 April 2024).
31. [author missing]. *Pharmaceutical Quality by Design*. [edition unavailable]. Elsevier Science, 2019. Web. 15 Oct. 2022. Available at: <https://www.perlego.com/book/1810304/pharmaceutical-quality-by-design-principles-and-applications-pdf> (accessed on 09 December 2023).
32. This paper is published as Hibbert, D. B.: Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* 2012, 910, 2–13. [DOI 10.1016/j.jchromb.2012.01.020](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020).
33. StatSoft's Electronic Statistics Textbook. 2006. Available online: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html> (accessed on 27 January 2021).
34. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, date. (Links to specific pages can also be referenced this way, if suitable.) <https://doi.org/10.18434/M32189>.
35. Taguchi, G., Chowdhury, S. and Wu, Y. (2004). Appendix A: Orthogonal Arrays and Linear Graphs: Tools for Quality Engineering. In *Taguchi's Quality Engineering Handbook* (eds G. Taguchi, S. Chowdhury and Y. Wu). <https://doi.org/10.1002/9780470258354.app1>.
36. Abreu-Villela, R., Kuentz, M. & Caraballo, I. Benefits of Fractal Approaches in Solid Dosage Form Development. *Pharm Res* 36, 156 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2685-5>.

37. Short, S.M.; Cogdill, R.P.; Drennen, J.K., III; Anderson, C.A. Performance-Based Quality Specifications: The Relationship Between Process Critical Control Parameters, Critical Quality Attributes and Clinical Performance. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010, 100, 1566–1575.
38. B. Durakovic; Design of Experiments Application, Concepts, Examples: State of the Art. *Period. Eng. Nat. Sci.*, 2017, 3, 421.
39. S. A. Weissman and N. G. Anderson; Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. *Org. Process Res. Dev.*, 2015, 19, 1605.
40. Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Bujak, A.; Szymczak, K.; Gunerka, P.; Dubiel, K.; Wieczorek, M.; Pieczykolan, J. Pyrazole[1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Kinase Jak Inhibitors. W.O. Patent WO2018206739A1, 15 November 2018.
41. Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Bujak, A.; Szymczak, K.; Gunerka, P.; Dubiel, K.; Wieczorek, M.; Pieczykolan, J. Pyrazole[1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Kinase Jak Inhibitors. E.P. Patent EP3621966 B1, 18 March 2020.
42. Dulak-Lis, M.; Bujak, A.; Gala, K.; Banach, M.; Kędzierska, U.; Miszkiel, J.; Hucz-Kalitowska, J.; Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Szymczak, K.; et al. A novel JAK/ROCK inhibitor, CPL409116, demonstrates potent efficacy in the mouse model of systemic lupus erythematosus. *J. Pharmacol. Sci.* 2021, 145, 340–348.
43. TIBCO Software Inc. Data Science Textbook. 2020. Available online: <https://docs.tibco.com/data-science/textbook> (accessed on 27 January 2021).
44. Stanisław, A. Przystępny kurs Statystyki z Zastosowaniem STATISTICA PL na Przykładach z Medycyny—Tom I–III; StatSoft: Kraków, Poland, 2006.
45. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 9 November 2005.
46. Lokras, A.; Thakur, A.; Wadhwa, A.; Thanki, K.; Franzyk, H.; Foged, C. Optimizing the Intracellular Delivery of Therapeutic Anti-inflammatory TNF- $\alpha$  siRNA to Activated Macrophages Using Lipidoid-Polymer Hybrid Nanoparticles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 8, 601155.
47. Simon, D.; Kis, Z.; Kontoravdi, C.; Shah, N. Quality by Design for enabling RNA platform production processes. *Trends Biotechnol.* 2022, 40, 1213–1228.
48. Ditzel, H.J.; Tuttolomondo, M.; Kauppinen, S. Design and Delivery of siRNA Therapeutics; Humana Press: Hertfordshire, UK, 2021; Chapter 9, p. 139.
49. Thanki, K.; Zeng, X.; Justesen, S.; Tejlmann, S.; Falkenberg, E.; Van Driessche, E.; Nielsen, H.M.; Franzyk, H.; Foged, C. Engineering of small interfering RNA-loaded lipidoid-poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) hybrid nanoparticles for highly efficient and safe gene silencing: A quality by design-based approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017, 120, 22–33.
50. Thanki, K.; Papai, S.; Lokras, A.; Rose, F.; Falkenberg, E.; Franzyk, H.; Foged, C. Application of a Quality-By-Design Approach to Optimise Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Loaded with a Splice-Correction Antisense Oligonucleotide: Maximising Loading and Intracellular Delivery. *Pharm. Res.* 2019, 36, 37.
51. Zheng, Q.; Qin, F.; Luo, R.; Jin, C.; Huang, H.; Xi, H.; Xiao, W.; Guo, M.; Yang, S.; He, S.; et al. mRNA-Loaded Lipid-Like Nanoparticles for Liver Base Editing Via the Optimization of Central Composite Design. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 2011068.
52. van de Berg, D.; Kis, Z.; Behmer, C.F.; Samnuan, K.; Blakney, A.K.; Kontoravdi, C.; Shattock, R.; Shah, N. Quality by design modelling to support rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases. *NPJ Vaccines* 2021, 6, 65.

53. Fan, Y.; Yen, C.W.; Lin, H.C.; Hou, W.; Estevez, A.; Sarode, A.; Goyon, A.; Bian, J.; Lin, J.; Koenig, S.G.; et al. Automated high-throughput preparation and characterization of oligonucleotide-loaded lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2021, 599, 120392.
54. Bevers, S.; Kooijmans, S.A.A.; Van de Velde, E.; Evers, M.J.W.; Seghers, S.; Gitz-Francois, J.J.J.M.; van Kronenburg, N.C.H.; Fens, M.H.A.M.; Mastrobattista, E.; Hassler, L.; et al. mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells. *Mol. Ther.* 2022, 30, 3078–3094.
55. Karl, A.T.; Essex, A.S.; Wisnowski, J.; Rushing, H. A Workflow for Lipid Nanoparticle (LNP) Formulation Optimization Using Designed Mixture-Process Experiments and Self-Validated Ensemble Models (SVEM). *arXiv* 2022.
56. Schmidt, A.; Helgers, H.; Vetter, F.L.; Zobel-Roos, S.; Hengelbrock, A.; Strube, J. Process Automation and Control Strategy by Quality-by-Design in Total Continuous mRNA Manufacturing Platforms. *Processes* 2022, 10, 1783.
57. Toma, I.; Porfire, A.S.; Tefas, L.R.; Berindan-Neagoe, I.; Tomut, I. A Quality by Design Approach in Pharmaceutical Development of Non-Viral Vectors with a Focus on miRNA. *Pharmaceutics* 2022, 14, 1482.
58. Young, R.E.; Nelson, K.M.; Hofbauer, S.I.; Vijayakumar, T.; Alameh, M.G.; Weissman, D.; Papachristou, C.; Gleghorn, J.P.; Riley, R.S. Lipid Nanoparticle Composition Drives Delivery of mRNA to the Placenta. *bioRxiv*. 2022.
59. Nag, K.; Sarker, E.H.; Kumar, S.; Khan, H.; Chakraborty, S.; Islam, J.; Baray, J.C.; Khan, M.R.; Mahmud, A.; Barman, U.; et al. DoE-derived continuous and robust process for manufacturing of pharmaceutical-grade wide-range LNPs for RNA-vaccine/drug delivery. *Sci. Rep.* 2022, 12, 9394.
60. Ly, H.H.; Daniel, S.; Soriano, S.K.V.; Kis, Z.; Blakney, A.K. Optimization of Lipid Nanoparticles for saRNA Expression and Cellular Activation Using a Design-of-Experiment Approach. *Mol. Pharm.* 2022, 19, 1892–1905.
61. Mendonça, M.C.P.; Kont, A.; Kowalski, P.S.; O’Driscoll, C.M. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids. *Drug Discov. Today* 2023, 28, 103505.
62. Bastogne, T.; Hassler, L.; Bruniaux, J.; Thomassin, M.; Gidrol, X.; Sulpice, E.; Navarro, F.P. A Bayesian implementation of Quality-by-Design for the development of Cationic Nano-Lipid for siRNA Transfection. *IEEE Trans. NanoBiosci.* 2023, 22, 455–466.
63. Kauffman, K.J.; Dorkin, J.R.; Yang, J.H.; Heartlein, M.W.; DeRosa, F.; Mir, F.F.; Fenton, O.S.; Anderson, D.G. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* 2015, 15, 7300–7306.
64. Blakney, A.K.; McKay, P.F.; Yus, B.I.; Hunter, J.E.; Dex, E.A.; Shattock, R.J. The Skin You Are In: Design-of-Experiments Optimization of Lipid Nanoparticle Self-Amplifying RNA Formulations in Human Skin Explants. *ACS Nano* 2019, 13, 5920–5930.
65. Cun, D.; Jensen, D.K.; Maltesen, M.J.; Bunker, M.; Whiteside, P.; Scurr, D.; Foged, C.; Nielsen, H.M. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 77, 26–35.
66. Hashiba, A.; Toyooka, M.; Sato, Y.; Masatoshi, M.; Tokeshi, M.; Harashima, H. The use of design of experiments with multiple responses to determine optimal formulations for in vivo hepatic mRNA delivery. *J. Control. Release* 2020, 327, 467–476.

67. Terada, T.; Kulkarni, J.A.; Huynh, A.; Chen, S.; van der Meel, R.; Tam, Y.Y.C.; Cullis, P.R. Characterization of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids Using Design-of-Experiments Approach. *Langmuir* 2021, 37, 1120–1128.
68. Chen, D.; Love, K.T.; Chen, Y.; Eltoukhy, A.A.; Kastrup, C.; Sahay, G.; Jeon, A.; Dong, Y.; Whitehead, K.A.; Anderson, D.G. Rapid Discovery of Potent siRNA-Containing Lipid Nanoparticles Enabled by Controlled Microfluidic Formulation. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 6948–6951.
69. Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D.W.; Shi, Y.; Gaensler, K.M.L.; Tan, X.; Dunn Amy, L.; Kerlin, B.A.; et al. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* 2015, 15, 8099–8107.
70. T. Saurat, F. Buron, N. Rodrigues, M. L. de Tauzia, L. Colliandre, S. Bourg, P. Bonnet, G. Guillaumet, M. Akssira, A. Corlu, C. Guillouzo, P. Berthier, P. Rio, M. L. Jourdan, H. Benedetti and S. Routier; Design, synthesis, and biological activity of pyridopyrimidine scaffolds as novel PI3K/mTOR dual inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2014, 57(3), 613.
71. J. A. Engelman, J. Luo and L. C. Cantley; The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.*, 2006, 7(8), 606.
72. P. J. Parker; The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, 32(6), 893.
73. J. G. Foster, M. D. Blunt, E. Carter and E. S. G. Ward; Inhibition of PI3K signaling spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune diseases and hematological malignancies. *Pharmacol. Rev.*, 2012, 64(4), 1027.
74. M. Stypik, S. Michałek, N. Orłowska, M. Zagozda, M. Dziachan, M. Banach, P. Turowski, P. Gunerka, D. Zdżalik-Bielecka, A. Stańczak, U. Kędzierska, K. Mulewski, D. Smuga, W. Maruszak, L. Gurba-Bryśkiewicz, A. Leniak, W. Pietruś, Z. Ochal, M. Mach, B. Zygmunt, J. Pieczykolan, K. Dubiel and M. Wieczorek; Design, Synthesis, and Development of Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K  $\delta$  Inhibitors: Part II-Benzimidazole Derivatives. *Pharmaceuticals*, 2022, 15, 927.
75. M. N. Kopylovich, A. P. C. Ribeiro, E. C. B. A. Alegria, N. M. R. Martins, L. M. D. R. S. Martins and A. J. L. Pombeiro; Catalytic Oxidation of Alcohols: Recent Advances. *Adv. Organomet. Chem.*, 2015, 67, 91.
76. A. Gavrilidis, A. Constantinou, K. Hellgardt, K. K. (M. ). Hii, G. J. Hutchings, G. L. Brett, S. Kuhn and S. P. Marsden; Aerobic oxidations in flow: opportunities for the fine chemicals and pharmaceuticals industries. *React. Chem. Eng.*, 2016, 1, 595.
77. S. G. Newman and K. F. Jensen; The role of flow in green chemistry and engineering. *Green Chem.*, 2013, 15, 1456.
78. H. P. L. Gemoets, Y. Su, M. Shang, V. Hessel, R. Luque and T. Noel; Liquid phase oxidation chemistry in continuous-flow microreactors. *Chem. Soc. Rev.*, 2016, 45, 83.
79. A. I. Alfano, M. Brindisi and H. Lange; Flow synthesis approaches to privileged scaffolds – recent routes reviewed for green and sustainable aspects. *Green Chem.*, 2021, 23, 223.
80. C. A. Hone and C. O. Kappe; The Use of Molecular Oxygen for Liquid Phase Aerobic Oxidations in Continuous Flow. *Chem. Methods*, 2021, 1, 454.
81. T. Nishimura, T. Onoue, K. Ohe and S. Uemura; Palladium(II)-Catalyzed Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones by Molecular Oxygen. *J. Org. Chem.*, 1999, 64, 6750.
82. J. Muzart; Palladium-catalysed oxidation of primary and secondary alcohols. *Tetrahedron*, 2003, 59(31), 5789.

- 
83. X. Ye, M. D. Johnson, T. Diao, M. H. Yates and S. S. Stahl; Development of safe and scalable continuous-flow methods for palladium-catalyzed aerobic oxidation reactions. *Green Chem.*, 2010, 12, 1180.
  84. B. A. Steinhoff, I. A. Guzei and S. S. Stahl; Mechanistic characterization of aerobic alcohol oxidation catalyzed by Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine including identification of the catalyst resting state and the origin of nonlinear [catalyst] dependence. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 11268.
  85. Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria; Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors as a Cancer Treatment: From a Biologic Rationale to Medical Perspectives. *J.C.Cancer. Discov.*, 2013, 3:264.

## 10. Kopie opublikowanych prac

### 10.1. Publikacja P1

**Gurba-Bryśkiewicz L., Dawid U., Smuga D. A., Maruszak W., Delis M., Szymczak K., Stypik B., Moroz A., Błocka A., Mroczkiewicz M., Dubiel K., Wiczorek M.;**  
Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies;



Int. J. Mol. Sci., **2022**, 23, 10720 <https://doi.org/10.3390/10.3390/ijms231810720>

IF: 5,6; MNiSW: 140



## Article

# Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies

Lidia Gurba-Bryśkiewicz \* , Urszula Dawid, Damian A. Smuga, Wioleta Maruszak \* , Monika Delis, Krzysztof Szymczak, Bartosz Stypik, Aleksandra Moroz, Aleksandra Blocka, Michał Mroczkiewicz, Krzysztof Dubiel and Maciej Wieczorek

Celon Pharma S.A., ul. Marymoncka 15, 05-152 Kazuń Nowy, Poland

\* Correspondence: authors: lidia.gurba@celonpharma.com (L.G.-B.); wioleta.maruszak@celonpharma.com (W.M.)



**Citation:** Gurba-Bryśkiewicz, L.; Dawid, U.; Smuga, D.A.; Maruszak, W.; Delis, M.; Szymczak, K.; Stypik, B.; Moroz, A.; Blocka, A.; Mroczkiewicz, M.; et al. Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10720. <https://doi.org/10.3390/ijms231810720>

Academic Editors: Geoffrey Brown, Enikő Kallay and Andrzej Kutner

Received: 8 August 2022

Accepted: 8 September 2022

Published: 14 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The purpose of this work was to demonstrate the use of the AQbD with the DOE approach to the methodical step-by-step development of a UHPLC method for the quantitative determination of the impurity profile of new CPL409116 substance (JAK/ROCK inhibitor) on the preclinical and clinical step of drug discovery studies. The critical method parameters (CMPs) have been tested extensively: the kind of stationary phase (8 different columns), pH of the aqueous mobile phase (2.6, 3.2, 4.0, 6.8), and start (20–25%) and stop (85–90%) percentage of organic mobile phase (ACN). The critical method attributes (CMAs) are the resolution between the peaks ( $\geq 2.0$ ) and peak symmetry of analytes ( $\geq 0.8$  and  $\leq 1.8$ ). In the screening step, the effects of different levels of CMPs on the CMAs were evaluated based on a full fractional design  $2^2$ . The robustness tests were established from the knowledge space of the screening step and performed by application fractional factorial design  $2^{(4-1)}$ . Method operable design region (MODR) was generated. The probability of meeting the specifications for the CMAs was calculated by Monte-Carlo simulations. In relation to literature such a complete AQbD approach including screening, optimization, and validation steps for the development of a new method for the quantitative determination of the full profile of nine impurities of an innovative pharmaceutical substance with the structure-based pre-development pointed out the novelty of our work. The final working conditions were as follows: column Zorbax Eclipse Plus C18, aqueous mobile phase 10mM  $\pm$  1mM aqueous solution of HCOOH, pH 2.6, 20%  $\pm$  1% of ACN at the start and 85%  $\pm$  1% of ACN at the end of the gradient, and column temperature 30 °C  $\pm$  2 °C. The method was validated in compliance with ICH guideline Q2(R1). The optimized method is specified, linear, precise, and robust. LOQ is on the reporting threshold level of 0.05% and LOD at 0.02% for all impurities.

**Keywords:** Analytical Quality by Design (AQbD); design of experiment (DOE); method operable design region (MODR); pharmaceutical impurity profiling; analytical method development; CHI logD; CPL409116; JAK/ROCK inhibitor

## 1. Introduction

The pharmaceutical industry is closely regulated by the quality control system. The quality of pharmaceutical products and substances (API) should be assured and documented at every stage of the manufacturing and product lifecycle. According to the International Council for Harmonization ICH Q9 guideline [1], it is not enough to ensure quality, it is also necessary to identify and control the potential quality problems arising during the process of development and manufacture. In order to fulfil this requirement, a systematic approach to the pharmaceutical process and product development is necessary.



This approach is known as quality by design (QbD) and is outlined in the ICH Q8 guideline [2]. Originally, the QbD methodology focused on the development of pharmaceutical manufacturing but recently it has been implemented into the development and optimization of analytical methods and is called Analytical Quality by Design (AQbD) [3–8].

Appropriate analytical methods are necessary to ensure the effectiveness and safety of a pharmaceutical product and to meet regulatory requirements, as well as QC needs. The inefficient analytical methods can lead to inaccurate results and misleading information, significantly affecting the drug development process. The application of the AQbD approach ensures that analytical procedures are well understood, robust, and consistently deliver the intended performances throughout their lifecycle.

The application of QbD into analytical methods development has been well adopted by the pharmaceutical and biopharmaceutical analysts [3–10] and has progressively increased over the last years to achieve a higher quality of analytical methods and thus a higher quality of the pharmaceutical product. Most of the applications are focused on the use of experimental design (DOE) and statistical screening of spaces of the method's operating parameters to account for method robustness, especially for separation techniques [11–20]. Also, there have been published papers describing a general, systematic life-cycle approach to the development of analytical procedures. [6,8,21–25]. However, much more effort is still required to improve the AQbD procedures and target the concept towards all kinds of methods from clinical to commercial and manage their lifecycle management as well as updated regulations. Therefore, it is expected that the update of ICHQ2(R1) [25] and the development of a new ICHQ14 [26], guidelines for the development of current analytical procedures will be released soon and is an excellent opportunity to define how analytical methods should be developed, described, and validated in regulatory submissions.

The AQbD methodology is quite similar to the QbD process as described in ICH Q8 [2]. The starting point is to define the intended purpose of the method and the analytical target profile (ATP), while in QbD it is the step to define the quality target product profile (QTPP). Each analytical method should have its intended purpose, taking into account the area of its application, for example, to support research, manufacturing process, formulation development, release, and stability testing for clinical or commercial drugs, quantitative, qualitative, or limit tests. The method ATP is determined by combining the intended purpose and the ICH Q2(R1) quality requirements [25], such as specificity, precision, accuracy, linearity, range, quantitation limit, and detection limit. Furthermore, the potential critical method attributes (CMAs) could be determined as an analytical equivalent of the critical quality attributes (CQAs) in the QbD approach. CMAs should fulfil the specification requirements as well as the quality limits of the measured parameters. The next step of AQbD workflow is risk-assessed to identify and prioritize factors (critical method parameters, CMP), that can affect the method attributes [11,19,24]. The Ishikawa diagram is a useful tool to identify critical method parameters. CMPs are further investigated for robustness using the statistical DOE and multivariate analysis. DOE is a structured, cost-effective, and cost-efficient method to organize, limit the number of experiments, and determine the simultaneous effects and interactions of multiple CMPs on the CMAs. The objective of DOE is the definition of the analytical DS—MODR (method operable design region), which is the operating range of CMPs that guarantee quality results. [9,20,21]. Figure 1 shows the scheme of the AQbD methodology.

The aim of the study was to apply the AQbD approach to the methodical step-by-step development of a chromatographic method for determining the full profile of impurities, process, and degradations, an innovative pharmaceutical substance of the CPL409116 (Figure 2), dual JAK (Janus kinase) and ROCK (Rho-associated kinase) inhibitor [28–30].

Control of the purity of the CPL409116 substance was crucial at the stage of development of the process of large-scale synthesis and the production of the substance for preclinical and clinical trials.

To meet the quality requirements of the formal ICH regulatory guidelines [2,25], but bearing in mind the cost and time effectiveness of the preclinical stage of drug development main goal

was to design a quick, simple, and robust analytical method that allows easy application for control of manufacturing of finished dosage form of a pharmaceutical product.

#### Analytical Quality by Design (AQbD)

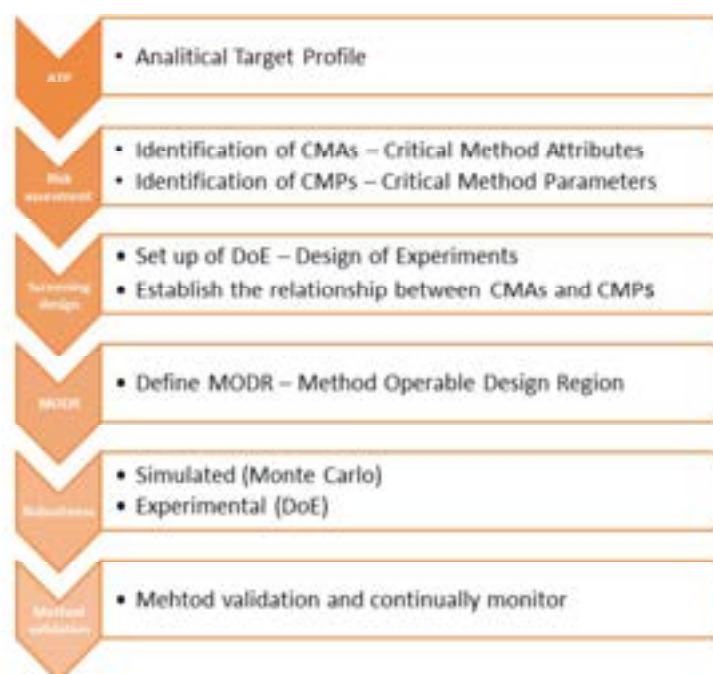


Figure 1. AQbD methodology workflow on the base of Tome et al. [27].

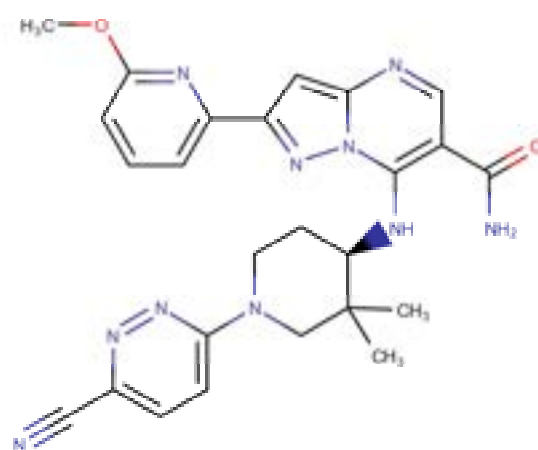


Figure 2. Chemical structure of CPL409116.

Based on our best knowledge, the literature presented works related to the partial introduction of QbD to the correction, verification, and improvement of pharmacopeial methods or methodologies of known pharmaceutical substances [11,12,19,31,32]. Our studies were focused on the implementation of the complete AQbD approach including screening, optimization, and validation steps, for the development of a new method for the quantitative determination of the full profile of nine impurities from the process and degradation of an innovative pharmaceutical substance. In our case, structure-based analysis was a very important step due to the greater differences in the structures of the tested compounds than in the case of the presented optimizations of the methods for the separation of related compounds. For these reasons, the structure-based pre-development studies based on the calculated physicochemical properties such as logP, logD,

pKa including CHI logD—experimentally determined chromatographic hydrophobicity index were also performed.

Our work concerns a wider range of simultaneously optimized parameters of the chromatographic method compared to those described in the literature. The development presented in [31–33] was carried out on one column, while our study tested eight different stationary phases. We also used a much wider screening of pH values of the aqueous mobile phase (from 2.6 to 6.8).

Moreover, apart from the commonly considered resolution between neighbors peaks as a critical method attribute (CMA), we also took into account the peaks symmetry factor, which is important in terms of quality criteria.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Analytical Target Profile (ATP)

Controlling the impurity profile of a pharmaceutical active substance and pharmaceutical formulation is a key element for drug development and quality assurance since the provided data can directly influence the safety of drug therapy, reducing the impurity-related adverse effects of drug products.

There are two main steps of the control of impurities during the manufacture of drugs, the control of raw materials before drug manufacturing and the control of finished products before batch release. This two-stage control process requires selective, specific, and sensitive analytical techniques. In this context, the most current techniques coupled to AQBd for the quantitation of impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs) are high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultrahigh-pressure liquid chromatography (UHPLC) in reversed-phase mode with UV or mass spectrometer detectors [9,11,12,14,15]. In this work, the UHPLC method with UV detection was optimized.

The first step in the AQBd approach is to define ATP [11–13]. The ATP conceptualizes the objective of the analytical method, but also the quality requirements for the reportable result, which include both performance characteristics associated with one or more CMAs and criteria for validation parameters for demonstrating that the method is fit for purpose [11,20]. When dealing with quantitative determination of impurities, the ATP is mainly focused on method selectivity to ensure a complete separation between API, related and unknown impurities, and at a pinch also—excipients. The second objective is also to achieve the required sensitivity of the method (limit of quantitation (LOD) equal or lower than the 0.05%) [11,13]. The method under development was intended to be used in routine quality control, hence the criteria for ATP related to the validation parameters were generally taken from the ICH Q2 (R1) guidelines [9,25].

Therefore, in the present study, ATP is set as: (a) a robust, selective, and specific method, (b) good linearity, precision, and accuracy of impurities determination, and (c) statistically challenged validation [11,12].

### 2.2. Risk Assessment, Critical Method Attributes CMAs, Critical Method Parameters CMPs

CMAs are an element of method performance that must be measured to assess whether a method can produce fit for purpose data. The CMAs are directly connected with the ATP and are response variables that can give information on the quality of the chromatogram. In the present study, the CMAs are: (a) resolution between the peaks should be  $\geq 2.0$ , and (b) peak symmetry of analytes should be  $\geq 0.8$  and  $\leq 1.8$ . Many parameters could influence the chromatographic performances (of CMAs), which involve aspects related to the chromatographic system, the column, and the mobile phase. In order to indicate the risk factors of the chromatographic method, a fishbone diagram was performed as shown in Figure 3 [11,14,34].

From this diagram, it was possible to identify the CMPs that could potentially affect the selected CMAs and, therefore, required an in-depth investigation using DOE methodologies. The following parameters were considered for the multivariate optimization: stationary

phase chemistry, pH of aqueous eluent of the mobile phase, start and stop percentage of organic eluent of the mobile phase, and oven temperature.

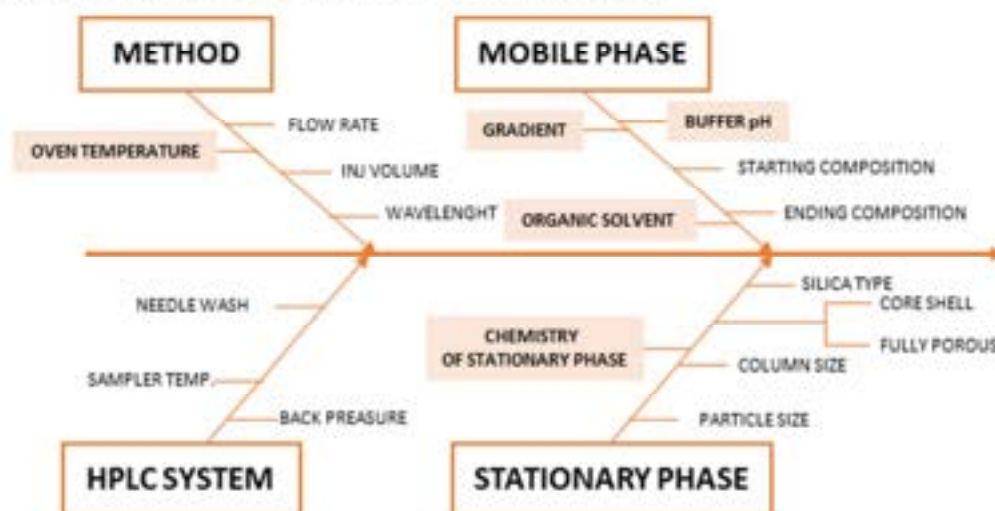


Figure 3. Ishikawa diagram for critical method parameters (CMP).

The settings of the other factors were selected based on preliminary experiments. In particular, following common practice, the injection volume was set to a low value (1  $\mu\text{L}$ ), gradient time was set to 7 min (to obtain optimum analysis time, elution time for all of the compounds is lower than 4 min), and the flow rate of mobile phase was set to 0.5  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

In this study linear gradient elution has been chosen. This is simple and typically the default elution method (“first choice” method) during chromatography methods development. The linear gradient minimizes peak broadening against isocratic elution and produces more accurate and repeatable results. This second factor is particularly relevant when a transfer method to another instrument is an option, thus linear elution allows for the development of a more universal methodology. Different gradient speeds have occurred by changing the initial and final amount of organic phase, at a range from 20% to 25% and from 85% to 90%, respectively.

ACN was chosen as a type of organic solvent in the mobile phase. MeOH as an organic solvent has been disregarded on a base of preliminary studies, due to high retention and no elution of some of the tested compounds.

Moreover, the wavelength of UV detection was determined and set to 297 nm as a maximum of absorbance JAK01 (CPL409116) and eight of its impurities and 230 nm to control the JAK SM-05 impurity.

### 2.3. Structure-Based Pre-Development Study

One of the first steps during the development of a chromatographic method is to a knowledge of the chemical structure of analyzed compounds to assess opportunities and identify initial risks during optimization of the analytical method, and also to determine correctly CMPs, like pH of the mobile phase. The basic molecular descriptors, which strongly affect the retention factors, are hydrophobicity (lipophilicity) of molecules or ions, expressed by the partition coefficient  $\log P$ , and distribution coefficient ( $\log D$ ) for ionizable compounds [35–37]. In addition, most of the new drug molecules that are currently undergoing preclinical research or clinical trials contain ionized groups. Acid-base chemistry strongly influences not only retention and chromatography resolution but also affects band broadening [38,39], which further complicates the development of an effective separation method.

For the initial characterization and determination of the differences between the CPL409116 (JAK01) compound and its impurities, calculations of the physicochemical properties ( $\log P$ ,  $\log D$ , and  $pK_a$ ) have been performed using the ACD Labs Percepta

program (Table 1) [40]. On this basis, it was found that most of the molecules have basic dissociation constants pKa in the range 1.98–2.70 except for JAK-07 (0.90 and 3.98) and JAK-08 (0.79 and 2.70), and JAK ImpB characterized by basic pKa 2.70 and 3.56, but in particular, JAK-09, having a different basic nature (pKa = 2.68 and 9.92). In the pH range of 5.5–8.0, all compounds exist in a single, unprotonated form, which definitely facilitates the development of the chromatographic method.

**Table 1.** Calculated physico-chemical properties and determined the chromatographic hydrophobicity index CHI logD of CPL409116 and its impurities.

Compound Name	logP	clogD 2.6	clogD 4.5	clogD 7.4	clogD 10.5	pKa (Acid)	pKa (Base)	CHIlogD pH 2.6	CHIlogD pH 7.4	CHIlogD pH 10.5
SM-05	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	–	–2.50	–0.12	–0.03	0.99
JAK-09	1.27	–2.03	–1.83	–1.16	1.16	12.52	–1.12 2.68 9.92	0.71	1.22	2.38
JAK ImpC	–4.22	–4.29	–4.22	–4.22	–4.22	13.41	–0.95 2.00	1.25	3.41	3.23
JAK ImpA	0.54	0.1	0.53	0.43	–1.91	7.95 12.58	–0.53 2.00 2.68	1.49	1.49	1.99
JAK ImpB	1.07	–0.26	1.02	1.07	1.07	12.52 15.09	–1.11 2.70 3.56	2.40	2.21	2.45
CPL409116 (JAK01)	1.44	0.98	1.43	1.44	1.44	12.52	–1.11 2.00 2.70	3.51	3.09	3.05
JAK-07	3.45	0.96	0.62	0.3	0.3	–	–0.78 0.90 3.98	3.80	2.55	2.57
JAK-08	2.55	2.3	2.55	2.55	2.54	12.52	–1.12 0.79 2.70	4.63	4.04	3.61
JAK ImpE	3	2.71	3	3	3	–	–1.20 1.98 2.40	4.86	4.82	4.07
JAK ImpD	2.65	2.36	2.65	2.65	2.65	–	–1.20 1.99 2.40	5.12	4.46	3.83

A much more complicated situation was concerned with the descriptors determining the lipophilicity of compounds (logP and clogD). Generally, logP factors show a promising distinction of retentions in chromatographic conditions. But the data obtained for the compound JAK ImpC (logP/logD = –4.22) suggested very poor retention that was inconsistent with the observed retention times of the compound in chromatographic conditions.

Due to this observation and to better characterise elution conditions for method development, it was decided to determine the chromatographic hydrophobicity index CHI logD of CPL409116 and its impurities by the methodology described by Valko et al. [41]. Chromatographic hydrophobicity index CHI logD has been originally used for high-throughput physicochemical property profiling for rational drug design [42], where determined values strongly correlate to lipophilicity (logP and/or logD) of molecules [37,41].

On a basis of determining lipophilicity described by CHI logD at pH 2.6, 7.4 and 10.5 on ACE Ultracore SuperC18 column more valuable data were obtained in a contest of chromatography interactions molecules with stationary phase extended with their acid-base properties (Table 1). Particularly, strong pH dependence on retention factors has been observed for JAK ImpC and also for JAK07, JAK08, and JAK09. Greater differences and a wider range of CHI logD values, calculated on a base of peaks retention times of

compounds, in the lower pH range than in the pH 7.4–10.5 range have been observed. The use of mobile phases with a lower pH would allow obtaining higher chromatographic resolutions and higher selectivity of the analytical method.

Moreover, CPL409116 is practically insoluble in aqueous solutions (e.g., in phosphate buffer with a pH of 7.4 below  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), hence the choice of more acidic separation conditions where the compound may protonate is expected to reduce carryover, problems with clogging of the column and its longer lifetime.

In summary, various dissociation constants of the tested compounds made it necessary to check the elution conditions in more detail in the pH range 2.6–6.8, taking into account peak shape. Using more acidic conditions in the mobile phase should lead to the preparation of more robust and effective analytical methods. As a final CMP, six different buffers at pH 2.6, 3.2, 3.8, 4.0, 4.2, and 6.8 as an aqueous mobile phase has been chosen.

Impurities generally have molecular structures that are close to or related to the API, they also tend to show similar chromatographic behavior. In the case of impurities of CPL409116 JAK ImpC and JAK ImpA have very close hydrophobic index CHI logD at pH 2.6 that same like main compound have similar retention to JAK07 or JAK ImpD and JAK ImpE at pH 7.4 (Table 1).

It is possible to modulate the effectivity of separation and chromatographic resolution by changing the pH of the mobile phase or temperature. But a much more effective way is modulation of selectivity of stationary phase that is strongly important if analysed compounds have a very close molecular structure with comparable hydrophobicity. In this manner, the most effective idea is to explore the selectivity space and chemistry of stationary phases. Based on the work of Snyder and Dolan [43], [44] five terms describing selectivity are: (a) the hydrophobic interaction between the solute and the column; (b) the resistance of the bonded phase to penetration by bulky molecules; (c) hydrogen bond (H-B) interactions between basic solutes and acidic sites (silanols) in the column; (d) H-B interactions between acidic solutes and a vicinal-silanol pair on the column surface; and (e) cation exchange between ionized bases and ionized silanol groups in the column. On this base the Hydrophobic-Subtraction Model (HSM) has been prepared for quantitative comparison of differences in chromatographic columns and the resulting data are publicly available for free through different websites, i.e., [www.hplconline.org](http://www.hplconline.org) [45] (accessed on 29 January 2021) or USP chromatographic column database [46].

For the present work, eight columns that differ in chemistry and parameters of stationary phase have been chosen (Table 2).

**Table 2.** List of the tested column and their properties: Fs—factor describes column similarity; H—parameter is a measure of the phase hydrophobicity; S—a measure of the resistance of the stationary phase to penetration by a solute molecule; A—measure of the hydrogen-bond acidity of the phase; B—a measure of the hydrogen-bond basicity of the phase; C—a measure of the interaction of the phase with ionized solute molecules.

Lp.	Column Name	Fs	H	S	A	B	C (pH 2.8)	C (pH 7.0)	EB	USP Type	Phase Chemistry
1.	ZORBAX Eclipse Plus C18	0	1.03	0	−0.0700	−0.0200	0	0.0200	7.8	L1	C18
2.	Kinetex EVO C18	9.65	1.01	−0.00600	−0.170	−0.0240	−0.110	−0.0100	4.38	L1	C18
3.	ACQUITY UPLC BEH C18	15.51	1.00	0.0280	−0.366	0.00700	0.142	0.0880	6.4	L1	C18
4.	InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl	18.23	0.752	−0.0830	−0.394	0.0180	0.136	0.140	3.59	L11	Phenyl–Hexyl
5.	Kinetex Biphenyl	26.75	0.697	−0.173	−0.583	0.0340	0.122	0.817	2.63	L11	Biphenyl
6.	Kinetex PFP	78.79	0.680	0.0800	−0.270	−0.0300	0.940	1.53	2.4	L43	Pentafluorophenyl
7.	ACQUITY UPLC CSH C18	21.15	0.954	−0.00200	−0.179	0.118	0.0820	0.171	5.62	L1	C18
8.	ACQUITY UPLC CSH Fluoro–Phenyl	25.63	0.708	−0.0590	−0.435	0.129	−0.0680	0.223	2.865	L11	Fluoro–Phenyl

Columns have been chosen on a base similarity factor Fs and also taking into account differences in acid-base interaction of stationary phase (C(pH 2.8) and C(pH 7.0)). CPL409116 contains a few different heterocyclic rings, aliphatic amine functionality, amide, ether and nitrile substituents chemistry of stationary phases has been diversified between different chemical modifications, octadecyl, phenyl-hexyl, biphenyl, and pentafluorophenyl.

Therefore, during screening, the authors advise the fixing of qualitative factors such as the type of stationary and mobile phases based on scientific knowledge of the molecules and any relevant impurities. These parameters are very unlikely to change during routine use. Subsequently, quantitative factors such as pH, and the composition of the mobile phase or temperature, can be examined when optimizing a method for robustness. If necessary, pre-tests on qualitative factors can be conducted. Usually, the chosen columns will be those optimizing peak shapes, time of analysis, and selectivity. Knowledge of the interactions between the stationary phase, the mobile phase, and the molecule of interest should of course be included in such studies.

At the stage of preclinical and clinical development, a very important factor is the assessment of the potential genotoxicity and mutagenicity of new compounds in accordance with the requirements of the ICH M7 (R1) guidelines [47]. In the case of risk or analysis of mutagenic compounds, it is necessary to use very sensitive analytical methods, which in most cases means the use more sophisticated methodology or mass spectrometry detection [48,49].

Compound CPL409116 and their related substances, processing by-products and impurities, have been evaluated by two complementary (Q)SAR prediction methodologies to assess the potential mutagenicity of impurities. One methodology should be expert rule-based (DEREK Nexus, module in Star Drop software) [50–52] and the second methodology should be statistically-based (Toxicity Estimation Software Tool (T.E.S.T)) [53,54].

No structural alters and no mutagenicity risks were found for the CPL409116 and its related substances (Table 3) and it did not require changes to the previous assumptions regarding the level of impurity quantification.

**Table 3.** Summary of evaluation of mutagenicity: (Q)SAR results for CPL409116 and related substances.

Compound Name	DEREK Nexus Results (Q)SAR Rule-Based	T.E.S.T Results (Q)SAR Statistic-Based	ICH M7 Class
CPL409116 (JAK-01)	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.25$	Class 5
JAK-07	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.26$	Class 5
JAK-08	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.23$	Class 5
JAK-09	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.39$	Class 5
JAK SM-5	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.22$	Class 5
JAK ImpA	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.16$	Class 5
JAK ImpB	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.28$	Class 5
JAK ImpC	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.29$	Class 5
JAK ImpD	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.15$	Class 5
JAK ImpE	Mutagenicity is INACTIVE	Mutagenicity NEGATIVE Predicted value $p = 0.16$	Class 5

#### 2.4. Screening Study

The Screening Phase Method development was initiated with the screening activity using an Agilent scouting system equipped with an 8-position column manager and solvent selection valve. For screening experiments, eight column chemistries with a wide range of selectivity difference, wide pH range, different bonding, and with different similarity factors (Fs) [12,43] were used. A large difference in Fs factor indicates that the two columns are very different. During this study, columns' Fs values were compared with Agilent

ZORBAX Eclipse Plus C18. Columns selected, operating pH range of the columns, bonding details, and  $F_s$  values were mentioned in Table 2.

The buffer pH selection was carried out in the range of pH 2.6–6.8. Formic acid solution (10 mM) was used to prepare a buffer solution of pH 2.6, and ammonium formate (10 mM) buffer with different concentrations of additives was used to prepare buffer solutions of pH 3.2, 4.0, and 6.8. The initial screening experiments were carried out using different columns, different pH buffer solutions, and different components of a start (from 20% to 25%) and end gradient (from 85% to 90%) organic modifier compositions as variables.

The statistical experimental design was performed based on full fractional design  $2^2$  (two factors: start and end gradient composition, two-level) with full repetition for each tested column and difference pH of buffer solutions [13,14]. Flow rate, gradient time, and column temperature were kept constant. A total of 128 experiments were performed by statistical design at the screening step.

After running the screening experiments, processing was done to integrate all the peaks properly and then the generated chromatographic responses were transferred to the STATISTICA software [55–57] to generate knowledge space for linear additive effects, curvilinear effects, and complex effects of different variables.

Multiple linear regression was applied for the calculation of the coefficients of the nine models for resolution between all pairs of peaks ( $R_s$ ) and 10 models of the symmetry factors for all peaks ( $A_s$ ), then the models were refined to improve their quality by removing some of the non-significant and entangled effects. The evaluation of statistical analysis tools like ANOVA for each response was used to determine the significance of each method parameter selected for the study using the  $p$ -value (significance level  $p < 0.05$ ). For all models, good fits were obtained; coefficients of determination  $R^2$  were above 0.99, and lack of fits is not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

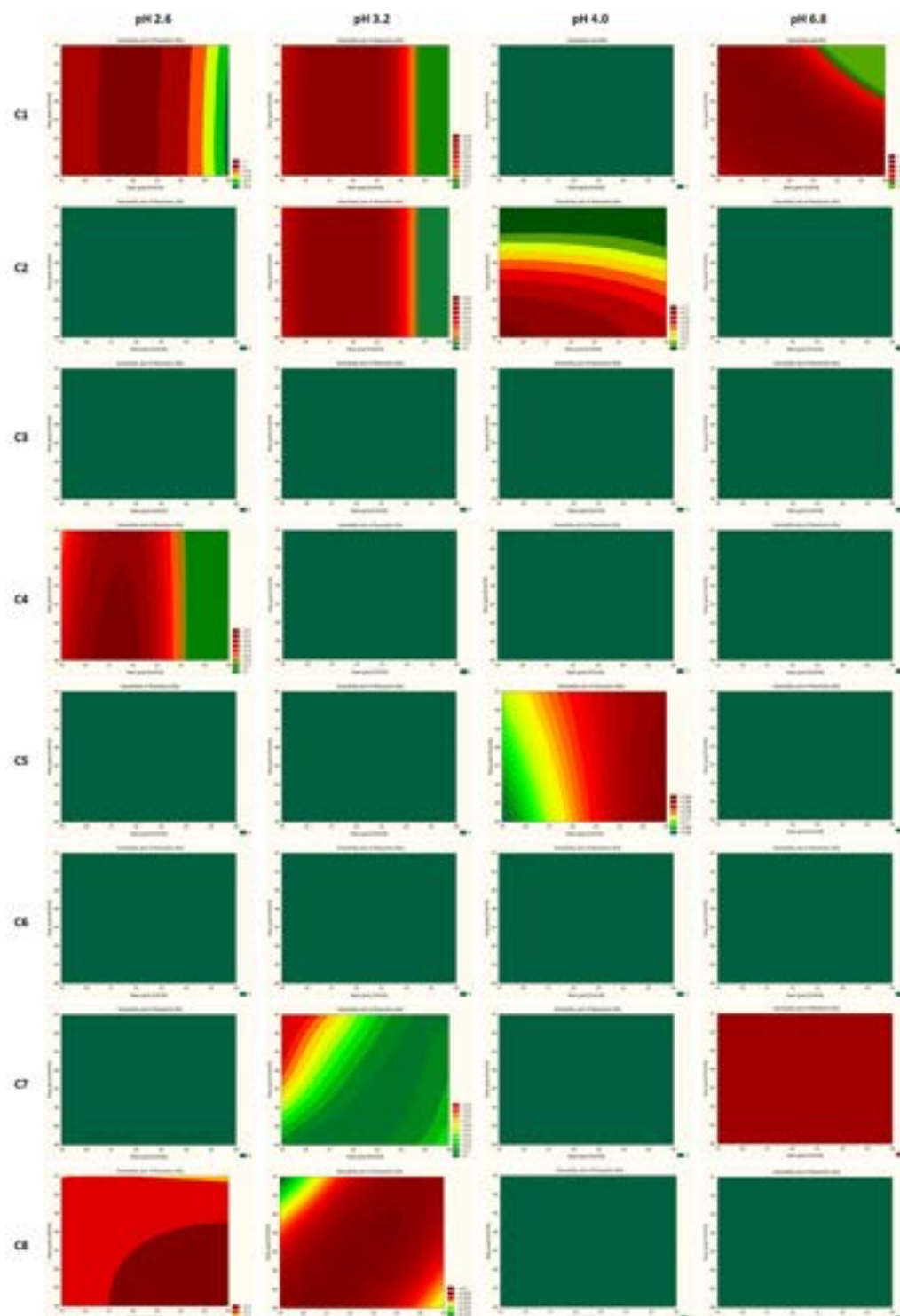
The results are evaluated based on the desirability factor used in the STATISTICA software [55–57]. The desirability factor approach is a very useful method for the optimization of multiple response processes. The relationship between the approximated (predicted) baseline responses and the utility of the response is called the desirability function. The idea behind this approach is the “quality” of a product or process that has multiple quality characteristics, with one of them outside of some “desirability” limits, is completely unacceptable. The method finds operating conditions that provide the “most desirability” response values. 0.0 represents a completely undesirable value and 1.0 represents a completely desirable or ideal response value. In this study, for resolutions between all pairs of peaks, desirability equals 0.0 when all resolution factors are less than 2.0, for symmetry factors desirability equals 1.0 when all symmetry factors are more than 0.8, and desirability equals 0.0 when all symmetry factors are more than 1.8.

Cumulative desirability plots of results and multiple response curves are used to identify the optimum pH of the aqueous mobile phase, range of start and end % of acetonitrile, and a suitable column for further optimization.

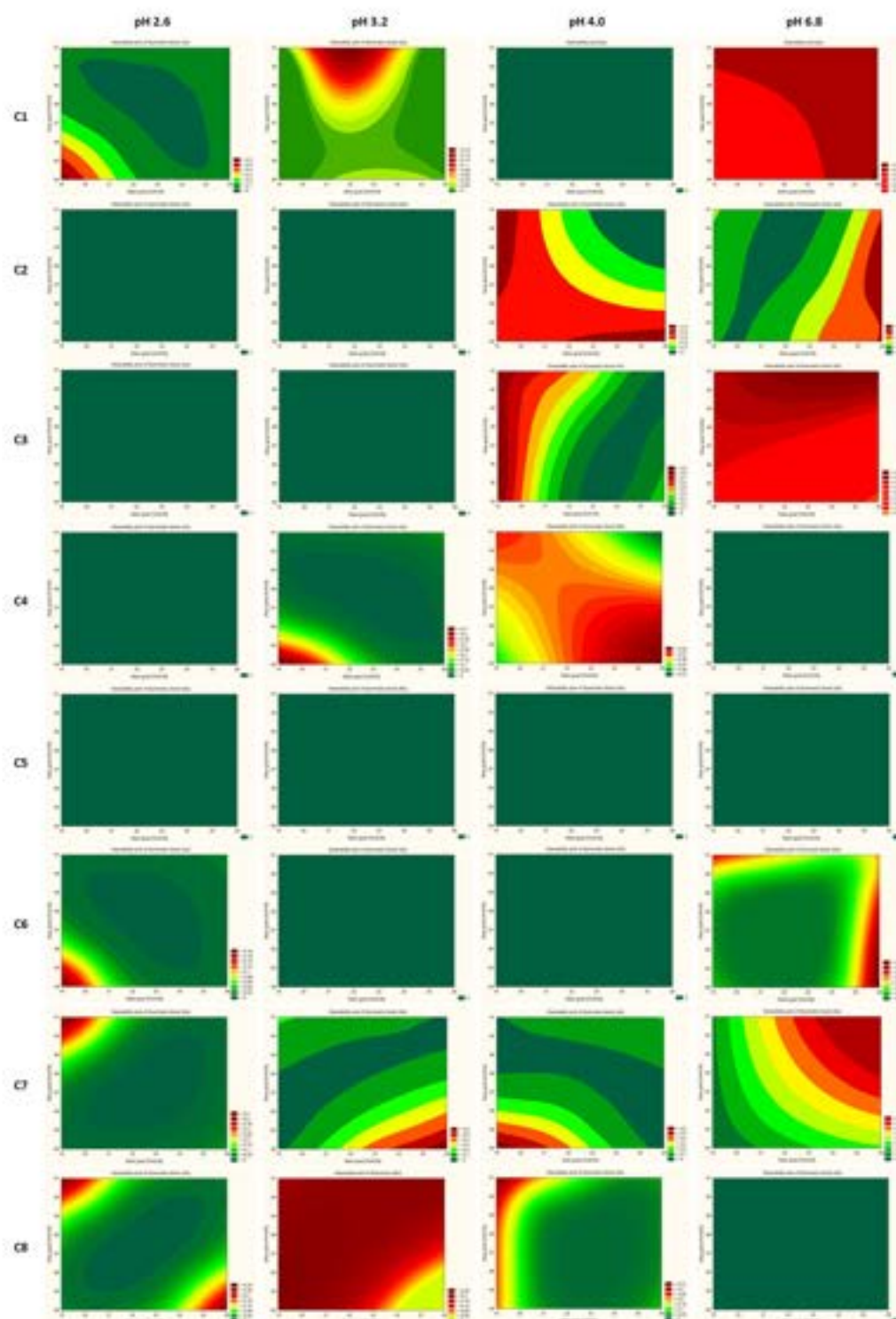
The trellis graph (Figures 4 and 5) shows the results (desirability plot) of screening experiments using different columns, different pH, different start, and final % of acetonitrile, separately for the resolutions and symmetry factors. The red tint in the graphs shows the “knowledge space”, the area where all the critical method attributes (CMAs), i.e., the resolution between peaks, and symmetry factors are within the expected range ( $R_s \geq 2.0$ , and  $0.8 \leq A_s \leq 1.8$ ), and green tint shows the area where no requirements of CMAs are not met. Figure 6 presented an example of chromatograms corresponding to the selected conditions of separation from screening tests.

Based on the evaluation of the screening experiments results calculated by the STATISTICA Software (version 13.3) TIBCO Inc. (Palo Alto, CA, USA), the values of the critical parameters of the methods (CMPs) allow for obtaining the optimal conditions, meeting the acceptance criteria (CMAs) for the separation of the test substance CPL409116, and its nine impurities are shown in Table 4.

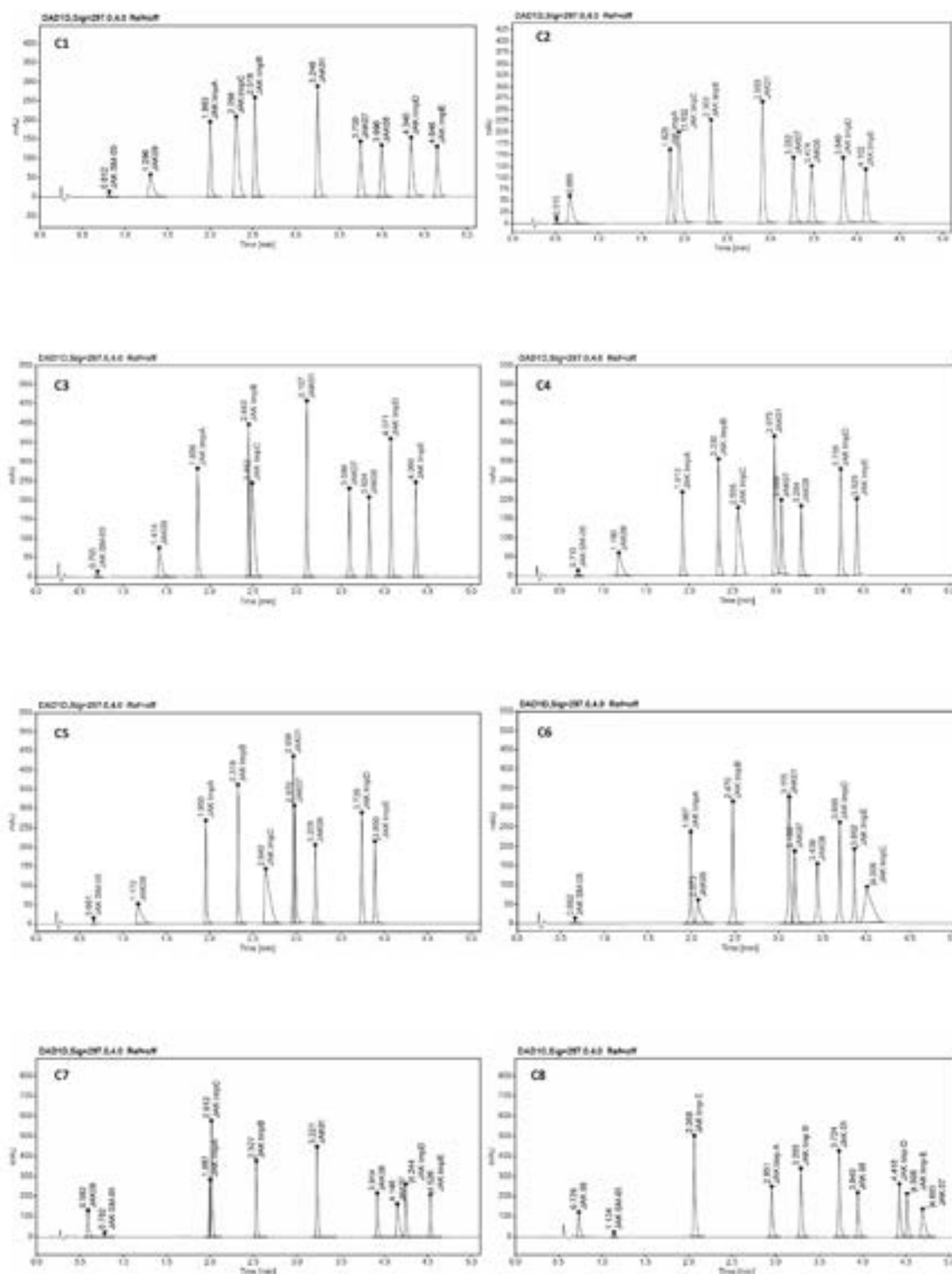




**Figure 4.** Screening experiment results showing the interaction effect of columns, % of organic solvent at the start and end gradient, and pH with CMA as a desirability plot of resolutions ( $R_s$ ). C1—ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies), C2—Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C3—ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m Waters), C4—InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 × 50 mm, 1.9  $\mu$ m, Agilent Technologies), C5—Kinetex Biphenyl (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C6—Kinetex PFP (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C7—ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters), and C8—ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2.1 × 100 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters).



**Figure 5.** Screening experiment results showing the interaction effect of columns, % of organic solvent at the start and end gradient, and pH with CMAs as a desirability plot of symmetry factors ( $A_s$ ). C1—ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies), C2—Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C3—ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m Waters), C4—InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 × 50 mm, 1.9  $\mu$ m, Agilent Technologies), C5—Kinetex Biphenyl (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C6—Kinetex PFP (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Phenomenex), C7—ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters), and C8—ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2.1 × 100 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters).



**Figure 6.** An example of chromatograms from screening experiments on the eight tested columns: C1—ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies), C2—Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex), C3—ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm Waters), C4—InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 × 50 mm, 1.9 μm, Agilent Technologies), C5—Kinetex Biphenyl (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex), C6—Kinetex PFP (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex), C7—ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Waters), and C8—ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2.1 × 100 mm, 1.7 μm, Waters).

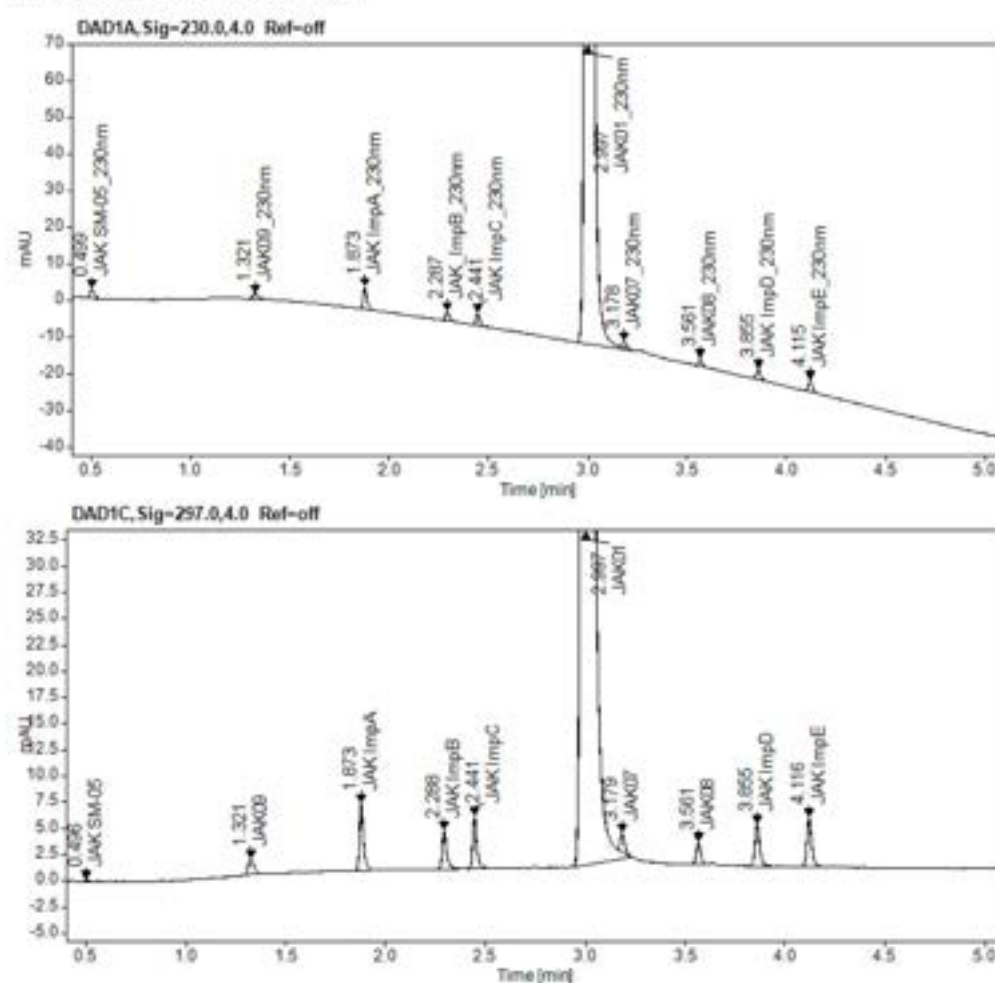
Table 4. Summary of the screening experiments results.

Column	pH of Buffer	Critical Method Parameters (CMAs)	Optimal Conditions of CMPs	
			Start Gradient [% ACN]	End Gradient [% ACN]
ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies)	2.6	Symmetry factor of JAK09 and JAK ImpD Resolution of JAK SM-05/JAK09	19–21	84–86
	3.2	Symmetry factor of JAK 09 Symmetry factor of JAK ImpC (>1.77) Symmetry factor of JAK ImpD Resolution of JAK ImpC/JAK ImpB (<1.5)	21–23	88–90
	4.0	Symmetry factor of JAK ImpD (>2.0) Symmetry factor of JAK ImpE (>1.9) Resolution of JAK ImpC—JAK Imp E	not found	not found
	6.8	Resolution of JAK ImpA/JAK ImpB (<1.5) Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.8) Symmetry factor of JAK09 (>1.8)	not found	not found
Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex)	2.6	Symmetry factor of JAK ImpB (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpD (>1.8) Symmetry factor of JAK09 (>1.8)	not found	not found
	3.2	Symmetry factor of JAK ImpB (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpD (>1.8) Symmetry factor of JAK09 (<1.7)	not found	not found
	4.0	Symmetry factor of JAK ImpC (<1.7) Resolution of JAK ImpB/JAK07	20–24	85–87
	6.8	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.8) Resolution of JAK ImpC/JAK ImpB (<0.5) Symmetry factor of JAK09 (>2.1) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.9)	not found	not found
ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm Waters)	2.6	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.8) Resolution of JAK ImpC/JAK ImpB (<0.5) Symmetry factor of JAK09 (>2.1) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.9)	not found	not found
	3.2	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.8) Symmetry factor of JAK09 (>1.6)	not found	not found
	4.0	Symmetry factor of JAK ImpC (>2.0) Resolution of JAK07/JAK08 (<0.5) Symmetry factor JAK07 (>1.8)	not found	not found
	6.8	Resolution of JAK08/JAK01 (<0.5) Symmetry factor JAK07 (<0.6) Symmetry factor JAK09 (>2.0) Symmetry factor JAK07 (>1.8)	not found	not found
InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 × 50 mm, 1.9 μm, Agilent Technologies)	2.6	Resolution of JAK07/JAK01 (<0.6) Symmetry factor of JAK09 (>2.3) Symmetry factor of JAK ImpB (>2.4) Symmetry factor of JAK07 (>2.3)	not found	not found
	3.2	Resolution of JAK07/JAK01 (<1.1) Symmetry factor of JAK09 (>1.9) Symmetry factor of JAK ImpB (>1.9)	not found	not found
	4.0	Symmetry factor of JAK01 (>2.5) Resolution of JAK07/JAK ImpB (<0.8) Symmetry factor of JAK07 (>2.4)	not found	not found
	6.8	Resolution of JAK09/JAK ImpA (<1.6) Symmetry factor of JAK09 (>1.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.8) Resolution of JAK08/JAK07 (<0.5) Symmetry factor of JAK09 (>1.8)	not found	not found
Kinetex PFP (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex)	2.6	Symmetry factor of JAK ImpC (>2.1) Resolution of JAK ImpE/JAK ImpD (<0.8) Symmetry factor of JAK ImpC (>1.9) Resolution of JAK08/JAK07 (<0.85)	not found	not found
	3.2	Resolution of JAK09/JAK ImpA (<1.8) Symmetry factor of JAK07 (>1.8) Resolution of JAK07/JAK08 (<2.0) Symmetry factor of JAK07 (>1.8)	not found	not found
	4.0	Resolution of JAK ImpB/JAK ImpC (<0.6) Symmetry factor of JAK09	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK ImpB Symmetry factor of JAK07	20–23	85–87
ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Waters)	2.6	Resolution JAK ImpE/JAK ImpD (<2.28, >2.00) Symmetry factor of JAK07 (<1.8)	20–21	89–90
	3.2	Resolution JAK ImpE/JAK ImpD (<2.3, >2.00) Symmetry factor of JAK07 (<1.8)	20–23	85–90
	4.0	Resolution JAK07/JAK ImpE (<1.3) Resolution JAK08/JAK01	not found	not found
	6.8	Symmetry factor of JAK01 (<0.8)	not found	not found

For further study follow chromatographic condition was selected ZORBAX Eclipse Plus C18, pH 2.6, 20% of ACN at start gradient, 85% of ACN at end gradient; Kinetex EVO C18, pH 4.0, 21% of ACN at start gradient, 86% of ACN at end gradient; ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl, pH 2.6, 20% of ACN at start gradient, 85% of ACN at end gradient.

### 2.5. Optimization and Robustness Testing

In the following step of method development, the conditions chosen during the screening experiments were tested. The real sample of JAK01 substance and a sample of the test substance spiked with impurities at the 0.15% level, apart from the SST solution, were running, and robustness tests were performed. Although the acceptance criteria of CMAs were met for all three conditions selected for the screening study, a chromatogram of the real substance with overload concentrations of JAK01 with impurities spiked at 0.15% level is insufficient. On column Kinetex Evo C18, impurity JAK07 elutes on the slope of the main peak of JAK01 (Figure 7). On the ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl column we observe a similar situation, impurity JAK08 elutes on the slope of the peak of JAK01. Because of this, there may be problems with coelution and peak integration when applying the method to routine testing.



**Figure 7.** Chromatogram of JAK01 substance solution spiked with impurities at 0.15% level on the Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm, Phenomenex) column.

Therefore, the best choice of chromatographic conditions for the determination of JAK01 impurities seems to be on the Zorbax Eclipse Plus C18 column, pH 2.6, with 20% of ACN at the start and 85% of ACN at the ending gradient. The higher resolution ( $R_s > 8.5$ ) between the main peak of JAK01 and the nearest impurity is observed under this condition on the SST solution, compared to Kinetex Evo C18 and ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl columns. On the Kinetex Evo C18 column, the resolution between JAK01 and the next peak JAK07 equals 2.2, and on the ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl column resolution between JAK01 and JAK08 equals 5.1.

In the next step, separations conditions on a Zorbax Eclipse Plus C18 column with 10 mM formic acid pH 2.6 as an aqueous mobile phase were applied to the robustness test.

Typically, the robustness of a developed method is tested by changing one method parameter at a time, keeping the other variables constant. During our studies, many variables were changed simultaneously in various combinations using the DOE approach, based on the fractional factorial design with central point values, and with full repetition for statistical analysis of robustness.

Apart from variables tested at the screening step, the column temperature, and concentration of formic acid were additionally tested. The range of variable values was established from the knowledge space of the screening step, % of ACN at the start of the gradient ( $20\% \pm 1\%$ ), % of ACN at the end of the gradient ( $85\% \pm 1\%$ ). The concentration of formic acid was tested in the range of  $10\text{mM} \pm 1\text{mM}$ , and the column temperature was  $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ . The other parameters of separation are kept at a constant value that was detailed described in Section 3.2.

The application of fractional factorial design ( $2^{(4-1)}$ ) with a center point and repetition instead of full factorial design with center points ( $3^4$ ) and repetition allows obtaining the same knowledge about the robustness of the method when performing 18 experiments instead of 81. The runs of the experimental plans were carried out in a randomized order with SST solution and a test solution containing  $0.5\text{ mg mL}^{-1}$  of JAK01 and  $0.75\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  of JAK01 impurities corresponding to 0.15% level, to assure sufficient selectivity.

The design of the experiment plan and corresponding raw data were presented in Table 5.

Multiple linear regression was applied for the calculation of the coefficients of the nine models for resolution between all pairs of peaks and ten models of the symmetry factors for all peaks, then the models were refined to improve their quality by removing some of the non-significant and entangled effects. The evaluation of statistical analysis tools like ANOVA for each response was used to determine the significance of each method parameter selected for the study using the p-value (significance level  $p < 0.05$ ). The graphical analysis of the effects presents in Figure 8 as an example of the Pareto chart (for  $R_s$  between JAK01 and JAK07 and  $A_s$  for JAK01), which allows the retained coefficients and the significant terms of the models to be identified the impact of the tested variables on the CMAs.

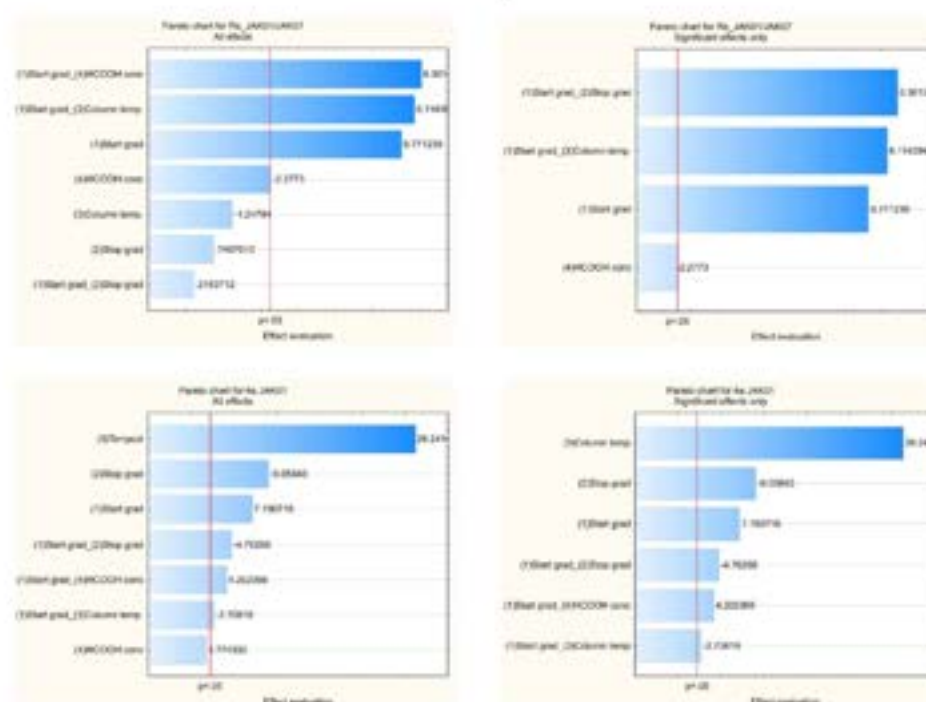


Figure 8. The Pareto chart for  $R_s$  between JAK01 and JAK07 and  $A_s$  for JAK01 for robustness tests.



After verifying the reliability of the regression models, the results were converted to the desirability plots for a specified value of CMAs ( $R_s \geq 2.0$  for all pairs of peaks, and the symmetry factor of all peaks  $0.8 \leq A_s \leq 1.8$ ) for values of the CMPs from the robustness testing range. The analysis of these plots was used to estimate the final design space of the proposed method.

Based on the results of the statistical analysis, we can conclude that the assumed requirements for CQAs are met in the whole robustness tested range of the CMPs—desirability factors are well above 0.0, near the maximum value equals 1.0.

### 2.6. Method Operable Design Region (MODR) and Control Strategy

Based on the results of the design of the experiment from robustness tests, the STATISTICA software was also employed for verifying the MODR, i.e., it was checked whether the CMPs selected in the screening phase, in a small range centered on the optimized value, had a significant effect on CMAs.

For this purpose, probability maps were calculated by Monte-Carlo simulations, propagating the predictive error by using the model equation to the CMAs and computing the probability of reaching the desired objectives [11,12]. The threshold for the risk of failure was set to 10%. This means that in the calculated zone the values of the CMAs are satisfied with a probability of 90%. For all variables (CMAs) risk of failure was well below 10% at the robustness tested range of CMPs.

Based on the statistical result evaluations of the screening, optimization, robustness, and risk tests, the MODR corresponds to the following intervals,  $20\% \pm 1\%$  of ACN at the start of the gradient,  $85\% \pm 1\%$  of ACN at the end of the gradient, the concentration of formic acid  $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ , and the column temperature  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

The control strategy of the method was designed by taking into account the results of robustness testing and identifying system suitability criteria [21]. The intervals for the accepted CMAs values were included between the lowest and the highest values for the CMAs measured when performing a robustness study. The obtained interval resolutions for the SST solution were shown in Table 5. Additionally, based on the screening study, we could define the requirements for the resolution between JAK01 and the nearest impurity peak for SST solution as more than 6.4. Less value of it causes that impurity peak may coelute with the main peak of JAK01 at an overloaded concentration in the test solution.

### 2.7. Validation

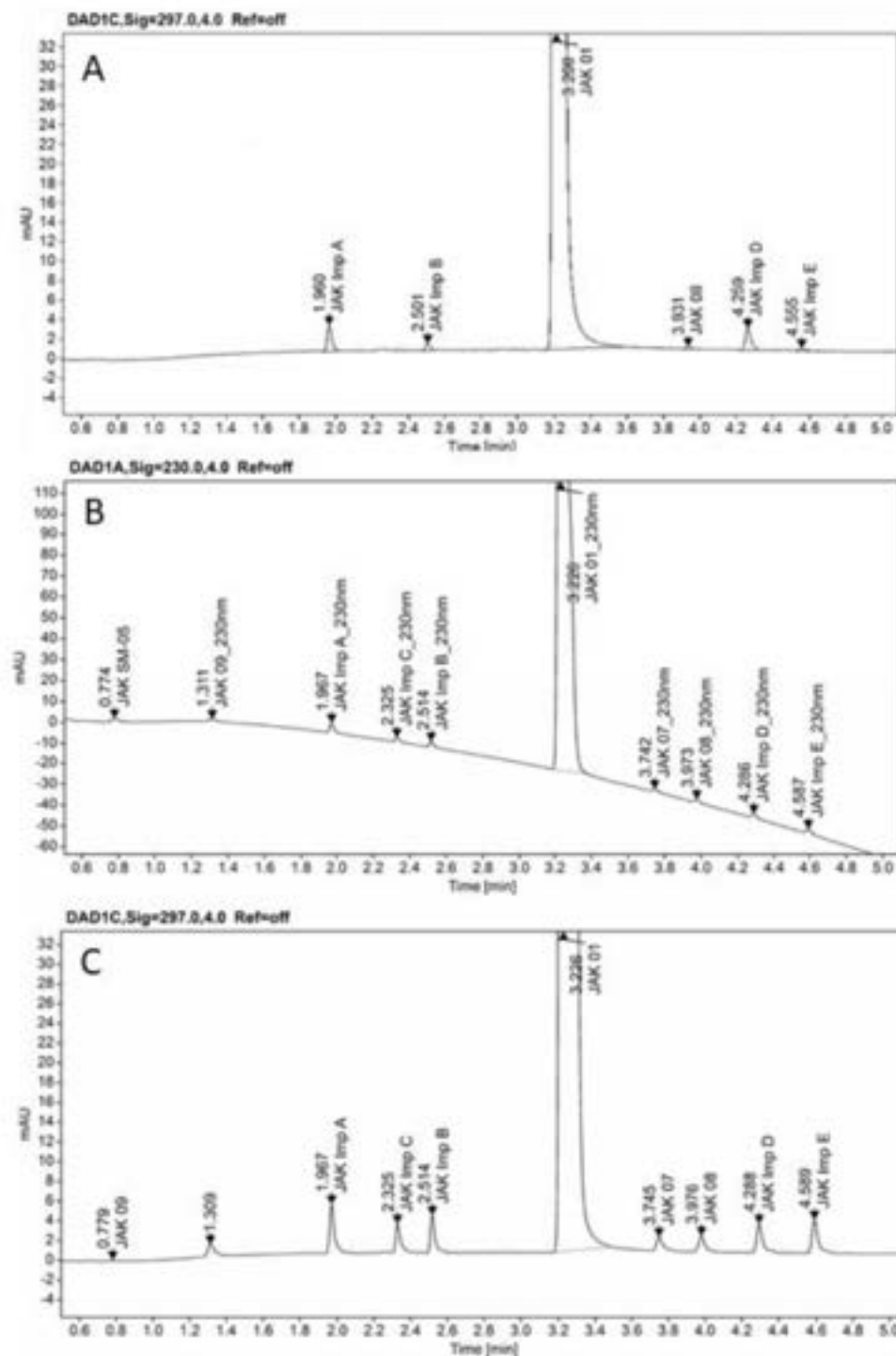
Validation of the method was carried out in compliance with ICH guideline Q2(R1) [25]. The validation data are reported in Table 6, showing adequate performances for the intended purpose. The determined content of all CPL409116 (JAK01) impurities showed evidence of good precision (RSDs were less than 10.0%). LOQ concentration value is on the reporting threshold level of 0.05% for all impurities.

**Table 6.** Summary of the validation results.

Parameter	Acceptance Criteria	JAK SM-05	JAK 09	JAK Imp A	JAK Imp C	JAK Imp B	JAK 07	JAK 08	JAK Imp D	JAK Imp E	Compliance with Acceptance Criteria (Yes/No)
Linearity, R	LOQ—120% of the specification limit (for each impurity) Concentration levels $n = 5$ , $R \geq 0.99$	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	Yes
Repeatability, RSD (%)	LOQ—%RSD (area) $\leq 15\%$	6.8	8.5	2.7	4.7	4.2	9.1	3.4	2.5	2.0	Yes
	100% of the specification limit—%RSD (area) $\leq 15\%$	4.5	5.2	0.8	1.8	2.0	5.3	1.8	3.3	1.5	Yes
Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ)	$S/N \geq 3$ ( $n = 3$ )	6	3	8	9	11	5	5	4	11	Yes
	$S/N \geq 10$ ( $n = 6$ )	21	12	22	29	31	14	16	8	32	Yes
Specificity	Resolution between two neighboring peaks, $R_s \geq 2.0$	-	9.6	12.0	8.4	4.6	9.9	4.1	5.8	5.6	Yes



The developed method was finally applied for the analysis of a real sample of CPL409116 substance from a large-scale synthetic process. Overlay chromatograms JAK01 test solution and JAK01 test solution spiked with impurities at 0.15% level shown in Figure 9.



**Figure 9.** Overlay chromatograms JAK01 test solution (A), and JAK01 test solution spiked with impurities at 0.15% level at 230 nm (B), and at 297 nm (C), on the ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) column.

### 3. Material and Methods

#### 3.1. Chemicals and Reagents

Reference standard JAK01 (CPL409116) and its impurities (JAK07, JAK08, JAK09, JAK ImpA, JAK ImpB, JAK ImpC, JAK ImpD, JAK ImpE, and JAK SM-05) were manufactured in-house by Celon Pharma S.A. (Lomianki, Poland).

Mix reference substances to the distribution coefficient chromatographically determinations (CHI logD) including paracetamol, acetanilide, acetophenone, propiophenone, butyrophenone, and valerophenone (purity >99.0%) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany).

Acetonitrile (ACN) (hypergrade for LC-MS), and methanol (MeOH, hypergrade for LC-MS) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), and dimethyl sulfoxide (DMSO, for HPLC) from POCH (Gliwice, Poland). Formic acid (98–100%, eluent additive for LC-MS) and ammonia (25% solution, eluent additive for LC-MS) were obtained from CHEM-LAB NV (Zedelgem, Belgium). Ultra-pure water for HPLC was obtained from the water purification system Milli-Q IQ 7000 from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

#### 3.2. Solutions and Sample Preparations

A number of buffers (10mM HCOONH<sub>4</sub>) with different pH levels were prepared for these experiments. Buffers (pH 3.2, 3.8, 4.0, 4.2, and 6.8) were prepared by mixing the formic acid solution with different levels of ammonia (25% solution) to adjust the pH. The individual phases of formic acid were prepared by adding a suitable amount of concentrated acid to water. Stock solutions were prepared for all compounds and stored at 4 °C. A standard stock solution of JAK01 (3 mg mL<sup>-1</sup>) was prepared using a mixture of DMSO:MeOH (20:80 v/v). Stock solutions (4 mg mL<sup>-1</sup>) for each impurity (JAK07, JAK08, JAK09, JAK ImpA, JAK ImpB, JAK ImpC, and JAK SM-05) were prepared in a mixture of DMSO: MeOH (20:80 v/v). Stock solutions (4 mg mL<sup>-1</sup>) for JAK ImpD and JAK ImpE were prepared in DMSO. Working standard solutions were daily prepared using MeOH. A mix of all compounds at the concentration level of 0.1–1 µM (as SST solution) was used to screen the chromatographic conditions. In the next stage of the research, a mixture of JAK01 (0.5 mg mL<sup>-1</sup>; 100%) with nine of its impurities (each at the level of 0.75 µg mL<sup>-1</sup>; 0.15%) was used. For the tested impurities, linearity in the range of 0.05% to 0.18% was also demonstrated by preparing mixtures of compounds at the appropriate concentration level and a solution of impurities at 0.02% was prepared for detection limit (LOD) determination.

For the CHI logD determination, separate solutions of all the tested sample were prepared at a concentration of 1 mM in DMSO. Reference mix solutions have a concentration of 1 mM in DMSO.

#### 3.3. Instrumentations and Chromatographic Conditions

Eight different chromatographic columns were evaluated: ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies), Kinetex EVO C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex), ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm Waters), InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (2.1 × 50 mm, 1.9 µm, Agilent Technologies), Kinetex Biphenyl (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex), Kinetex PFP (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Phenomenex), ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Waters), and ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (2.1 × 100 mm, 1.7 µm, Waters). When performing the chromatographic optimization, eluent A consisted of formic acid (10 mM, pH 2.6) and ammonium formate (10 mM) buffer with different concentrations of additives was used to prepare buffer solutions of 3.2, 4.0, and 6.8, and eluent B consisted of the organic solvent (ACN). The elution was performed with linear gradient mode. The starting and ending percentage of eluent B was optimized at a screening phase at a range from 20% to 25% and from 85% to 90%. The ending percentage of eluent B was isocratically maintained for 2 min. The whole gradient time was 7 min and included 4 min of elution step, 1 min of washing and 2 min of stabilization step. The other working conditions were as follows: sample injection volume,

1  $\mu\text{L}$ ; flow rate, 0.50  $\text{mL min}^{-1}$ ; oven temperature, 30  $^{\circ}\text{C}$  (28–32  $^{\circ}\text{C}$ ); detection UV 297 nm (230 nm for JAK SM-05), and the autosampler temperature, 15  $^{\circ}\text{C}$ .

The chromatographic analyses were run by an Infinity II 1290 UHPLC Method Development System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with quaternary high-pressure pump, 12-position solvent selection valve, multisampler with thermostat, multicolumn thermostat including 8-position quick-change column selection valve and diode array detector. UHPLC system was controlled by OpenLab Client/Server System (version 2.5) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

The CHI logD for JAK01 and its impurities was determined on an UltraCore 2.5 SuperC18 (2.1  $\times$  50 mm, 2.5  $\mu\text{m}$ , ACE) column with eluent A consisting of formic acid (10 mM, pH 2.6), and ammonium acetate (50 mM) buffers with different concentrations of additives were used to prepare buffer solutions of 7.4, and 10.5, and eluent B consisted ACN [58].

#### 3.4. Calculations and Software

Calculations of physico-chemical properties were made with the ACD Labs Percepta software (2020.1.1 release) (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada) including PhysChem and Drug Profiler modules [40].

For evaluation of potential mutagenicity two complementary (Q)SAR prediction methodologies were used DEREK Nexus module (Lhasa Ltd., Leeds, UK) in the Star Drop software (version 6.6) (Optibrium Ltd., Cambridge, UK) [50–52] was used for rule-based calculations. For statistically-based (Q)SAR methodology the Toxicity Estimation Software Tool T.E.S.T (version 4.2.1) (US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA) [53,54] software was used.

The STATISTICA (version 13.3) TIBCO Software Inc. (Palo Alto, CA, USA) was used for DOE and investigations—generate plans of the experiment, screening, optimization, robustness, and risk study of analytical method conditions, and statistical analysis of obtained results [55–57].

#### 4. Conclusions

The present work has demonstrated the application of AQbD for the selection and development of a chromatographic analytical method for the determination of purity CPL409116 (JAK01) for controlling the large-scale synthetic process of the substance, performing stability tests, and manufacturing of the final drug form for clinical trials.

The ultimate goal of the chromatographic method development is to obtain an acceptable resolution of all components within a reasonable analysis time. To meet the quality requirements of the formal ICH regulatory guidelines [2,25], but bearing in mind the cost and time effectiveness of the preclinical stage of drug development, the main goal was to design a quick, simple, and robust analytical method.

At the beginning of the method development process, physico-chemical properties of CPL409116 and its related substances have been performed. In practice, not all values obtained from calculations give adequate information to use for chromatography method development. However, for this purpose, a very useful strategy is the determination of the hydrophobicity index CHI logD that gives also the possibility to narrow the scope of tested pH of the stationary phases at the screening stage.

In the present work, final method selection has been performed by screening analysis with eight chromatographic columns differing in chemical modifications of the stationary phase (C18, phenyl-hexyl, biphenyl), three linear gradients with various increasing of the organic phase, and aqueous phases differing in pH in acidic range (pH 2.6–6.8).

As a result, we selected three different conditions that meet acceptance criteria (ATP), but as a most universal condition, Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column with 10 mM formic acid pH 2.6 as an aqueous mobile phase, was applied for the robustness test.

Using a DOE approach and application of fractional factorial design with a center point and repetition, instead of full factorial design with center points and repetition, allows

for obtaining the same knowledge about the robustness but is limited to 18 experiments based on simultaneous changes of many variables.

In this way, the need to perform a large number of analytical runs was effectively limited, confirming the scope of applicability of the selected analytical method with the AQB method. Based on the results of the statistical analysis, we can conclude that the assumed requirements for CQAs are met in the whole robustness tested range of the CMPs—desirability factors are well above 0.0, near the maximum value equals 1.0.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.G.-B., D.A.S., U.D. and W.M.; methodology, L.G.-B. and D.A.S.; software, D.A.S. and L.G.-B.; validation, L.G.-B., U.D. and W.M.; formal analysis, L.G.-B. and D.A.S.; investigation, L.G.-B., U.D. and M.D.; resources and chemical synthesis of compounds, M.M., D.A.S., K.D., B.S., K.S., A.M. and A.B.; data curation, D.A.S. and L.G.-B.; writing—original draft preparation, L.G.-B.; writing—review and editing, W.M. and D.A.S.; visualization, L.G.-B., U.D. and D.A.S.; supervision, D.A.S., K.D. and M.W.; project administration, L.G.-B. and U.D.; funding acquisition, M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was co-funded by Celon Pharma S.A. and the National Centre for Research and Development (Poland) Grant POIR.01.01.01-00-0382/16.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare the following financial interests/personal relationships, which may be considered as potential competing interests: all contributors to this work at the time of their direct involvement in the project were full-time employees of Celon Pharma S.A. M. Wiczorek is the CEO of Celon Pharma S.A. Some of the authors are the shareholders of Celon Pharma S.A.

## References

1. Elder, D.; Teasdale, A. ICH, Q9, Quality Risk Management. In *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2017.
2. Holm, P.; Allesø, M.; Bryder, M.C.; Holm, R. ICH, Q8(R2), Pharmaceutical Development. In *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2017.
3. Borman, P.; Chatfield, M.; Nethercote, P.; Thompson, D.; Truman, K. The application of quality by design to analytical methods. *Pharm. Technol.* **2007**, *31*, 142–152.
4. Schweitzer, M.; Pohl, M.; Brown, M.H.; Nethercote, P.; Borman, P.; Smith, K.; Larew, J. Implications and Opportunities of Applying QbD Principles to Analytical Measurements. *Pharm. Technol.* **2010**, *34*, 52–59.
5. Vogt, F.G.; Kord, A.S. Development of quality-by-design analytical methods. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 797–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Castle, B.C.; Forbes, R.A. Impact of Quality by Design in Process Development on the Analytical Control Strategy for a Small-Molecule Drug Substance. *J. Pharm. Innov.* **2013**, *8*, 247–264. [[CrossRef](#)]
7. Reid, G.; Morgado, J.; Barnett, K.; Harrington, B.; Harwood, J.; Fortin, D. Analytical quality by design (AQbD) in pharmaceutical development. *Am. Pharm. Rev.* **2013**, *16*, 49–59.
8. Parra, M.K.; Schmidt, A.H. Life Cycle Management of Analytical Methods. *J. Pharm. Biomed.* **2018**, *147*, 506–517. [[CrossRef](#)]
9. Dispas, A.; Avohou, H.T.; Lebrun, P.; Hubert, P.; Hubert, C. Quality by design approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *101*, 24–33. [[CrossRef](#)]
10. Basso, J.; Mendes, M.; Cova, T.F.; Sousa, J.J.; Pais, A.A.; Vitorino, C. Analytical Quality by Design (AQbD) as a multiaddressable platform for co-encapsulating drug assays. *The Royal Society of Chemistry 2018. Anal. Methods* **2018**, *10*, 5659. [[CrossRef](#)]
11. Pasquini, B.; Orlandini, S.; Furlanetto, S.; Gotti, R.; Del Bubba, M.; Boscaro, F.; Bertaccini, B.; Douša, M.; Pieraccini, G. Qualit by Design as risk-based strategy in pharmaceutical analysis: Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of nintedanib and its impurities. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1611*, 460615. [[CrossRef](#)]
12. Pawar, A.; Pandita, N. Statistically Designed, Targeted Profile UPLC Method Development for Assay and Purity of Haloperidol in Haloperidol Drug Substance and Haloperidol 1 mg Tablets. *Chromatographia* **2020**, *83*, 725–737. [[CrossRef](#)]
13. Hibbert, D.B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B* **2012**, *910*, 2–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kochling, J.; Wu, W.; Hua, Y.; Guan, Q.; Castaneda-Merced, J. A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC-MS methods development for protein analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *125*, 130–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gaudin, K.; Ferey, L. Quality by Design: A Tool for Separation Method Development in Pharmaceutical Laboratories. *LCCG* **2016**, *29*, 16–25.

16. Rácz, N.; Molnár, I.; Zöldhegyi, A.; Rieger, H.-J.; Kormány, R. Simultaneous optimization of mobile phase composition and pH using retention modeling and experimental design. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *160*, 336–343. [CrossRef] [PubMed]
17. Orlandini, S.; Pinzauti, S.; Furlanetto, S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal. Biomol. Chem.* **2013**, *405*, 443–450. [CrossRef] [PubMed]
18. Li, Y.; Terflöth, G.J.; Kord, A.S. A systematic approach to RP-HPLC method development in a pharmaceutical QbD environment. *Am. Pharm. Rev.* **2009**, *12*, 87–95.
19. Bhaskaran, N.A.; Kumar, L.; Reddy, M.S.; Pai, G.K. An analytical “quality by design” approach in RP-HPLC method development and validation for reliable and rapid estimation of irinotecan in an injectable formulation. *Acta Pharm.* **2021**, *71*, 57–79. [CrossRef]
20. Jackson, P.; Borman, P.J.; Campa, C.; Chatfield, M.J.; Godfrey, M.; Hamilton, P.R.; Hoyer, W.; Norelli, F.; Orr, R.; Schofield, T. Using the analytical target profile to drive the analytical method lifecycle. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2577–2585. [CrossRef]
21. Rathore, A.S.; Winkle, H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 26–34. [CrossRef]
22. Yu, L.X. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res.* **2007**, *25*, 781–791. [CrossRef]
23. Csoka, I.; Pallagi, E.; Paal, T.L. Extension of quality-by-design concept to the early development phase of pharmaceutical R&D processes. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1340–1343. [PubMed]
24. Deidda, R.; Orlandini, S.; Hubert, P.; Hubert, C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *161*, 110–121. [CrossRef] [PubMed]
25. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 9 November 2005.
26. Final Concept Paper: ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation. Available online: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_Q14/Q2R2Q14EWG\\_ConceptPaper\\_2018\\_1115.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_Q14/Q2R2Q14EWG_ConceptPaper_2018_1115.pdf) (accessed on 25 May 2021).
27. Tome, T.; Žigart, N.; Časar, Z.; Obreza, A. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 1784–1802. [CrossRef]
28. Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Bujak, A.; Szymczak, K.; Gunerka, P.; Dubiel, K.; Wieczorek, M.; Pieczykolan, J. Pyrazole[1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Kinase Jak Inhibitors. W.O. Patent WO2018206739A1, 15 November 2018.
29. Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Bujak, A.; Szymczak, K.; Gunerka, P.; Dubiel, K.; Wieczorek, M.; Pieczykolan, J. Pyrazole[1,5-a]Pyrimidine Derivatives as Kinase Jak Inhibitors. E.P. Patent EP3621966 B1, 18 March 2020.
30. Dulak-Lis, M.; Bujak, A.; Gala, K.; Banach, M.; Kędzierska, U.; Miszkiewicz, J.; Hucz-Kalitowska, J.; Mroczkiewicz, M.; Stypik, B.; Szymczak, K.; et al. A novel JAK/ROCK inhibitor, CPL409116, demonstrates potent efficacy in the mouse model of systemic lupus erythematosus. *J. Pharmacol. Sci.* **2021**, *145*, 340–348. [CrossRef] [PubMed]
31. Iuliani, P.; Carlucci, G.; Marrone, A. Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 46–55. [CrossRef]
32. Kishore, C.R.P.; Mohan, G.V.K. Development and Validation of Amlodipine Impurities in Amlodipine Tablets Using Design Space Computer Modeling. *Am. J. Anal. Chem.* **2016**, *7*, 918–926. [CrossRef]
33. Prasad, S.S.; Mohan, G.V.K.; Babu, A.N. *Orient. J. Chem.* **2019**, *35*, 140–149.
34. Sahu, P.K.; Ramisetty, N.R.; Cecchi, T.; Swain, S.; Patro, C.S.; Panda, J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *147*, 590–611. [CrossRef]
35. OECD. *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method*; OECD Publishing: Paris, France, 1995.
36. Albert, A. *Selective Toxicity: The Physicochemical Basis of Therapy*; Chapman and Hall: London, UK, 1979.
37. Klose, M.H.M.; Theiner, S.; Varbanov, H.P.; Hofer, D.; Pichler, V.; Galanski, M.; Meier-Menches, S.M.; Keppler, B.K. Development and Validation of Liquid Chromatography-Based Methods to Assess the Lipophilicity of Cytotoxic Platinum(IV) Complexes. *Inorganics* **2018**, *6*, 130. [CrossRef]
38. Dolan, J.W. Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity. *LCGC N. Am.* **2017**, *35*, 22–28.
39. Lewis, J.A.; Lommen, D.C.; Raddatz, W.D.; Dolan, J.W.; Snyder, L.R.; Molnar, I. Computer simulation for the prediction of separation as a function of pH for reversed-phase high-performance liquid chromatography: I. Accuracy of a theory-based model. *J. Chromatogr. A* **1992**, *592*, 183–195. [CrossRef]
40. *ACD/Percepta*; Version 2020.1.1; Advanced Chemistry Development, Inc.: Toronto, ON, Canada, 2020; Available online: <http://www.acdlabs.com> (accessed on 26 November 2020).
41. Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/log D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022–2029. [CrossRef]
42. Valko, K. *Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery—Chromatographic Techniques for Lead Optimization*, 1st ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2014.
43. Snyder, L.R.; Dolan, J.W.; Carr, P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 77–116. [CrossRef]
44. Snyder, L.R.; Dolan, J.W.; Marchand, D.H.; Carr, P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *Adv. Chromatogr.* **2012**, *50*, 297–376. [PubMed]

45. Available online: <http://www.hplccolumns.org> (accessed on 29 January 2021).
46. Available online: <https://apps.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html> (accessed on 29 January 2021).
47. Committee for Human Medicinal Products. ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. *Int. Conf. Harmon.* **2015**, *7*, 1–110.
48. Baertschi, S.; Olsen, B. Chapter 12—Mutagenic impurities. In *Specification of Drug Substances and Products*, 2nd ed.; Riley, C.M., Rosanske, T.W., Reid, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 321–344.
49. Shaikh, T.; Gosar, A.; Sayyed, H. Nitrosamine Impurities in Drug Substances and Drug Products. *J. Adv. Pharm. Pract.* **2020**, *2*, 48–57.
50. Orbitrium. DEREK Nexus—Trial licence. Available online: <https://www.optibrium.com> (accessed on 2 November 2020).
51. Lhasa Limited. DEREK Nexus. Available online: <https://www.lhasalimited.org> (accessed on 2 November 2020).
52. Marchant, C.A.; Briggs, K.A.; Long, A. In Silico Tools for Sharing Data and Knowledge on Toxicity and Metabolism: Derek for Windows, Meteor, and Vitic. *Toxicol. Mech. Methods* **2008**, *18*, 177–187. [CrossRef]
53. US EPA Research. Toxicity Estimation Software Tool (TEST). Available online: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (accessed on 30 October 2020).
54. Martin, T. *User's Guide for T.E.S.T. (Version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool) A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure*; EPA: Washington, DC, USA, 2016; Volume 63.
55. StatSoft's Electronic Statistics Textbook. 2006. Available online: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html> (accessed on 27 January 2021).
56. TIBCO Software Inc. Data Science Textbook. 2020. Available online: <https://docs.tibco.com/data-science/textbook> (accessed on 27 January 2021).
57. Stanisław, A. *Przystępny kurs Statystyki z Zastosowaniem STATISTICA PL na Przykładach z Medycyny—Tom I–III*; StatSoft: Kraków, Poland, 2006.
58. Valko, K.L. Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds. *Future Drug Discov.* **2019**, *1*, FDD11. [CrossRef]

---

**10.2. Publikacja P2**

**Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Smuga D. A., Dubiel K., Wieczorek M.;  
Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning  
Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery;  
Biomedicines, **2023**, 11, 2752, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102752>  
IF: 4,7; MNiSW: 100

Review

# Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery

Lidia Gurba-Bryskiewicz <sup>\*</sup>, Wioleta Maruszak , Damian A. Smuga, Krzysztof Dubiel and Maciej Wieczorek

Medicinal Chemistry Department, Celon Pharma S.A., Marymoncka 15, 05-152 Kazuń Nowy, Poland; wioleta.maruszak@celonpharma.com (W.M.); damian.smuga@celonpharma.com (D.A.S.); krzysztof.dubiel@celonpharma.com (K.D.); maciej.wieczorek@celonpharma.com (M.W.)

\* Correspondence: lidia.gurba@celonpharma.com

**Abstract:** The successful development of nonviral delivery systems for nucleic acids has been reported extensively over the past years. Increasingly employed to improve the delivery efficiency and therapeutic efficacy of RNA are lipid nanoparticles (LNPs). Many of the various critical formulation parameters can affect the quality attributes and effectiveness of these nano-formulations. Therefore, the systematic drug development approach (QbD) and multivariate design and statistical analysis (DOE) can be very helpful and recommended for the optimization of the composition and production of RNA–LNPs. This review addresses the concepts and applications of QbD and/or DOE for the development of lipid nanoparticles for the delivery of different types of RNA, reporting examples published in the ten recent years presenting the latest trends and regulatory requirements as well as the modern mathematical and statistical design methods. As the topic explored in this review is a novel approach, the full QbD has been described in only a few papers, and a few refer only to some aspects of QbD. In contrast, the DOE approach has been used in most of the optimization works. Different approaches and innovations in DOE have been observed. Traditional statistical tests and modeling (ANOVA, regression analysis) are slowly being replaced by artificial intelligence and machine learning methods.

**Keywords:** quality by design (QbD); design of experiment (DOE); lipid nanoparticle (LNP); RNA delivery



**Citation:** Gurba-Bryskiewicz, L.; Maruszak, W.; Smuga, D.A.; Dubiel, K.; Wieczorek, M. Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2752. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102752>

Academic Editor: Aleksandra Romaniuk-Drapala

Received: 5 September 2023

Revised: 28 September 2023

Accepted: 28 September 2023

Published: 11 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In recent years, important developments in the pharmaceutical industry have occurred. Modern systems have been developed to ensure product quality in manufacturing information, quality management systems, and risk management [1–3]. These tools allow drug manufacturers to detect, analyze, correct, and prevent problems while continuously improving the drug manufacturing process [4–6]. Supporting this modernization in the rules used to manage drug manufacturing and product quality, in 2002, the FDA introduced the regulatory environment of the Current Good Manufacturing Practices (cGMP) [7,8].

After the publication of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use considerations (ICH) guidelines Q8 (R2), Q9, Q10, and Q11 [9–12], regulatory agencies (Food and Drug Administration—FDA and European Medicines Agency—EMA) approved the Quality by Design (QbD) approach. The ICH Q8 guideline recommended the integration of the “quality by design (QbD)” concept into the pharmaceutical industry [9].

The development of safe and efficient new drugs is a long, difficult, and expensive process. Using the new QbD approach, which ensures that the quality is provided by manufacturing instead of by-product testing, decreases the costs of product optimization.



QbD studies may provide some income to the drug manufacturers and benefits for patient safety—ensuring that they will obtain higher-quality drugs in a shorter time.

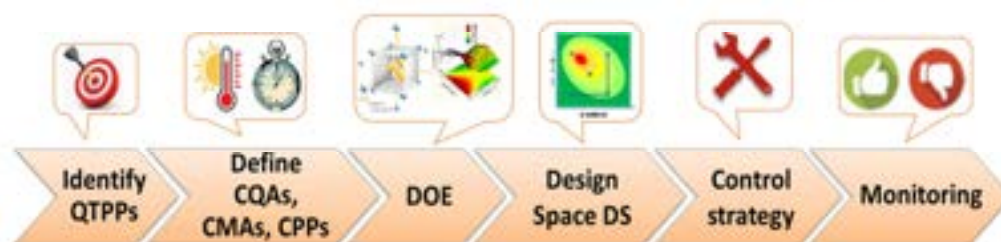
As defined by ICH Q8 [9], QbD is a systematic drug development approach based on predefined goals, an understanding of the product and processes, and sound science and quality risk management.

In recent decades, research related to nanosystems has started a technological revolution in medicines, especially in RNA delivery. Some researchers apply QbD in the development of drug RNA-LNP systems [13–29].

This review summarized the QbD concepts and applications to the development of pharmaceutical products containing RNA-LNPs. The second section describes the concepts of QbD, pharmaceutical QbD implementation, risk assessment, design of experiment (DoE), and process analytical technology (PAT). Afterward, the use of the QbD and DOE approach in the development of lipid nanoparticles is shown through examples of works published in the last 10 years.

## 2. Quality by Design Concept

Generally, the steps for implementing QbD in the development of pharmaceutical products are similar and include (Figure 1) the use of risk assessment to identify risk parameters, defining the main quality target product profile (QTPP), identifying parameters that influence the process performance, carrying out a DOE and definition of dependency of critical quality attributes (CQAs) to critical material attributes (CMAs) and critical process parameters (CPPs), defining a process design space that originates a final product with the desired QTPP, developing a risk control strategy to identify the causes of variability, and continuous monitoring and improving the manufacturing process [2–4,8,9,30].



**Figure 1.** Scheme of quality by design for a development pharmaceutical product.

### 2.1. Quality Target Product Profile (QTPP)

A quality target product profile (QTPP) consists of quantitative support for clinical safety and efficiency, and it makes a foundation to design and optimize a formulation or manufacturing process. The QTPP is a set of the attributes and characteristics of a product that determine its quality. According to the FDA, the QTPP is more focused on the chemical, manufacturing, and control stages of development [7,9].

The QTPP defines the quantitative characteristic of the drug and refers to specifications such as the dosage form, application way, packing, appearance, and diagnosis. Examples of QTPP are clinical use, administration route, therapeutic dosage, pharmaceutical dosage form, drug delivery system, packing container, factors affecting pharmacokinetic parameters, and quality criteria of the final product, such as stability during storage, sterility, and drug release. The QTPP only includes the product properties related to the patient. QTPP served as a guide for the optimization of formulation and process parameters to ensure that CQAs were within the desired range [1–4,8,30].

### 2.2. Critical Quality Attributes (CQA)

CQAs are physical, chemical, biological, or microbiological attributes/characteristics that should be controlled to ensure product quality [9]. CQAs are parameters that affect QTPP and are critical to product quality. These are generally related to the selection of correct amounts of excipients and drugs [1–4,8,30].

### 2.3. Critical Process Parameters (CPP)

CPPs are production parameters that affect CQAs and should be controlled. For example, parameters that interfere with the quality of the final product should be monitored during the production process. A parameter represents a measured or calculated characteristic of a system or process. These are parameters of the manufacturing system and are usually properties of materials or processes that affect production, such as temperature and composition.

### 2.4. Critical Material Attributes (CMAs)

CMAs are properties of materials that must reach adequate limits to guarantee the quality of excipients, drugs, and other materials used during the process.

It is important to understand the difference between CQAs (output data) and CMAs (input data) during development. For example, CQAs of an intermediate may become CMAs of an intermediate in the next production step. Moreover, based on the QbD approach, CMAs and CPPs may differ in the defined design space without significantly interfering with CQAs. Additionally, following the ICH guideline “Quality Risk Management” (ICH Q9), the identification of possible causes of process variability and effective risk analysis is of key importance during process optimization. This procedure can be performed in the initial or final steps, repeating or redefining it as needed. Thus, the quality of the final product is verified by the previous experience in the determination of CQAs, CPPs, and risk assessment [8,10,31].

### 2.5. Risk Assessment

Risk assessment is used to identify what can go wrong, the likelihood of it going wrong, and the consequences. According to ICH Q9, risk control is related to procedures that should be adopted to reduce risks [10]. This guidance provides examples of commonly used risk management tools. At this stage, it is necessary to decide which risks can be accepted and which should be minimized. Analysis of variance (ANOVA) or multiple regression analysis is used for risk assessment based on experimental data. A mathematical equation for the relationship between variables can be derived using multiple regression analysis. While using ANOVA, the statistical significance of the influence of each factor and interaction effects is assessed [31]. In the final stage, the results should be monitored using a risk assessment, taking into account previous knowledge and experience. Identifying QTPP, CQA, and CPP requires prior experience and knowledge as various risk assessment tools are used, including risk filtering, Ishikawa diagram, and failure mode and effects analysis [4,10].

### 2.6. Design Space (DS)

The design space (DS) has an important place in the pharmaceutical industry. The design space defines the multivariate functional relationships between CQA and CPP and includes their relationships. These relationships can be found by applying risk assessment, design of experiments (DOE), and modeling.

The design space is specific to a unit operation or a single manufacturing process and defines operating process parameters (such as moisture ratio) that are known to affect product quality. DS can also be considered as a link between CQA and CPP [32]. It is a way to show the development of understanding of a process, and the benefits of creating a design space are obvious. However, one of the challenges for using DS effectively is the cost of creating it. The most important point in developing the design space is to demonstrate or determine that the unclassified parameters excluded from the DOE are non-critical process parameters and, therefore, do not interact. Therefore, DOE screening can be used to identify interactions between process parameters. In the absence of interaction, single-variable intervals can be directly added to the design space as non-critical parameters.

### 2.7. Control Strategy

A control strategy is a very important step to secure the process performance and product quality. It should be carefully planned based on product and process information [11]. In the QbD approach, a control strategy is performed during product development and allows a deeper understanding of the product and process. Control strategy options with QbD are easier for areas requiring more time and specialty knowledge by delivering more information than the standard approach. In this novelty approach to pharmaceutical quality, the finished product quality is built by identifying and controlling an optimal range of formulation and manufacturing variables. Finished products are finally tested to confirm the product quality [33].

The development of an effective control strategy should be risk-based to ensure that product quality requirements are met. The development of the control strategy starts with the QTPP. The first studies are focused on the characterization of the active ingredient and important physical, chemical, biological, and microbiological properties of the formulation. The development of the process is also defined in this phase. For example, if the active ingredient has low solubility in water, the immediate-release tablet form must ensure sufficient dissolution of the drug. Toxicity studies performed during the early stages provide a baseline assessment of the impurity profile of the active ingredient. Understanding impurity generation and removal, at which stages elements of the control strategy will take place, and the development of acceptance criteria and methods to be included in the specifications will provide an important point of view. Although a control strategy should be developed using these steps, it can also be developed using the quality risk management principles defined in ICH Q9 [10,33].

During production, the continuous control strategy enables understanding and stabilization of the process. It is very important to modify the pharmaceutical quality system for supporting to the use of a QbD approach in the control strategy. In the commercial manufacturing process, it should be made possible to update, modify, or continuously improve the control strategy. When product information, documents, and operating procedures must be changed, the pharmaceutical quality system should provide the appropriate technical and administrative audits required to obtain the necessary reviews and approvals [33].

### 3. QbD and DOE in the Development of the RNA-LNP System

QbD implementation in the development of pharmaceutical products containing RNA-LNPs is closely connected to the structure (Figure 2) and the main therapeutic goal of the nanosystem.

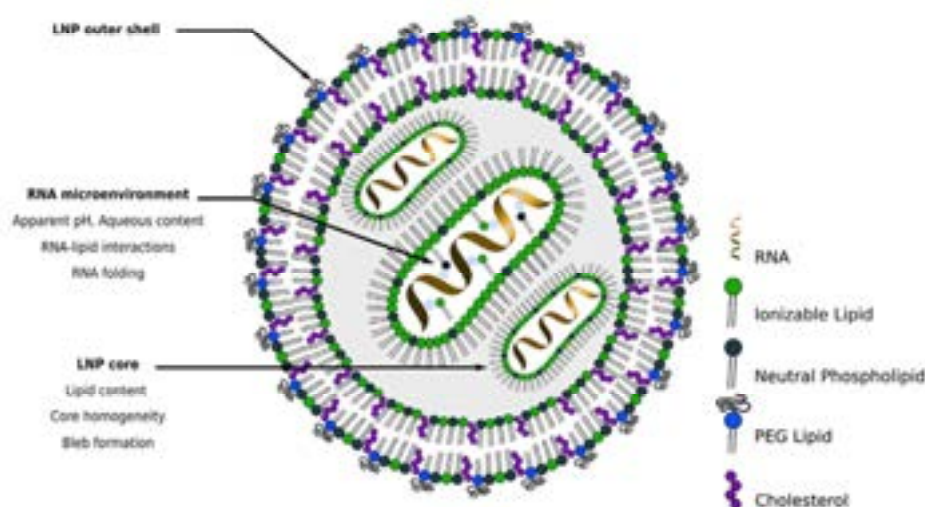


Figure 2. Scheme of the hypothetical structure of an RNA-LNP system (adapted from [13]).

The definition of the main steps of the QbD approach is similar to different published research (see Table 1) and includes generally the following parameters [14]:

- QTPP: safety and efficacy.
- CQAs: z-average, PDI, zeta potential, encapsulation efficiency, loading efficiency, stability, shelf life, storage conditions, and lipids contents.
- CMAs: N/P ratio, lipids type, non-toxicity, biodegradability.
- Critical process parameters (CPPs): temperature, microfluidics, filtration.

In the DOE, a wide range of different statistical approaches and modeling methods were used.

The following table shows examples of recent studies using the QbD and/or DOE approach to optimize formulations containing RNA-LNPs (Table 1). Particular information about optimized variables and their tested range applied in the DOE approach was described in Section DOE Approach—Design Models, Variables, and Range. More detailed results of these papers are shown in Supplementary Materials (Table S1).

#### *DOE Approach—Design Models, Variables, and Range*

In the first paper listed in Table 1, Cun J. et al. [34] applied  $2^{(5-1)}$  fractional factorial design (FFD)—five input variables with a center point (each on the three levels): inner water phase and the oil phase volume ratio (0.1; 0.3; 0.5), poly(DL-lactide-glycolide acid) (PLGA) concentration (20.0; 40.0; 60.0 mg/mL), sonication time for the primary emulsification (30.0; 60.0; 90.0 s), siRNA load (35.9; 62.8; 89.7  $\mu$ g), acetylated bovine serum albumin (Ac-BSA) content in the inner water phase (0.0; 200; 400 mg). Optimized variables were encapsulation efficiency (%EE) of the siRNA, obtained in the range of 2.01% to 51.18%, and particle size in the range of 218.3 nm (standard deviation, SD ( $n = 3$ ) = 0.7 nm) to 257.9 nm (SD = 2.7 nm). Optimal values of significant input parameters are volume ratio 0.46, PLGA concentration 40.7 mg/mL, siRNA load 39  $\mu$ g, acetylated bovine serum albumin (Ac-BSA) content in the inner water phase 400  $\mu$ g for low siRNA load (770 ng/mg nanoparticles, SD = 33 ng/mg nanoparticles), volume ratio 0.40, PLGA concentration 42.4 mg/mL, siRNA load 90  $\mu$ g, acetylated bovine serum albumin (Ac-BSA) content in the inner water phase 400  $\mu$ g for high siRNA load (2192 ng/mg nanoparticles, SD = 115 ng/mg nanoparticles). The optimal values of %EE were equal to 64.35% (SD = 2.78%) for low siRNA load and 70.63% (SD = 5.75%) for high siRNA load. The optimal average particle size was equal to about 260 nm both for low and high siRNA load. The zeta potentials, additionally measured, were all negative in the range of  $-45.5$  mV to  $-37.5$  mV.

Chen D. et al. [35] optimized siRNA-LNP in terms of the structure of used cationic lipids. The matrix of 70 different compounds of cationic lipids was tested—5 different hydrocarbon chain lengths (C8–C14) and 14 different amine headgroups. Optimized output parameters were: hydrodynamic diameter of particles (obtained in the range of 50 to 130 nm), total siRNA concentration, the percentage of particle-entrapped siRNA and luciferase silencing in vitro, and factor VII silencing in vivo (C57BL/6 mice). The lipids composition of LNPs was 2.0 mg/mL of cationic lipid, 0.28 mg/mL of DSPC, 0.52 mg/mL of cholesterol, and 0.13 mg/mL of mPEG2000-DMG. The concentration of polynucleotide was 0.4 mg/mL in 10 mM citrate buffer, pH 3.0. The dose of LNPs for in vivo factor VII delivery was 1.0 mg/kg (siRNA/body weight), and volume injection was less than 200  $\mu$ L into the animal. Two main dependencies were identified from the LNPs test: siRNA delivery efficiencies in vitro and in vivo for different amine headgroups are a function of the hydrocarbon chain length, the potency of in vitro did not change significantly with hydrocarbon chain length, the in vivo potency of LNPs decreased with increasing hydrophobicity of the cationic lipids. In addition, based on this optimized approach, seven novel materials with in vivo gene silencing potencies of >90% at a dose of 1.0 mg/kg in mice were discovered.

**Table 1.** Optimization of RNA-LNP system information about optimizing variables and the tested range was described in the Section DOE Approach—Design Models, Variables, and Range.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[34]	siRNA-loaded PLGA poly(DL-lactide-glycolide acid) without cationic excipients prepared by the double emulsion solvent evaporation method	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>2^{5-1}</math> fractional factorial design (FFD) with centre point</li> </ul>
[35]	siRNA-containing lipid nanoparticles (LNPs) prepared by microfluidic method	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High-throughput synthesis and screening</li> <li>• Correlation analysis of the structure–function relationships</li> </ul>
[36]	mRNA TT (N1,N3,N5-tris(2-aminoethyl)benzene-1,3,5-tri-carboxamide) lipid-like nanoparticles (TT-LLNs)	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Design of N1,N3,N5-(TT) derivatives</li> <li>• Correlations analysis</li> <li>• Orthogonal experimental design L16(44)</li> </ul>
[37]	Erythropoietin(EPO)-mRNA-loaded C12-200 lipid nanoparticles	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Library A: Definitive screening design (economical design of experiment), factorial design (14 experiments)</li> <li>• Library B: Taguchi fractional factorial screening design (18 experiments)</li> <li>• Standard least squares linear regression model, ANOVA, posthoc Tukey test to verify phospholipid effect, Student's <i>t</i>-test</li> <li>• Library C: Maximizing lipid:mRNA weight ratio with DOPE (6 experiments)</li> </ul>
[15]	siRNA-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPNs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attributes (CQAs): <ul style="list-style-type: none"> <li>- hydrodynamic size</li> <li>- zeta potential</li> <li>- siRNA encapsulation/loading</li> <li>- in vitro gene silencing</li> <li>- cell viability</li> </ul> </li> <li>• Quality target product profile (QTPP) of optimized LPNs: <ul style="list-style-type: none"> <li>- z-average &lt; 250 nm</li> <li>- polydispersity index (PDI) &lt; 0.3</li> <li>- zeta potential &gt; 0 mV</li> <li>- encapsulation efficiency &gt; 60%</li> <li>- siRNA loading efficiency &gt; 5 µg/mg</li> <li>- transfection efficiency (IC50) &lt; 5 nM</li> <li>- cell cytotoxicity (IC50) &gt; 50 nM</li> </ul> </li> <li>• OOS (optimal operating space)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The initial experiments: one factor at a time to identify criticality influencing the overall quality attributes of the LPNs</li> <li>• 32 factorial designs with eight augmented points (17 experiments)</li> <li>• Quadratic model and 1-optimal model</li> <li>• The response surface methodology (RSM)—OOS (optimal operating space) identification</li> </ul>

Table 1. Contd.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[16]	LPNs composed of cationic lipidoid 5 (L5) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or delivery of an ASO mediating splice correction of a luciferase gene transcript (Luc-ASO)	<ul style="list-style-type: none"> <li>The quality target product profile (QTPP): safety and efficacy</li> <li>Critical quality attributes (CQAs):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>z-average</li> <li>PDI</li> <li>zeta potential</li> <li>Luc-ASO encapsulation efficiency</li> <li>Luc-ASO loading</li> <li>in vitro splice-correction efficiency</li> <li>in vitro cell viability.</li> </ul> </li> <li>Z-average &lt; 250 nm is optimal for intracellular delivery: rapid cellular internalization with sustained release</li> <li>PDI &lt; 0.3: narrow particle size distribution and colloidal stability</li> <li>Zeta potential of the LPNs &lt; 30 mV: minimized cellular toxicity</li> <li>Encapsulation efficiency &gt; 70%: reduced cost of goods (pharmacoeconomic consideration)</li> <li>Loading of Luc-ASO &gt; 6 µg/mg: reduced effective particle dose</li> <li>The slope for splice correction was set to &gt;0.01: reduced effective ASO dose and/or improved therapeutic efficacy</li> <li>Luc-ASO IC50 value &gt; 150 nM: reduced effective ASO dose and/or improved therapeutic efficacy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Critical formulation variables and their levels were identified in one-factor-at-a-time (OFAT) experiments</li> <li>Multilevel factorial design (25 experiments), three levels of two critical independent variables</li> <li>Statistical analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Quadratic and an I-optimal model</li> <li>The obtained responses were subjected to model fitting using analysis of variance (ANOVA), and the best model fit was selected based on statistical parameters</li> <li>The statistical data treatment was performed using the Design Expert software (version 11, statease, Mirmeapolis, MN, USA)</li> <li>The data were further treated numerically and graphically to generate desirability and overlay plots, respectively</li> <li>Five formulations were selected from the resulting design space, and they were prepared and characterized for validation purposes</li> </ul> </li> </ul>
[38]	saRNA lipid nanoparticles in human skin explants	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>Design of Experiment and Statistical Analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Full factorial design</li> <li>Jmp, version 13.0,</li> <li>Standard least-squares for effect screening with the model effects designated as first- and second-order effects only</li> <li>Nonsignificant effects were excluded from the model</li> </ul> </li> <li>Graphs prepared in GraphPad Prism software, version 7.0.</li> <li>Flow cytometry statistical analysis performed in Prism software, using a two-tailed <i>t</i>-test with <math>\alpha = 0.05</math>, which was used to indicate significance</li> </ul>

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[39]	Liver-targeted mRNA-loaded LNPs prepared with pH-sensitive cationic lipids that had been previously designed for siRNA delivery	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DOE with multiple responses</li> <li>• Library A (18 formulations): <math>3^4 \times 2^2</math> definitive screening design (DSD)</li> <li>• Library B (18 formulations): <math>3^4 \times 2^1</math> L18-Taguchi fractional factorial design (FFD)</li> <li>• Characterization of the optimized mRNA-loaded LNPs</li> <li>• Statistical analysis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Least squares linear regression model was applied to each response</li> <li>- Effective design-based model selection for DSD or the forward stepwise regression method with Akaike's information criterion and finite correction (c-AIC) was applied to each response (where the number of both statistically significant main factors and interactions between 2 factors were less than 3).</li> <li>- Comparisons between the means of two variables, unpaired Student's <i>t</i>-tests were used, one-way ANOVA with the Student–Newman–Keuls post hoc test was used for comparisons between multiple groups</li> </ul> </li> <li>• DOE</li> <li>• Was analyzed using the JMP 14 software (SAS, Cary, NC, USA)</li> <li>• Statistical significance was defined as <i>p</i>-values less than 0.05.</li> <li>• Tree mice per formulation were used for the DOE</li> <li>• Graphs prepared in GraphPad Prism software, version 7.0.</li> </ul>

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[17]	Intracellular delivery of therapeutic anti-inflammatory TNF- $\alpha$ siRNA loaded LNPs to activated macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>The quality target product profile (QTPP):               <ul style="list-style-type: none"> <li>Efficient and safe</li> <li>Gene silencing mediated by TNF-<math>\alpha</math> siRNA-loaded LPNs in vitro in the murine macrophage cell line RAW264.7</li> <li>Loading a higher dose of siRNA in the LPNs does not correlate with higher gene silencing in vitro</li> </ul> </li> <li>Critical quality attributes (CQAs):               <ul style="list-style-type: none"> <li>Z-average (maximal uptake by macrophages): &lt;200 nm</li> <li>PDI (predictable particle behavior): &lt;0.200</li> <li>(a) Zeta potential (enhanced interaction with macrophages): &gt;0.0 mV</li> <li>Encapsulation efficiency (pharmacoeconomic consideration): &gt;60.0%</li> <li>Loading efficiency (reduced effective dose of siRNA and delivery system): &gt;6.0 <math>\mu</math>g/mg LPNs</li> <li>Gene silencing efficiency (IC50): &lt;20.0 nM</li> <li>Cell viability: &gt;200 nM</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Formulation design space: 1-optimal design, three independent formulation batches, and three technical replicates (<math>N = 3</math> and <math>n = 3</math>)</li> <li>Statistical Analysis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Data were analyzed using GraphPad Prism Software version 8</li> <li>Results presented as mean values <math>\pm</math> standard deviation (SD)</li> <li>Statistically significant differences were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc multiple comparison test</li> <li>p-value <math>\leq 0.05</math> was considered statistically significant</li> </ul> </li> </ul>
[18]	Lipid-like nanoparticles (O-LLNs) containing three new cholesterol derivatives to achieve the liver-targeting delivery of mRNA. The O-LLNs outperformed DLin-MC3-DMA (MC3) in the functional delivery of Cre-recombinase (Cre) and human erythropoietin (hEPO) mRNA. Delivery of cytidine base editor mRNA (CBE mRNA) and sgRNA by O-LLNs in a liver-related metabolism disorder, phenylketonuria (PKU).	<p>QbD not applied</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>LLNs characterization:               <ul style="list-style-type: none"> <li>mRNA loaded into the hydrophilic core with a G0-C14 (ionizable lipid)-to-mRNA mass ratio of 7.5/1.</li> <li>Particle size: from 125 to 137 nm</li> <li>Polydispersity index (PDI) &lt; 0.3</li> <li>Zeta potential from 33 to 45 mV</li> <li>The encapsulation efficiency is about 70%</li> <li>30 <math>\mu</math>g of Luc mRNA</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimization of LLNs on the expression of luciferase mRNA in livers</li> <li>CCD (central composite design) Model (20 experiments):               <ul style="list-style-type: none"> <li>Multi-factor five-level experimental design, which is formed by adding extreme points and center points based on a two-level factorial design</li> </ul> </li> <li>Statistical Analysis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Expert Design software (DOE)</li> <li>Graph pad Prism 7.0.</li> <li>Second-order polynomial model</li> <li>All values were expressed as mean <math>\pm</math> S.D, unless otherwise noted</li> <li>Data from more than two groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), and multiple comparisons were performed by Tukey's post-hoc test when determined significant</li> <li>p-values less than 0.05 were considered statistically significant</li> </ul> </li> </ul>



Table 1. Contd.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[19]	Rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The quality target product profile (QTPP):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Product safety and efficacy</li> </ul> </li> <li>• Critical quality attributes (CQAs):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rank and identify CQAs of the mRNA and siRNA vaccine based on their impact and uncertainty scores for both product safety and efficacy</li> <li>- RNA yield,</li> <li>- Sequence integrity,</li> <li>- Sequence identity</li> <li>- 5' capping efficiency</li> </ul> </li> <li>• Critical process parameters (CPPs)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperature</li> <li>- Reaction time</li> <li>- pH in transcription reactor</li> <li>- DNA template sequence</li> <li>- DNA template concentration</li> <li>- T7RNAP concentration</li> <li>- 5' cap analogue concentration</li> <li>- Total Mg concentration</li> <li>- DTT concentration</li> <li>- Spermidine concentration</li> <li>- GTP concentration</li> <li>- Total NTP concentration</li> <li>- Ratio of NTPs</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioprocess model/development:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- The model parameters were then fitted to a subset of 51 experimental samples from a statistical DoE dataset obtained from lab-scale siRNA synthesis experiments using wild-type NTPs</li> </ul> </li> <li>• Statistical analysis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- MODDE®/statistical Design of Experiments software</li> <li>- Two separate models were fitted using MLR, one using the four factors as linear predictors and one that also included square terms in the Mg and NTP concentrations as well as an interaction term consisting of the product of Mg and NTP concentrations</li> </ul> </li> </ul>
[20]	LNPs loaded with antisense oligonucleotides (ASOs) formulated by an automated solvent-injection method using a robotic liquid handler (e.g., Duchenne muscular dystrophy)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attributes (CQAs):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Particle structure</li> <li>- Size distribution</li> <li>- Physicochemical properties of the particle surface</li> <li>- Lipid content</li> <li>- Amount of the free API and encapsulation efficiency</li> <li>- Physical and chemical stability</li> </ul> </li> <li>• Critical process parameters (CPPs)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Microfluidic manufacturing of LNP formulations: total flow rates and flow rate ratios are critical to producing small and homogeneous particles</li> <li>- While different N/P ratios and buffers determine LNP formation mechanisms and their different particle structures</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimization of the phase mixing process using a robotic TECAN liquid handler</li> <li>• HTS workflow for ASO-loaded LNP formulations (96 samples, <math>n = 3</math>)</li> <li>• Validation of HTS results with scale-up LNP preparation—comparing results from the HTS approach with those from a microfluidic formulator</li> <li>• Statistical Analysis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- All results are presented as mean <math>\pm</math> SD, <math>n = 3</math></li> <li>- Data were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's, Sidak's, or Dunnett's post-tests for comparison of multiple groups</li> <li>- GraphPad Software (Prism 8.0)</li> <li>- <math>p</math>-values less than 0.05 were considered statistically significant</li> </ul> </li> </ul>

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[40]	LNP-siRNA systems as a promising approach for silencing disease-causing genes in hepatocytes following intravenous administration	Not applied	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DOE approach:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- The three-factor Box-Behnken design, three levels: low, center, and high, and three center samples were included in this design as a source for error estimation (15 preparation)</li> <li>- Quadratic model</li> </ul> </li> <li>• The relationship between the preparation parameters and the properties was evaluated for LNPs with and without siRNA by performing the same procedure for empty LNPs</li> <li>• Statistical analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- All values were indicated as mean <math>\pm</math> standard deviation. Statistical comparisons between two conditions were performed using paired Student's <i>t</i>-test. Values of <math>p &lt; 0.05</math> were considered to indicate statistical significance</li> <li>- The experimental data were analyzed with the statistical software JMP 13 (SAS Institute)</li> </ul> </li> </ul>
[21]	mRNA-LNP compositions to achieve high-magnitude tumor-specific CD8 T cell antitumor immunotherapy by engaging splenic immune cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attributes (CQAs):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD8T cell response, determined as %E7-specific T cells in blood of mice after three immunizations &gt; 50%</li> </ul> </li> <li>• Critical material attributes (CMAs):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ionizable lipid content: 36–65%</li> <li>- PEG-lipid content: 0.5–2%</li> <li>- DOPE content: 5–15%</li> <li>- Cholesterol content: fill molar proportion up to 100%</li> </ul> </li> <li>• Design space (DS)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- NOR (normal operating region): probability to respect the specification of at least 50% E7-specific T cells greater than 90%</li> <li>- PAR (proven acceptance region): probability to respect the specification between 70% and 90%</li> <li>- OOS (out of specification): probability lower than 70% to respect the specification</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A Roquemore's hybrid design was used to select the formulations to be tested                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 11 different experimental conditions</li> <li>- Each condition was applied in triplicate (3 mice/treatment)</li> <li>- Each lipid's molar percentage takes five values</li> <li>- Experimental protocol was carried out for three different choices of PEG-lipid</li> </ul> </li> <li>• Statistical Analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quadratic response surface model</li> <li>- The Hamiltonian Monte Carlo (HMC) algorithm (a generalization of the Metropolis algorithm, a family of Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithms) was used to compute the posterior distributions of the model parameters. Simulations from the HMC are determined by Bayes' rule, in which the posterior distribution of the parameters is proportional to the prior distribution of the parameters multiplied by the likelihood.</li> <li>- The posterior predictive check (PPC) is a Bayesian technique to assess the appropriateness of the model to fit data</li> <li>- Sensitivity indices of the %E7-specific T cells for the three lipid proportions were computed based on a Monte Carlo estimation of the Sobol's indices</li> <li>- GraphPad Prism software 8.0 and 9.0 were used for the statistical analyses indicated in figure legends</li> <li>- Significant differences are indicated as <math>p &lt; 0.05</math>.</li> </ul> </li> </ul>

Table 1. Contd.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[22]	Lipid nanoparticle (LNP) formulations for vivo gene delivery systems	<ul style="list-style-type: none"> <li>Summarizes a quality by design (QbD) styled approach to the optimization of lipid nanoparticle (LNP) formulations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Self-validated ensemble model (SSEM) (23 runs, LNP batches): Statistical Analysis:</li> <li>Self-validated ensemble model (SSEM)—has greatly improved the approach to analyzing results from mixture-process experiments</li> <li>JMP Pro 17.1 with SSEM, along with the graphical summary tools</li> </ul>
[23]	Process Automation and Control Strategy by QbD in Total Continuous mRNA Manufacturing Platforms (mRNA)-based vaccines	<ul style="list-style-type: none"> <li>Process analytical technology (PAT) and process control strategies</li> <li>Critical process/product parameters (CPPs): <ul style="list-style-type: none"> <li>In vitro Transcription: space-time yield (STY) of capped mRNA</li> <li>Inline Diafiltration by SPTFF (single-pass tangential flow filtration): pressure drop, fouling, low concentration-factor</li> <li>LNP formation: efficacy/bioavailability</li> </ul> </li> <li>Risk assessment and impact ranking—critical quality attributes (CQAs) defined <ul style="list-style-type: none"> <li>Fish Bone/Ishikawa diagram/one factor at a time (OFAT)</li> <li>In vitro Transcription: NTP concentration, cap analog concentration, temperature, pH, variation flow, length to diameter</li> <li>Inline diafiltration by SPTFF: variation of flow feed, viscosity, fiber diameter, fiber length, fiber count, Run, TMB, variation flow EB</li> <li>LNP formation: mRNA conc, mRNA Feed pH, lipid:mRNA weight ratio, w% ionizable lipid, w/w ionizable/PEG-Lipid, w/w ionizable/help Lipid, w/w ionizable/Cholesterol, volume flow rate, v/v aq/EOH, diafiltration volumes</li> </ul> </li> <li>Multivariate studies and design space characterization—based on DOE studies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>DOE approach, Statistical Analysis <ul style="list-style-type: none"> <li>Full-factorial design</li> <li>Ordinary least squares (OLS) regression</li> <li>Partial least squares (PLS) regression</li> <li>Neural network (NN) regression</li> </ul> </li> </ul>

Table 1. Contd.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Process Control Strategies           <ul style="list-style-type: none"> <li>- In vitro transcription: pH—decrease due to reaction +0.1/−1, temperature—ambient temperature change ±0.5 °C, mass flow—deviating pump speed ±5%, master mix—deviating concentration(s) ±10%, inline diafiltration by SPTFF: mRNA—deviating concentration ±10%, flow rate EB—deviating pump speed ±5%, permeate flux decrease due to fouling ±10%.</li> <li>- LNP formation: mRNA—deviating concentration ±10%, pH aq. buffer—deviating value ±0.2, lipids—deviating concentration(s) ±5%, flow rate—deviating pump speed ±5%, Dv—deviating pump speed ±5%, permeate flux—decrease due to fouling ±10%</li> </ul> </li> </ul>	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Quality Target Product Profile (QTPP) of Nonviral Vectors           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Efficacy and safety</li> <li>- Administration route: intravenous—to improve the efficacy and bioavailability; direct availability in the bloodstream</li> <li>- Dosage form: injection—low volume production allows customization to client/quantities</li> <li>- Delivery system element: nonviral vector—provides safer and more effective delivery of the genetic material</li> <li>- Ph: 7.35–7.45—to prevent or reduce vascular complications</li> <li>- Osmolarity: 280–310 mOsm/l—to ensure tolerability</li> <li>- Particle size: below 200 nm—to ensure penetration in the cell</li> <li>- Homogeneity: monodisperse—to ensure the system's homogeneity</li> <li>- Enhanced therapeutic activity: high transfection efficiency (over 80%)—to improve the system's effectiveness</li> <li>- Storage condition −60°</li> <li>- C ± 20 °C—to guarantee the stability of the genetic material</li> <li>- Improved safety: lack of cytotoxicity, lack of hemolytic activity—to ensure appropriate biological requirements</li> <li>- Microbiological quality: sterile and pyrogen free—to avoid contamination with microorganisms; to ensure patient safety</li> <li>- In vitro release: prolonged release—to ensure release according to a predefined release pattern or to ensure spatiotemporal release of the payload</li> </ul> </li> </ul>	
[24]	miRNA nonviral vectors for genetic material delivery in cancer therapy		The DOE's advantages are providing better results with a minimum number of experiments and evaluating CMAs and CTPs to obtain a product meeting the QTPP

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attributes (CQAs) for nonviral vector           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Particle size: 100–400 nm—internalization in tumor cells</li> <li>- Polydispersity index (PDI): 0.1–0.5—narrow size distribution, homogeneity of the nanosystem in terms of size</li> <li>- Zeta potential (ZP): 5–30 mV—formation of electrostatic bonds between the vector and the cell environment</li> <li>- Surface modifications: hyaluronic acid, transferrin, PEG—decreased opsonization and phagocytosis, prolonged circulation</li> <li>- Cytotoxicity: High IC50—to ensure nanosystem safety</li> <li>- Cellular uptake: efficient cellular uptake—to ensure penetration in the cell</li> <li>- Transfection efficiency: over 80%—to ensure the desired biological effect</li> </ul> </li> <li>• Critical process parameters (CPPs) of nanoparticles for genetic material delivery.           <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stirring speed and time, Polyelectrolyte concentration—gold nanoparticles, layer-by-layer</li> <li>- Stirring speed and time, ultracentrifugation speed—gold nanoparticles, laser ablation in liquid</li> <li>- Incubation time, temperature—liposomes, film dispersion method</li> <li>- Evaporation time, pressure and temperature, hydration time and temperature—liposomes, thin film hydration method</li> <li>- Injection rate—liposomes, ethanol injection method</li> <li>- Mixing speed and temperature—polymeric nanoparticles, o/w single emulsion method</li> <li>- Sonication time and amplitude, stirring time and temperature—polymeric nanoparticles, double-emulsion method</li> <li>- Sonication time, agitation time, temperature, and speed—SLN (solid lipid nanoparticle), solvent diffusion method</li> <li>- Sonication time—SLN, film-ultrasonic method</li> </ul> </li> </ul>	

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[25]	LNPs that enable high levels of mRNA delivery to trophoblasts in vitro and to the placenta in vivo with no toxicity to treat placental dysfunction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical material attributes (CMAs)—physical, chemical, biological, or microbiological properties that must comply to ensure the desired CQAs</li> <li>- The materials used for genetic material delivery should be suitable for interaction with the human body, and their most important feature is their biodegradability</li> <li>- Phospholipid type</li> <li>- Number of hydrophobic carbon atoms in the lipid tail</li> <li>- Genetic material: lipids ratio or genetic material: nanoparticle ratio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Design of experiments (DOE)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Factorial design study</li> <li>- Definitive screening design (DSD) was used to create a mini-library of 18 chemically unique LNPs (A1–A18)</li> <li>- Combination of three-level continuous and two-level categorical factors to identify linear and quadratic effects</li> </ul> </li> <li>• Statistical analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- JMP Pro 16 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) software</li> <li>- GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, USA) software</li> <li>- <i>p</i>-value statistically significant level 0.05</li> <li>- After active effects are identified in the combined model parameter estimates</li> <li>- Standard least squares fit is applied to obtain the significant effects in the fit model</li> <li>- All experiments have <i>n</i> = 3 replicates unless otherwise indicated</li> <li>- Continuous features were assessed for normality using D'Agostino–Pearson omnibus (K2), Anderson–Darling (A2), Shapiro–Wilk (W), and/or Kolmogorov–Smirnov (distance)</li> <li>- Results are represented as mean with standard error of the mean (SEM), and statistical significance was determined at 0.05.</li> </ul> </li> </ul>
[26]	Pharmaceutical-grade wide-range LNPs for RNA-vaccine/drug delivery	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attribute (CQA):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Size and size distribution of particles</li> <li>- Polydispersity index (PDI) ≤ 0.30</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Input variables:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Sonication time</li> </ul> </li> <li>• Output variables:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- LNP diameter</li> </ul> </li> </ul>

Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[27]	Lipid nanoparticles for saRNA expression and cellular activation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical quality attribute (CQA):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Particle size (Z-average diameter) between 80 and 100 nm</li> <li>- Polydispersity index (PDI) less than 0.2</li> <li>- Encapsulation efficiency (EE) at least 80%</li> <li>- Neutral zeta potential</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Iteration A—definitive screening design (DSD), 7 three-level, 2 two-level qualitative factors, 1 three-level qualitative factor (26 formulations):</li> <li>• Iteration B—Box–Behnken design (BBD); 3 three-level, 1 three-level qualitative factors (26 formulations)</li> <li>• Statistical analysis:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Duplicates were used in iteration A; triplicates were used for iteration B</li> <li>- Variance (ANOVA), linear regression, and Spearman’s correlation methods</li> <li>- Python: the sci-kit-learn module and statsmodel package were used, and the seaborn library was used for plotting</li> <li>- Model statistical significance was defined as <i>p</i>-values less than 0.05, and lack-of-fit was considered insignificant at a level of 0.1</li> <li>- For iteration B, response surface modeling was carried out using second-order ordinary least square (OLS) regression based on the sci-kit-learn module and statsmodel package</li> <li>- Box–Cox transformation of response variables did not strongly improve model accuracy</li> <li>- The optimization of simultaneous responses was realized by the desirability function</li> <li>- Optimal operating conditions were obtained using the scipy library and Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (BFGS) optimization algorithm</li> </ul> </li> <li>• JMP 13 software (SAS Institute)</li> </ul>

Table 1. Contd.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
[28]	LNPs delivery of different types of nucleic acids: siRNA, mRNA, and pDNA—Review	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quality Target Product Profile (QTPP):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intended clinical use</li> <li>- Administration route</li> <li>- Duration of activity</li> <li>- Pharmaceutical dosage form</li> <li>- Excipients</li> <li>- Dosage regimen</li> <li>- Safety/immunogenicity</li> <li>- Stability and storage</li> <li>- Efficacy</li> <li>- Presentation</li> </ul> </li> <li>• Critical quality attributes (CQAs):</li> <li>• Physicochemical properties:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Particle size, PDI, zeta potential</li> <li>- Loading efficiency</li> <li>- Stability in biological fluids</li> <li>- Shelf life and storage conditions</li> <li>- Release of cargo</li> </ul> </li> <li>• Activity in cell-based assays:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell viability &gt; 80%</li> <li>- Gene expression &lt;50% at nucleic acid concentrations &lt; 100 nM in serum-containing media</li> <li>- Less than 10% gene expression by scrambled nucleic acid at &lt;100 nM concentration in serum-containing media</li> </ul> </li> <li>• Activity in in vivo studies:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risk that an attribute impacts safety or efficacy (e.g., PK/PD, immunogenicity, bioactivity)</li> </ul> </li> <li>• Critical material attributes (CMAs):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Excipients, blends, and ratios</li> <li>- Non-toxicity</li> <li>- Biodegradability</li> </ul> </li> <li>• Critical process parameters (CPPs):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Temperature</li> <li>- Microfluidics</li> <li>- Lyophilization</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Not applied</li> </ul>



Table 1. Cont.

References	The Main Goal/Target/Delivery System	QbD Aspects	DOE/Mathematical Model/Statistical Analysis Tests and Software
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quality target product profile (QTPP):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Intended use</li> <li>- Dosage form and appearance</li> <li>- Route of administration</li> <li>- Stability</li> <li>- Physical attributes, purity, sterility, and water content</li> <li>- Business information about the targeted market</li> </ul> </li> <li>• Critical quality attribute (CQA):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Physical, chemical, or biological property</li> <li>- Characteristics that must be kept within an appropriate range to ensure the desired product quality defined in the QTPP, efficacy/safety, and quality</li> </ul> </li> <li>• Critical manufacturing attributes (CMA):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- The first category of input factors able to cause variability of CQA associated with the formulation parameters</li> </ul> </li> <li>• Critical process parameters (CPP):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- The second category of input variables</li> </ul> </li> <li>• Design Space:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identify the operating region of quality based on risk analysis</li> <li>- Graphical representation is used to determine the CPP values, allowing the quality requirements to be met with a controlled probability</li> <li>- Out of specification (OOS) region: the probabilities of meeting the technical requirements on CQA are too small</li> <li>- Proven acceptance region (PAR) probabilities of meeting requirements are acceptable</li> <li>- Normal operating region (NOR): a desired region where CQAs have a high degree of probability of complying with their quality specifications</li> <li>- Control operating region (COR)—subspace of NOR in which an automated control system has to maintain the operating point</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Design of experiments (DOE):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimulate in a minimum of tests CPP and CMA</li> <li>- The collection of measurements on the CQA during the experiments</li> <li>- Better understanding the cause-effect relationship between those variables to finally predict the risks of not complying with the efficacy/safety/quality specifications</li> </ul> </li> <li>• Modeling:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- The mathematical relationship between quality outcomes (CQA) and input factors (CMA and CPP)</li> <li>- Response surface equations, a class of polynomial models, are often used to describe the links between input and output variables</li> </ul> </li> <li>• Statistical analysis               <ul style="list-style-type: none"> <li>- D-optimal mixture design (36 formulations)</li> <li>- Design Expert Software</li> <li>- Bayesian estimation method</li> <li>- The posterior predictive check</li> </ul> </li> <li>• The leave-one-out cross-correlation</li> </ul>
[29]	Cationic nano-lipid for siRNA transfection		

In turn, Li et al. [36] carried out optimization of lipid-like nanoparticles (LLNs) composed with different derivatives of *N1,N3,N5*-tris(2-aminoethyl)benzene-1,3,5-tri carboxamide (TT) for mRNA delivery. In the first step, the correlation analysis was performed to choose the most optimal type of TT (seven different compounds were tested). The output variables were: particle size (obtained in the range of 99 nm (SD = 2 nm) to 178 nm (SD = 1 nm), polydispersity index (PDI < 0.2), zeta potential (all nanoparticles were positively charged), entrapment efficiency of mRNA (15–82%), delivery efficiency, and cytotoxicity of TT2-TT8 LLNs-FLuc mRNA in Hep3B cells. At a dose of 1.2 µg/mL of luciferase mRNA, LLNs with TT3 as components characterized statistically significantly higher expression of the firefly luciferase compared to other TT LLNs. A significant positive correlation was observed between transfection efficiency and entrapment efficiency. No significant correlation was noticed between transfection efficiency and particle size, surface charge, and cell viability. In the next steps, the content of other ingredients of TT3-LLNs was optimized. Two separate orthogonal experimental designs, L16(4<sup>4</sup>), were performed for different ranges of tested parameters. Four input variables on four levels were considered. The first design concerned the TT3 mole ratio (30; 40; 50; 60), dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) mole ratio (1.25; 2.5; 5.0; 10.0), cholesterol mole ratio (18.5; 28.5; 38.5; 48.5), DMG-PEG2000 mole ratio (0.75; 1.5; 3.0; 6.0), and for the second, the TT3 mole ratio (10; 20; 30; 40), DOPE mole ratio (10.0; 20.0; 30.0; 40.0), cholesterol (Chol) mole ratio (25; 30; 35; 40), DMG-PEG2000 mole ratio (0.0; 0.03; 0.15; 0.75). In both cases, the mRNA delivery efficiency expressed as a relative intensity of luminescence was used as an output variable. In the first optimization, the efficiency was obtained in the range of 20 to 4663, and in the second, obtained in the range of 1917 to 101,863, depending on the composition of TT3-LLNs. The optimal composition of the formulation was TT3/DOPE/Chol/DMG-PEG2000: 20/30/40/0, but the particle size of these LLNs, with a low ratio of DMG-PEG2000, increased dramatically 5 h after. Whereas for formulation TT3/DOPE/Chol/DMG-PEG2000: 20/30/40/0.75 were stable for a minimum of 2 weeks.

In the next paper, Kauffman et al. [37] carried out the optimization of the composition of LNPs Erythropoietin(EPO)-mRNA-loaded with C12-200. Six input variables were considered: C12-200:mRNA weight ratio, phospholipid type and phospholipid, C12-200, cholesterol, and PEG molar contents. The output variables were encapsulation efficiency (%EE), particle size, polydispersity index (PDI), and EPO serum concentration. In the first step, library A was built with a definitive screening design (14 experiments). The most optimal phospholipid type was chosen as a matrix of qualitative variables: tail group (DS, DO) and head group (PC, PE). Quantitative variables were on the three levels: C12-200:mRNA weight ratio (2.5; 5.0; 7.5), C12-200 %mol (40; 50; 60), phospholipid %mol (4; 10; 16), PEG %mol (0.5; 1.5; 2.5), and cholesterol %mol was added to 100% (21.5–55.50). DSPC and DOPE were selected for further optimization. Within library B, Taguchi fractional factorial screening design (18 experiments) was performed with the following input variables: C12-200:mRNA weight ratio (7.5, 10.0, 12.5), C12-200 %mol (30, 35, 40), phospholipid %mol (16, 22, 28), PEG %mol (2.5, 3.0), and cholesterol %mol (from 28.5 to 51.5). The DOPE phospholipid was selected as the most optimal. In the final step (library C, 6 experiments), the C12-200:mRNA weight ratio was optimized in the range of 5.0; 7.5; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0. The optimal composition of the formulation was 10:1 C12-200:mRNA weight ratio, 35% C12-200, 16% DOPE, 46.5% cholesterol, and 2.5% C14-PEG2000. The average efficacy with 15 µg total EPO mRNA injection in vivo was obtained at 7065 ± 513 ng/µL. The particle size of optimal LNP was 102 nm, PDI: 0.158, encapsulation efficiency: 43%, pKa: 6.9, and zeta potential: −5.0 mV.

Next, Thanki et al. [15] tested the lipidoids as the lipid component of siRNA-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPNs). They checked whether replacing the cationic lipids with lipidoids improved safety and was more efficacious (efficient gene silencing at lower doses). The initial experiments of one factor at a time were performed to identify criticality influencing the overall quality attributes of the LPNs: the lipidoid content and siRNA: lipidoid ratio. A 17-run design of an experiment with an I-optimal approach was performed

to systematically assess the effect of lipidoid content % (in the range of 10–20) and weight ratio of lipidoid:siRNA (from 10:1 to 20:1) on physicochemical properties (hydrodynamic size, zeta potential, and siRNA encapsulation/loading) and the biological performance (in vitro gene silencing and cell viability). The response surface methodology was applied to the identification of optimal operating space (OOS). The optimal lipidoid-modified LPNs showed more than 50 times higher in vitro gene silencing at well-tolerated doses and about twice the increase in siRNA loading than the LPNs with cationic lipid dioleoyltrimethylammonium propane (DOTAP). Another work by Thanki and co-authors [16] described the optimization of LPNs composition prepared of cationic lipidoid (L5) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or delivery of an antisense oligonucleotide (ASO) mediating splice correction of a luciferase gene transcript (Luc-ASO). Critical formulation variables and their levels were identified in one-factor-at-a-time (OFAT) experiments. Multilevel factorial design (25 experiments) was performed for critical, independent variables with three levels: L5 content (10–20% (*w/w*)), L5:Luc-ASO weight ratio (in the range of 10:1 to 30:1), and molecular weight of PLGA (10–50 kDa). The following output variables were considered: Z-average, PDI, zeta potential, encapsulation efficiency, loading, and biological responses (i.e., in vitro splice correction efficiency and cell viability). Quadratic and an I-optimal model were performed, and the obtained responses were subjected to model fitting using analysis of variance (ANOVA). The best model was selected on the basis of statistical analysis. The process validation was performed by preparing and testing the five formulations with composition within the design space (range of 14–17% (*w/w*) L5 content and L5:Luc-ASO ratios from 11:1 to 21:1).

In turn, Blakney et al. [38] presented the optimization of self-amplifying mRNA (saRNA) lipid nanoparticle composition in human skin explants. Full factorial design was performed for five input variables: complexing lipid type (C12-200 (ionizable), dimethyldioctadecylammonium bromide [(DDA), cationic], 1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane [(DOTAP), cationic] and cephalin (zwitterionic)), total lipid to RNA ratio (*w/w*) (1:1, 4:1, 18:1, 90:1), lipid concentration (high (7.5 mg/mL), medium, low), particle concentration (high  $10^9$ , medium  $10^8$ , low  $10^7$  particles/mL), and cationic lipid to zwitterionic lipid ratio (0.1:1, 1:1, 10:1). The luciferase expression in human skin explants after 10 days was the output variable. Cephalin lipid had the strongest effect. Cephalin LNPs with a ratio of total lipids to RNA of 18:1 (*w/w*), low lipid concentration, and medium particle concentration yielded a 7-fold increase in luciferase expression over the original formulation (with C12-200 lipid).

In the next paper, Hashiba et al. [39] described the optimization of liver-targeted mRNA-loaded LNPs prepared with pH-sensitive cationic lipids that had been previously designed for siRNA delivery. The first  $3^4 \times 2^2$  definitive screening design (DSD, 18 formulations) was performed (library A). The input variables were qualitative factors: cationic lipid (CL) type (CL4H6, CL15H6) and phospholipid (PL) type (DSPC, DOPE) and quantitative factors: mRNA: lipid ratio (18.3–36.7), mol% of CL (40–60), mol% of PL (5–25), and mol% of PEG-DMG (0.5–2.5). The second step, a  $3^4 \times 2^1$  Taguchi fractional factorial design (FFD, 18 formulations), was performed (Library B). The input variables were the qualitative factor phospholipid (PL) type (DSPC, ESM—egg sphingomyelin) and quantitative factors: mol% of CL (50–70), mol% of PL (5–15), and mol% of PEG-DMG (0.5–2.5). The cationic lipid (CL) type was fixed as a CL4H6, and the mRNA/lipid ratio was fixed as 18.3. Output variables were gene expression in the liver (Nluc expression was measured 24 h after the injection), physicochemical properties (LNP diameter and polydispersity index (PDI)), and liver-specificity (gene expression in off-target organs (spleen, lung, and kidney)). Detailed results are described in Supplementary Table S1.

The work of Lokras et al. [17] presented an approach to optimization of the intracellular delivery of therapeutic anti-inflammatory TNF- $\alpha$  siRNA-loaded LNPs to activated macrophages. The formulation design space was defined based on the I-optimal design for three independent formulation batches and three technical replicates. Input variables were L5 content (15; 20; 25% (*w/w*)) and L5:TNF- $\alpha$  siRNA weight ratio (5.0:1; 7.5:1; 10.0:1; 15.0:1).

Output variables were PDI, zeta potential (mV), encapsulation efficiency (%), TNF- $\alpha$  siRNA loading ( $\mu\text{g}$  siRNA/mg LPNs), and fold reduction in IC<sub>50</sub> value for TNF- $\alpha$  gene silencing. The optimal operating space was defined: L5 content of 15%, L5:TNF- $\alpha$  siRNA weight ratio of 13.5:1, and 25%, 15.0:1 respectively.

The next paper, published by Zheng et al. [18], deals with the optimization of lipid-like nanoparticles (LLNs) on the expression of luciferase mRNA in the liver containing three new cholesterol derivatives Chol-PEG400-self peptide (Chol-PEG400-SP), Chol-PEG400-Mannose (Chol-PEG400-Man), and Chol-PEG2000-W5R4K (Chol-PEG2000-WRK) to achieve the liver-targeting delivery of mRNA. The central composite design (CCD) model (20 experiments), a multi-factor, five-level experimental design, which is formed by adding extreme points and center points based on a two-level factorial design, was investigated. Input variables were the molar ratio of the Chol-PEG400-SP (from 1.0 to 7.5%), Chol-PEG400-Man (from 1.0 to 10.0%), and Chol-PEG2000-WRK (from 1.0 to 7.5%). The output variable was *in vivo* Luc expression of livers measured by the IVIS (Balb/c mice *i.v.* injection)—bioluminescence.

Van de Berg and co-authors [19], in turn, described the bioprocess model development of rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases. The model parameters were fitted to a subset of 51 experimental samples from a statistical DoE dataset obtained from lab-scale saRNA synthesis experiments using wild-type nucleotide triphosphate (NTP). Thirty-three samples correspond to the RNA yield at 0.04 M NTP and  $1 \times 10^{-8}$  M of T7 RNA Polymerase (T7RNAP) vs. 11 concentrations of Mg ranging from 0.025 to 0.125 M after 2, 4, and 6 h. Moreover, 12 samples correspond to the RNA yield at 0.04 M NTP and 0.075 M Mg for  $1.25 \times 10^{-9}$ ,  $2.5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ , and  $1 \times 10^{-8}$  M of T7RNAP after 2, 4, and 6 h. six samples correspond to the RNA yield after 2 h at 0.02, 0.04, and 0.08 M NTP at 0.075 and 0.14 M Mg. Optimal values of input variables were NTP concentration 40.8 mM (optimization range 0.01–0.06M), T7RNAP concentration  $1.5 \times 10^{-8}$  M (optimization range  $0.5 \times 10^{-8}$ – $1.5 \times 10^{-8}$ ), Mg concentration 85 mM (optimization 0.01–0.09 M), and reaction time: after 2, 4, and 6 h. The optimal output variables were the yield in a bioreactor:  $4.34 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ , and the cost of T7RNAP and NTPs per g of RNA: 2740 USD  $\times \text{g}^{-1}$ .

In the paper by Fan et al. [20], the optimization of LNPs loaded with antisense oligonucleotides (ASOs), formulated by an automated solvent-injection method using a robotic liquid handler (e.g., muscular dystrophy Duchenne's) was performed. In the first step, optimization of the phase mixing process using a robotic TECAN liquid handler was carried out. Input variables were investigated as an injection speed: 0.1, 0.5, or 0.9 mL/s at 10 mixing repeats, and the ethanol-to-buffer injection at a speed of 0.5 or 0.9 mL/s followed by 10 or 20 mixing repeats. Output variables were particle size, polydispersity, and encapsulation efficiency (calculated based on free ASO-1 measured by OD260). The second step involved the high throughput screening (HTS) workflow for ASO-loaded LNP formulations (96 samples). Input variables were two levels of total lipid concentrations (1 mM; 2 mM), four levels of ASO loading controlled by N/P ratios (0.5; 1; 2; 5), and four levels of the PEGylated lipid (DSPE-PEG2000) content (0; 1.5; 3; 5 %mol of total 2 mM lipids). Output variables were particle size (obtained in the range of 45–145 nm), polydispersity %PD (10–50), and ASO encapsulation efficiency measured by absorbance at 260 nm. We observed that 5 mol% of DSPE-PEG2000 and an N/P ratio  $\geq 1$  would produce optimal LNP formulations with a homogeneous and stable particle size as well as high ASO loading. Other detailed results are summarized in Table S1.

Terada et al. [40] described the DOE approach to find the preparation conditions and their relationship with the properties of LNP-siRNA. The design included three levels of the three-factor Box-Behnken design: low, center, and high, and three center samples (15 preparation). The influence of the input variables: lipid concentration (10, 20, 30 mM), flow rate ratio (FRR) (1, 3, 5 ( $v/v$ )), and total flow rate (TFR) (1, 2, 3 mL/min) on the output parameters: the particle size, polydispersity index (PDI), and siRNA entrapment, was tested. The charge ratio (N/P) in the prepared LNP-siRNA systems was fixed at 3. LNPs were

prepared using hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC), cholesterol (Chol), and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol amine-N-[methoxy-(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (PEG-DSPE). In addition, 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane (DODAP) was used which has a reported apparent pKa of 6.5. The optimal lipid composition was DODAP/Chol/HSPC/PEG-DSPE (50/10/39/1 %mol).

The next authors, Bevers et al. [21], optimized mRNA-LNP compositions to achieve high-magnitude tumor-specific CD8 T cell antitumor immunotherapy by engaging the splenic immune cells. A Roquemore hybrid design was used to select the formulations to be tested (11 different experimental conditions). Each condition was applied in triplicate (3 mice /treatment), and each lipid's molar percentage takes five values. The experimental protocol was carried out for three different choices of PEG-lipid chemistry (DMG-PEG2000, DSG-PEG2000, and DSPE-PEG1000) and different lipid molar ratios (10, 20, and 30 mM). The highest %E7-specific T cell response was investigated as an output variable. The optimal LNPs composition were: DMG-PEG2000: ionizable lipid 56.5%, DOPE 5.25%, cholesterol 37.75%, PEG-lipid 0.5%, and DSG-PEG2000: ionizable lipid 64.4%, DOPE 8%, cholesterol 27.1%, PEG-lipid 0.5%. More detailed relationships between variables are presented in Table S1.

Karl et al. [22], in turn, proposed a holistic workflow for lipid nanoparticle (LNP) formulation optimization for in vivo gene delivery systems. They used designed mixture-process experiments and a self-validated ensemble model (SVEM) (23 runs, LNP batches were tested). The generally used input variables were listed and presented on the fishbone diagram, e.g., ionizable lipid type (H101, H102, H103), ionizable lipid molar content (10–60%), helper lipid type, helper lipid molar content (10–60%), PEG lipid type, PEG lipid molar content (10–50%), N/P ratio (6–14), buffer concentration, and flow rate (1–3 mL/min). Output variables were maximum potency, minimum particle size, minimum PDI (polydispersity index), maximum % encapsulation, and minimum side effects—such as body weight loss in in vivo studies. Exemplary optimal LNP formulation candidates were described in Table S1.

The paper by Schmidt et al. [23] refers to a general approach to process automation and control strategy by QbD in total continuous mRNA manufacturing platforms (mRNA)-based vaccines. The work contains very detailed information about all aspects of LNP-mRNA formation, process parameters, and product composition based on risk analysis. The authors presented, e.g., Ishikawa diagrams to identify all possible sources of variability. Different multivariate optimization prediction was comparable: Ordinary least squares (OLS) regression, partial least squares (PLS) regression, and neural network (NN) regression. Full factorial design and one factor at a time (OFAT) analysis were also used. The optimal process and product parameters are listed in Table S1.

In the next paper, Toma et al. [24] presented a general QbD approach for the development of miRNA nonviral vectors for genetic material delivery in cancer therapy. The DOE is defined generally as providing better results with a minimum number of experiments and evaluating CMAs and CPPs to obtain a product meeting the QTPP.

Young and co-authors [25] described that optimization of LNP composition drives the delivery of mRNA to the placenta. In the DOE approach, a factorial design study was performed. The definitive screening design (DSD) was used to create a mini-library of 18 chemically unique LNPs (A1–A18). A combination of three-level continuous and two-level categorical factors to identify linear and quadratic effects was used: ionizable lipid type (C12-200, DLin-MC3-DMA), phospholipid type (DSPC, DOPE), ionizable lipid molar percentage (25–45%), phospholipid molar percentage (10–22%), DMPE-PEG molar percentage (1.5–3.5%), and cholesterol molar percentage (add up to 100%). Output variables were hydrodynamic diameter (obtained in the range of 72.2–171.5 nm), polydispersity index (0.120–0.317), mRNA encapsulation efficiency (35.6–83.2%), transfection efficiency, and apparent pKa (TNS assay) (5.298 to 7.111). Optimal LNP was formulation A10 with the following composition and characterization: 35% C12-200, 10% DOPE, 1.5% PEG, 53.5% cholesterol; 130.2 nm hydrodynamic diameter, 0.064 PDI, 56.5% EE, 6.607 pKa.

The next paper, by Nag et al. [26], presented a novel approach to size regulation of LNPs using the combined effects of buffer exchanger pH and sonication time. Input variables were: pH of buffer exchanger (4.0–5.0), sonication time (0–100 s), buffer dialysis type (50 mM HEPES pH 6.7, 50 mM HEPES/50 mM sodium acetate pH 6.7, PBS pH 7.2, PBS pH 7.4), and % of dialysis buffer (75–100%). Optimized parameters were LNP size (nm) and polydispersity index (PDI). Optimal values of LNP diameter were 60–180 nm ( $\pm 10$  nm) and  $PDI \leq 0.200$ .

DOE approach to the optimization of lipid nanoparticles for self-amplifying mRNA (saRNA) expression and cellular activation was presented by Ly et al. [27]. The first optimization was performed based on a definitive screening design (DSD). A 7 three-level matrix was built with two two-level qualitative factors and one three-level qualitative factor (iteration A, 26 formulations). Input variables were: N/P ratio (5; 10; 15), phospholipid type: DOPE; DSPC phospholipid content (10; 15; 20 mol %), ionizable lipid type (pKa) (DLin-MC3-DMA (6.4); ALC-0315 (6.09); SM-102 (6.75)), ionizable lipid content (30; 40; 50 %mol), DMG-PEG-2000 content (0; 1.25; 2.5 %mol) total flow rate during preparation (2; 9; 16 mL/min), ambient temperature during formulation (4; 20; 37 °C), aqueous-phase pH (3; 5; 7), and RNA type (mRNA; saRNA). Output variables were size, PDI, EE%, charge, % filled particles, and % full RNA transcripts. Apart from standard statistical methods such as variance analysis (ANOVA), linear regression, and Spearman's correlation, Python's scikit-learn module, statsmodels package, and the seaborn library were also used. The second optimization was performed based on a Box–Behnken design (BBD). Three three-level and 1 three-level quantitative factor (iteration B, 26 formulation) were tested. Input variables were phospholipid content (12.5; 15; 17.5 %mol), ionizable lipid type (pKa) (DLin-MC3-DMA (6.4); ALC-0315 (6.09); SM-102 (6.75)), ionizable lipid content (35; 40; 45 %mol), and aqueous-phase pH (4; 5; 6). The N/P ratio was fixed at 10, DOPE was used as a phospholipid, DMG-PEG-2000 content was fixed at 1.25 %mol, the total flow rate was fixed at 16 mL/min, and ambient temperature during formulation was fixed at 20 °C. Output variables were size, PDI, EE%, charge, % filled particles, % full RNA transcripts, protein expression, and cellular activation. Response surface modeling was carried out using second-order ordinary least square (OLS) regression based on the scikit-learn module and statsmodels package. A Box–Cox transformation of response variables was used to improve model accuracy. The optimization of simultaneous responses was realized by the desirability function, and optimal operating conditions were obtained using the SciPy 1.0 library and Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (BFGS) optimization algorithm.

The paper by Mendonca et al. [28] presented a review of LNP delivery of different types of nucleic acids: siRNA, mRNA, and pDNA. Stricted DOE was not described, but a lot of important variables that affected the effectiveness of LNP formulations were listed (Table S1).

The last presented work by Bastogne et al. [29] concerns the optimization of cationic nano-lipid for siRNA transfection. DOE was performed based on a D-optimal mixture design (36 formulations were tested). Input variables were DOTAP proportion (%) in the LNP content, the concentration of PEG surfactant (%), the lecithin proportion (%), and LNP size (small, medium, large). Output variables were safety attributes related to the LNP stability (unstable or stable states, 0 or 1), siRNA transfection rate (PC3-GFP) (min 30%), and PDI. Response surface equations, a class of polynomial models, are used to describe the links between the input and output variables. Bayesian estimation method, the posterior predictive check, and the leave-one-out cross-correlation were used to evaluate the model prediction.

#### 4. Discussion

Optimization of lipid-based RNA formulations is essential to achieve reproducible quality of pharmaceutical products in terms of efficacy and safety; therefore, the application of QbD and DOE appears to be a very useful tool for the robust development of this complex RNA-LNP system. The performance of LNPs is strongly influenced by the chemical

structure of each component, the interactions between them, and the physicochemical properties of the final formulation.

The most important characteristics of RNA-LNPs are zeta potential, size and particle size distribution, shape, morphology, encapsulation efficiency, cellular uptake, and transfection efficiency. The chemical structure of lipids, lipid concentration, and lipid molar ratio were the most significant factors regulating formulation average and gene expression [15,16,28,38,39]. Cationic lipids for gene transfer have become a major research tool for the transfer of genetic material into cells, and there is great potential for progress in this direction [20].

Particle size was retained as one parameter of QTPP as it is widely known to affect pharmacokinetics, tissue distribution, tissue extravasation, uptake and/or accumulation in clearance organs [15]. The particle size of formulation LNPs depends most on the composition of lipids. In general, the presence of PEG improved particle stability and reduced size but hindered delivery efficiency [27,29,36,37]. Particle size and PDI decrease with increasing RNA: ionizable lipid ratio due to higher RNA concentrations and concomitantly reduced amount of ionizable lipid [15,16].

Another parameter characteristic of RNA-LNP is the zeta potential, which also depends on the lipid type and concentration. In general, QTPP for zeta potential was set to  $>0$  mV because nanoparticles with positive zeta potential enhanced interactions with the plasma membrane. Positively charged nanoparticles can encapsulate negatively charged genetic material by electrostatic interaction [24]. Depending on the composition and especially the modifications of the end groups (acid, amine, or esters), LNP particles can have a negative [20,22,25] or a positive charge [15,17,24]. Zeta potential increased proportionally as a function of ionizable lipid content and RNA: ionizable lipid ratio [15–17]. Zeta potential showed a significant correlation with transfection efficiency [27,28,36].

Another important CQA is entrapment efficiency, measured as an encapsulation efficiency. Encapsulation efficiency is more dependent on the LPN preparation process rather than independent variables [17,26]. No statistically significant differences in encapsulation efficiency were observed with particle size and PDI [15] but increased with higher RNA: ionizable lipid ratio [15,17,27,37].

All of the above particle properties contribute to biological efficacy but are not always the same in vitro and in vivo studies. For example, the efficacy of lipoplex increased with increasing hydrocarbon chain length, whereas the in vitro efficacy of LNP did not change significantly [35]. In vivo, the efficacy of LNP decreased with increasing hydrophobicity of cationic lipids [35]. The presence of the phospholipid DOPE was generally the strongest predictor of in vivo efficacy [36,37,39]. The specific combination of ionizable lipid and phospholipid in the LNP design provides high transfection efficiency in vitro [25].

The DOE approach has been used in most of the optimization works; however, the full QbD approach has been described in only a few papers [19,23–25,28], and a few articles refer only to some aspects of QbD—the definition of QTPP and CQA [15–17,20,27].

We have seen different approaches and innovations in DOE and statistical analysis. Traditional statistical tests and modeling based on ANOVA and regression analysis are slowly being replaced by artificial intelligence and machine learning methods, e.g., neural networks [23]. From a methodological point of view, the most interesting new development in pharmacy is the development of self-validated ensemble models (SVEM), especially with the connection of mixture design [22].

## 5. Conclusions

Over the past 10 years, many research articles have described the development of studies of RNA-loaded lipid nanoparticles for various clinical purposes, e.g., prophylaxis of infectious diseases, treatment of rare diseases, and gene, cancer, and protein replacement therapy. In addition, the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and the emergence of safe and effective RNA vaccines have brought RNA technology to the forefront of medical innovation. Due to the mechanism of action, the therapeutic scope of RNA technology is

wide, and the manufacturing processes are versatile. Different products could be produced using the same raw materials, consumables, equipment, unit operations, and analytical methods. In parallel with the development of new drug delivery methods, the QbD approach is becoming increasingly widespread in pharmaceutical manufacturing.

This review could be very useful for researchers and pharmaceutical manufacturers to apply the quality by design approach to the development of lipid nanosystems loaded with different types of RNA, following the latest trends and regulatory requirements and using modern mathematical and statistical design methods.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines11102752/s1>, Table S1: Optimization of RNA-LNP system using the QbD and/or DOE approach—summary and results.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.G.-B. and W.M.; methodology, L.G.-B. and D.A.S.; software, L.G.-B.; formal analysis, L.G.-B. and W.M.; investigation L.G.-B. and D.A.S.; resources, D.A.S. and K.D. and M.W.; data curation, W.M.; writing—original draft preparation, L.G.-B.; writing—review and editing, L.G.-B. and W.M.; visualization, L.G.-B.; supervision, W.M. and K.D.; project administration, K.D.; funding acquisition, K.D. and M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was co-funded by Celon Pharma S.A. and the Medical Research No. 2021/ABM/05/00005 entitled “Development of Innovative Therapeutic Solutions using RNA technology (TransformRNA—mRNA Therapeutics generation platform)”.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: All contributors to this work at the time of their direct involvement in the project were the full-time employees of Celon Pharma S.A. M. Wieczorek is the CEO of Celon Pharma S.A. Some of the authors are the shareholders of Celon Pharma S.A.

## References

1. Deidda, R.; Orlandini, S.; Hubert, P.; Hubert, C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *161*, 110–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rathore, A.S.; Winkle, H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rathore, A.S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yu, L.X.; Amidon, G.; Khan, M.A.; Hoag, S.W.; Polli, J.; Raju, G.K.; Woodcock, J. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* **2014**, *16*, 771–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yu, L. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res.* **2007**, *25*, 781–791. [[CrossRef](#)]
6. Csoka, I.; Pallagi, E.; Paal, T.L. Extension of quality-by-design concept to the early development phase of pharmaceutical R&D processes. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1340–1343.
7. Food and Drug Administration. *Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century—A Risk-Based Approach*; Final Report; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2004.
8. Zhang, L.; Mao, S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, *12*, 1–8. [[CrossRef](#)]
9. ICH. Q8(2R), *Pharmaceutical Development*; International Conference on Harmonization: London, UK, 2009.
10. ICH. Q9, *Quality Risk Management*; International Conference on Harmonization: London, UK, 2005.
11. ICH. Q10, *Pharmaceutical Quality System*; International Conference on Harmonization: London, UK, 2008.
12. ICH. Q11, *Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities)*; International Conference on Harmonization: London, UK, 2011.
13. Simon, D.; Kis, Z.; Kontoravdi, C.; Shah, N. Quality by Design for enabling RNA platform production processes. *Trends Biotechnol.* **2022**, *40*, 1213–1228. [[CrossRef](#)]
14. Ditzel, H.J.; Tuttolomondo, M.; Kauppinen, S. *Design and Delivery of siRNA Therapeutics*; Humana Press: Hertfordshire, UK, 2021; Chapter 9, p. 139.



15. Thanki, K.; Zeng, X.; Justesen, S.; Tejlmann, S.; Falkenberg, E.; Van Driessche, E.; Nielsen, H.M.; Franzyk, H.; Foged, C. Engineering of small interfering RNA-loaded lipidoid-poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) hybrid nanoparticles for highly efficient and safe gene silencing: A quality by design-based approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *120*, 22–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Thanki, K.; Papai, S.; Lokras, A.; Rose, F.; Falkenberg, E.; Franzyk, H.; Foged, C. Application of a Quality-By-Design Approach to Optimise Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Loaded with a Splice-Correction Antisense Oligonucleotide: Maximising Loading and Intracellular Delivery. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 37. [[CrossRef](#)]
17. Lokras, A.; Thakur, A.; Wadhwa, A.; Thanki, K.; Franzyk, H.; Foged, C. Optimizing the Intracellular Delivery of Therapeutic Anti-inflammatory TNF- $\alpha$  siRNA to Activated Macrophages Using Lipidoid-Polymer Hybrid Nanoparticles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *8*, 601155. [[CrossRef](#)]
18. Zheng, Q.; Qin, F.; Luo, R.; Jin, C.; Huang, H.; Xi, H.; Xiao, W.; Guo, M.; Yang, S.; He, S.; et al. mRNA-Loaded Lipid-Like Nanoparticles for Liver Base Editing Via the Optimization of Central Composite Design. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 2011068. [[CrossRef](#)]
19. van de Berg, D.; Kis, Z.; Behmer, C.F.; Samnuan, K.; Blakney, A.K.; Kontoravdi, C.; Shattock, R.; Shah, N. Quality by design modelling to support rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Fan, Y.; Yen, C.W.; Lin, H.C.; Hou, W.; Estevez, A.; Sarode, A.; Goyon, A.; Bian, J.; Lin, J.; Koenig, S.G.; et al. Automated high-throughput preparation and characterization of oligonucleotide-loaded lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2021**, *599*, 120392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bevers, S.; Kooijmans, S.A.A.; Van de Velde, E.; Evers, M.J.W.; Seghers, S.; Gitz-Francois, J.J.M.; van Kronenburg, N.C.H.; Fens, M.H.A.M.; Mastrobattista, E.; Hassler, L.; et al. mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells. *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 3078–3094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Karl, A.T.; Essex, A.S.; Wisnowski, J.; Rushing, H. A Workflow for Lipid Nanoparticle (LNP) Formulation Optimization Using Designed Mixture-Process Experiments and Self-Validated Ensemble Models (SVEM). *arXiv* **2022**. [[CrossRef](#)]
23. Schmidt, A.; Helgers, H.; Vetter, F.L.; Zobel-Roos, S.; Hengelbrock, A.; Strube, J. Process Automation and Control Strategy by Quality-by-Design in Total Continuous mRNA Manufacturing Platforms. *Processes* **2022**, *10*, 1783. [[CrossRef](#)]
24. Toma, I.; Porfire, A.S.; Tefas, L.R.; Berindan-Neagoe, I.; Tomut, I. A Quality by Design Approach in Pharmaceutical Development of Non-Viral Vectors with a Focus on miRNA. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1482. [[CrossRef](#)]
25. Young, R.E.; Nelson, K.M.; Hofbauer, S.I.; Vijayakumar, T.; Alameh, M.G.; Weissman, D.; Papachristou, C.; Gleghorn, J.P.; Riley, R.S. Lipid Nanoparticle Composition Drives Delivery of mRNA to the Placenta. *bioRxiv*. **2022**. [[CrossRef](#)]
26. Nag, K.; Sarker, E.H.; Kumar, S.; Khan, H.; Chakraborty, S.; Islam, J.; Baray, J.C.; Khan, M.R.; Mahmud, A.; Barman, U.; et al. DoE-derived continuous and robust process for manufacturing of pharmaceutical-grade wide-range LNPs for RNA-vaccine/drug delivery. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9394. [[CrossRef](#)]
27. Ly, H.H.; Daniel, S.; Soriano, S.K.V.; Kis, Z.; Blakney, A.K. Optimization of Lipid Nanoparticles for saRNA Expression and Cellular Activation Using a Design-of-Experiment Approach. *Mol. Pharm.* **2022**, *19*, 1892–1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mendonça, M.C.P.; Kont, A.; Kowalski, P.S.; O'Driscoll, C.M. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids. *Drug Discov. Today* **2023**, *28*, 103505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bastogne, T.; Hassler, L.; Bruniaux, J.; Thomassin, M.; Gidrol, X.; Sulpice, E.; Navarro, F.P. A Bayesian implementation of Quality-by-Design for the development of Cationic Nano-Lipid for siRNA Transfection. *IEEE Trans. NanoBiosci.* **2023**, *22*, 455–466. [[CrossRef](#)]
30. Beg, S.; Rahman, M.; Kohli, K. Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 717–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Cuhna, S.; Costa, C.P.; Moreira, J.N.; Lobo, J.M.S.; Silva, A.C. Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2020**, *27*, 102206. [[CrossRef](#)]
32. Short, S.M.; Cogdill, R.P.; Drennen, J.K., III; Anderson, C.A. Performance-Based Quality Specifications: The Relationship Between Process Critical Control Parameters, Critical Quality Attributes and Clinical Performance. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *100*, 1566–1575. [[CrossRef](#)]
33. Aksu, B.; Mesut, B. Quality by design (QbD) for pharmaceutical area. *J. Fac. Pharm. Istanbul.* **2015**, *45*, 233–251.
34. Cun, D.; Jensen, D.K.; Maltesen, M.J.; Bunker, M.; Whiteside, P.; Scurr, D.; Foged, C.; Nielsen, H.M. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *77*, 26–35. [[CrossRef](#)]
35. Chen, D.; Love, K.T.; Chen, Y.; Eltoukhy, A.A.; Kastrop, C.; Sahay, G.; Jeon, A.; Dong, Y.; Whitehead, K.A.; Anderson, D.G. Rapid Discovery of Potent siRNA-Containing Lipid Nanoparticles Enabled by Controlled Microfluidic Formulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6948–6951. [[CrossRef](#)]
36. Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D.W.; Shi, Y.; Gaensler, K.M.L.; Tan, X.; Dunn Amy, L.; Kerlin, B.A.; et al. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for mRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 8099–8107. [[CrossRef](#)]
37. Kauffman, K.J.; Dorkin, J.R.; Yang, J.H.; Heartlein, M.W.; DeRosa, F.; Mir, F.F.; Fenton, O.S.; Anderson, D.G. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery *in vivo* with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7300–7306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Blakney, A.K.; McKay, P.F.; Yus, B.I.; Hunter, J.E.; Dex, E.A.; Shattock, R.J. The Skin You Are In: Design-of-Experiments Optimization of Lipid Nanoparticle Self-Amplifying RNA Formulations in Human Skin Explants. *ACS Nano* **2019**, *13*, 5920–5930. [[CrossRef](#)]
39. Hashiba, A.; Toyooka, M.; Sato, Y.; Masatoshi, M.; Tokeshi, M.; Harashima, H. The use of design of experiments with multiple responses to determine optimal formulations for *in vivo* hepatic mRNA delivery. *J. Control. Release* **2020**, *327*, 467–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Terada, T.; Kulkarni, J.A.; Huynh, A.; Chen, S.; van der Meel, R.; Tam, Y.Y.C.; Cullis, P.R. Characterization of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids Using Design-of-Experiments Approach. *Langmuir* **2021**, *37*, 1120–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Optimization of RNA-LNP system using the QbD and/or DOE approach – summary and results.

References	Summary / Results
[34]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Significant main effects of the siRNA encapsulation efficiency and particle size:</li> <li>- PLGA concentration – positive effect</li> <li>- volume ratio – positive effect</li> <li>- interaction effect between the PLGA and the Ac-BSA concentration</li> <li>• Optimal parameters for low siRNA load (770 ± 33 ng/mg nanoparticles):</li> <li>- encapsulation efficiencies: 64.35 ± 2.78%</li> <li>- average particle sizes: 265.0 ± 3.0 nm</li> <li>• Optimal parameters for high siRNA load (2192 ± 115 ng/mg nanoparticles):</li> <li>- encapsulation efficiencies: 70.63 ± 5.75%</li> <li>- average particle sizes: 265.2 ± 1.8 nm</li> <li>• Other measured parameters :</li> <li>- the zeta potential of the particles were all negative, in the range: - 45.5 mV to - 37.5 mV</li> <li>- release kinetics of Cy3-labelled siRNA from the PLGA optimal nanoparticles in TE buffer</li> <li>- ToF-SIMS spectra to evaluate whether siRNA localized at the surface of the nanoparticles</li> <li>- AFM topography images</li> <li>- the ability of the PLGA matrix to protect the siRNA from nuclease activity by incubation of siRNA-loaded nanoparticles with Ribonuclease I "A" – protection up to 120h</li> <li>- confirmation of biological activity of the siRNA in nanoparticles by extraction from the nanoparticles of siRNA directed against the mRNA encoding EGFP and used in gene silencing experiments in H1299 cells stably transfected with EGFP - the extracted siRNA was as efficient as the positive control siRNA in silencing the EGFP expression</li> </ul>
[35]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seven new compounds with comparable potency were discovered with silencing factor VII by &gt; 90% in vivo at the tested dose of 1.0 mg/kg</li> <li>• Lipoplexes (simple ionic complexes with the nucleic acids) correctly predicted only two of 23 in vivo hit compounds (9%) while falsely rejecting the other 21 (91%) (hit compounds - reducing gene expression by more than 50% in the in vitro assay)</li> <li>• The in vitro assay using LNPs (prepared by microfluidic method) identified 83% of the hit compounds</li> <li>• The LNP-based in vitro assay identified all of the compounds with &gt; 90% gene silencing in vivo as hit compounds, while the lipoplex-based assay falsely rejected all of them</li> <li>• The four "false negatives" of the LNP-based in vitro assay are also interesting, because they may be indicative of liver-specific delivery</li> <li>• The activity of the lipoplex is disproportionally dominated by the length of the hydrocarbon chain in the cationic lipid, only compounds with longer hydrocarbon chains (C12 and C14) were represented in the in vitro hits</li> <li>• LNP hits included hydrocarbon chains of all tested lengths</li> <li>• siRNA delivery efficiencies in vitro and in vivo for different amine headgroups is a function of the hydrocarbon chain length</li> <li>• The potency of the lipoplex increased with increasing hydrocarbon chain length, while the in vitro potency of the LNPs did not change significantly</li> <li>• The in vivo potency of LNPs decreased with increasing hydrophobicity of the cationic lipids</li> </ul>
[36]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TT3 LLNs showed significantly higher expression of the firefly luciferase compared to other TT LLNs at a dose of 1.2 µg/mL of luciferase mRNA</li> <li>• TT2-TT8 LLNs showed minimal to moderate inhibitory effects on Hep3B cells</li> <li>• Significant positive correlation between transfection efficiency and entrapment efficiency</li> <li>• No significant correlation between transfection efficiency and particle size, surface charge, and cell viability</li> <li>• Increased TT3 and DMG-PEG2000 reduced mRNA delivery efficiency</li> <li>• Increased DOPE facilitated mRNA delivery efficiency</li> <li>• The optimal ratio for cholesterol ranged from 20 to 40</li> <li>• Optimal formulation TT3/DOPE/Chol/DMG-PEG2000: 20/30/40/0</li> <li>• Optimal formulation increased delivery efficiency over 20-fold compared to the best formulation (TT3 LLNs 1-13) identified in the first round of orthogonal optimization and over 350-fold compared to the original start-point TT3-DSPC LLNs</li> <li>• Optimal formulations were over 65-fold more efficient than C12-200-DSPC LLNs</li> <li>• Zeta potential showed a significant correlation with transfection efficiency</li> <li>• The particle size of formulation LLNs with a low ratio of DMG-PEG2000: TT3/DOPE/Chol/DMG-PEG2000: 20/30/40/0 increased dramatically 5 h after, formulation TT3/DOPE/Chol/DMG-PEG2000: 20/30/40/0.75 were stable for a minimum of 2 weeks</li> <li>• PEGylation improved particle stability and reduced particle size but hindered delivery efficiency</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimal formulation of LNPs efficiently delivered hFIX mRNA in both wild-type and FIX-knockout mice and fully recovered the level of hFIX (79) mIU/mL at 1.1 mg/kg) to normal physiological values (500-1500 mIU/mL) in FIX-knockout mice.</li> <li>• Decreased LNP size with increasing PEG composition</li> <li>• Decreased encapsulation efficiency with increasing C12-200:mRNA weight ratio is caused by better complexation of more positively-charged ionized C12-200 lipid with negatively-charged mRNA</li> <li>• Statistically significant trend of increasing serum EPO concentration with increasing C12- 200:mRNA weight ratio and with DOPE phospholipid, independent of the other formulation parameters.</li> <li>• Statistically significant second-order effect between DOPE and increasing weight ratio C12- 200:mRNA</li> <li>• Formulations with DOPE as the phospholipid resulted in significantly higher EPO production than formulations with DSPC</li> <li>• The presence of DOPE in the formulation was the single strongest predictor of <i>in vivo</i> efficacy</li> <li>• Independent of other varying formulation parameters, formulations with DSPC entrapped mRNA on average significantly better than DOPE</li> <li>• The optimized formulation parameters: 10:1 C12-200:mRNA weight ratio, 35% C12-200, 16% DOPE, 46.5% cholesterol, and 2.5% C14-PEC2000 molar.</li> <li>• The average efficacy with 15 µg total EPO mRNA injection <i>in vivo</i>: 7065 ± 513 ng/µL</li> <li>• Particle size: 102 nm</li> <li>• PDI: 0.158</li> <li>• Encapsulation Efficiency: 43%</li> <li>• pKa: 6.96</li> <li>• Zeta Potential: -5.0 mV</li> <li>• Luciferase protein generated by C-35 LNPs was expressed predominantly in the liver (statistically significant), an approximately 3-fold increase in luciferase expression as measured by liver luminescence compared to the original formulation</li> </ul>
[37]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• For a constant siRNA:lipidoid ratio:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- significantly higher (p-value &lt; 0.001) loading of siRNA, proportional to the lipidoid content</li> <li>- approx. five-fold increase in the loading when the lipidoid content was increased from 5% to 20%(w/w)</li> <li>- no statistically significant differences (p-value &gt; 0.05) in the particle size, PDI and encapsulation efficiency</li> </ul> </li> <li>• For fixed lipidoid content of 15% (w/w):             <ul style="list-style-type: none"> <li>- significantly higher siRNA loading with increasing siRNA: lipidoid ratio</li> <li>- siRNA loading was increased from 3.9 µg/mg with siRNA: lipidoid ratio of 1:30 (w/w), to as high as 10.6 µg/mg for a ratio of 1:10 (w/w)</li> <li>- no significant differences (p-value &gt; 0.05) in encapsulation efficiency and zeta potential</li> <li>- significant increase in particle size and PDI for siRNA: lipidoid ratio of 1:10 (w/w) (p-value &lt; 0.001) as compared to ratios of 1:15 and 1:20 (w/w)</li> </ul> </li> <li>• The inclusion of lipidoids did not interfere with the nanoparticle formation process, and statistically insignificant differences (p-value &gt; 0.05) in the average hydrodynamic diameter (z-average) and PDI were observed when compared to non-modified PLGA nanoparticles</li> <li>• Significantly higher zeta potential for the lipidoid-modified LNPs as compared to the non-modified PLGA nanoparticles</li> <li>• Significant increase in encapsulation efficiency, from 3% in the case of PLGA NPs to &gt;60% for all types of lipidoid-modified LNPs</li> <li>• At 10% (w/w) lipidoid content, no statistically significant difference in encapsulation efficiency for L4-modified LNPs, L6-modified LNPs and Lmix-modified LNPs compared to L5-modified LNPs</li> <li>• Encapsulation efficiency was significantly lower (p-value &lt; 0.05) in the case of L6-modified LNPs as compared to that of Lmix-modified LNPs</li> <li>• The type of PLGA core affects the encapsulation of siRNA in LNPs</li> <li>• Significantly higher encapsulation efficiency (74.6%) was measured for LNPs prepared with high-molecular-weight PLGA (20 kDa) as compared to that of LNPs prepared using low-molecular-weight PLGA (10 kDa, 32.5%) at a constant lactic/glycolic acid molar ratio (75/25)</li> <li>• No significant differences (p-value &gt; 0.05) in particle size, PDI and zeta potential for PLGAs of a 20kDa molecular weight</li> <li>• A two-fold increase in encapsulation efficiency for LNPs prepared with PLGA glycolic acid content higher than 25 mol% as compared to LNPs prepared with PLGA with a glycolic acid content below 15%</li> <li>• Zeta potential in the latter case was markedly higher (+27.9 mV) as compared to that of the high-glycolic acid content formulation, which displayed an almost neutral zeta potential</li> <li>• Significantly higher zeta potential and lower encapsulation efficiency for LNPs prepared with PLGA with different end group modifications (acid or amine), in contrast to LNPs with PLGA having esters as end groups</li> <li>• Particle size and PDI were marginally affected by the lipidoid content and the siRNA: lipidoid weight ratio</li> <li>• Slight increase in the particle size and PDI at higher siRNA: lipidoid ratios, i.e. 1:12.5 to 1:10, and at a lipidoid content of 13-18% (w/w). This could be attributed to an influence on the particle formation process due to the higher siRNA concentrations and the concurrent reduced amount of lipidoid</li> <li>• Particle sizes for all formulations were within the range of 200 nm to 260 nm</li> <li>• Initial experiments with L5-modified LNPs revealed that the ratio of siRNA: lipidoid, and not the lipidoid content, is a determining factor for the particle size and PDI</li> <li>• Lipidoid content and the siRNA: lipidoid ratio contribute equally to reaching the overall CQAs of the formulation</li> </ul>
[15]	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Particle size was kept as one of the QITP parameters, as it is widely known to influence pharmacokinetics, tissue distribution, uptake and/or accumulation within the clearance organs</li> <li>• LPNs for pulmonary delivery, the upper limit of particle size was set to be &lt;250 nm, because nanoparticles below this size evade the mucociliary and macrophage clearances thereby resulting in longer residence time when administered via the pulmonary route of administration</li> <li>• Monodisperse particle size distribution is desirable for homogeneous predictable performance and hence the QITP for the PDI was set to &lt;0.3</li> <li>• Zeta potential increased proportionally as a function of lipidoid content and siRNA; lipidoid ratio but remained largely in the range of +5 to +15 mV</li> <li>• The QITP for zeta potential was set to &gt;0 mV because nanoparticles with positive zeta potential have improved interactions with the plasma membrane. Excess surface charge is also associated with reduced colloidal stability, non-specific tissue internalization and shorter blood circulation time</li> <li>• Zeta potential was highly dependent on the lipidoid content within the LPNs and increased from -20.9 mV at 5% (w/w) to +20.0 mV at 20% (w/w) at a lower ratio of siRNA: lipidoid (1:30)</li> <li>• The effect of the ratio of siRNA: lipidoid on the zeta potential of the LPNs was only marginal and it remained on the positive side ranging up to +10 mV</li> <li>• Lipidoid-modified LPNs show highly promising prospects for efficient and safe intracellular delivery of siRNA</li> </ul>	<p>[16]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Critical formulation variables: L5 content and L5:Luc-ASO ratio (w/w)</li> <li>• The optimised Luc-ASO-loaded LPNs, defined from the OOS, displayed high loading and mediated splice correction at well-tolerated, lower doses as compared to those required for reference L5-based lipoplexes, L5-modified stable nucleic acid-lipid nanoparticles or LPNs modified with diethyltrimethylammonium propane (conventional cationic lipid)</li> <li>• The optimal Luc-ASO-loaded LPNs represent a robust formulation that mediates efficient intracellular delivery of Luc-ASO</li> <li>• Significant impact type of PLGA used for the formulation of L5-modified LPNs on the loading of Luc-ASO:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- Luc-ASO encapsulation efficiency was very low, a maximum: 12-17% was achieved when using the PLGA type 75/25 with a molecular weight in the range 20-45 kDa</li> <li>- for both lower and higher lactide/glycolide ratios, the encapsulation efficiency was very low, and it remained below 10% for all PLGA types irrespective of the molecular weight</li> <li>- increasing the molecular weight and the lactide/glycolide molar ratio resulted in a slight, but not significant, increase in z-average, but these two formulation parameters had no significant impact on the PDI</li> </ul> </li> <li>- the Luc-ASO-loaded PLGA nanoparticles displayed a negative zeta potential ranging between -14.1 and -19.9 mV, comparable to that of unloaded PLGA nanoparticles (approximately -25 mV)</li> <li>- the hydrodynamic size increased slightly for higher molecular weight polymers, and when these displayed an increased lactide/glycolide molar ratio</li> <li>- the PDI remained almost constant, except when incorporating the PLGA type with the highest lactide content (90%) into the LPNs</li> <li>- the zeta potential was negative for LPNs prepared from the PLGA types with a lower lactide content (&lt;75%) at a given molecular weight (20 kDa)</li> <li>- however, inclusion of L5 (5% w/w) in the nanoparticles resulted in a pronounced increase in the surface charge of the LPNs prepared from the higher molecular weight PLGAs or the PLGA types with a higher lactide content, respectively, and it reached a maximum of +25 mV</li> <li>- the Luc-ASO encapsulation efficiency was increased (to a varying degree) for most of the LPNs as compared to their PLGA nanoparticle counterparts</li> <li>- the most pronounced change was observed for the LPNs prepared with the PLGA type 90/10 (10 kDa), for which an increase from 1.4% (for PLGA nanoparticles) to 76.3% (for LPNs) was found. However, a bimodal particle size distribution was also observed for this formulation</li> <li>- for the LPNs prepared with PLGA containing 75% lactide both particle size and zeta potential were significantly increased when the molecular weight of PLGA was increased from 20 kDa to 25-35 kDa, whereas the encapsulation efficiency remained constant</li> <li>- the encapsulation efficiency for LPNs prepared with higher molecular weight PLGA (i.e., 25-35 kDa) decreased from approximately 100% to 25%, whereas there was a slight increase in the encapsulation efficiency for LPNs prepared with relatively lower molecular weight PLGA (i.e., 20 kDa)</li> <li>- the particle size was decreased remarkably from ~240 nm to ~195 nm when the LPNs were prepared with higher molecular weight PLGA (25-35 kDa)</li> <li>- no significant difference in particle size for LPNs prepared with a relatively lower molecular weight PLGA (20 kDa).</li> <li>- the PLGA type with a 75% lactide content and a molecular weight of 20 kDa was selected for further studies</li> <li>• Effect of L5 on the physicochemical properties of LPNs:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- the average hydrodynamic diameter and PDI remained almost constant for Luc-ASO-loaded LPNs prepared with an L5 content between 5% and 20% (w/w)</li> <li>- the zeta potential increased as a function of the L5 content from Luc-ASO encapsulation efficiency was generally very low and an approximately -15mV to +34mV</li> <li>- no statistically significant difference (p-value &gt; 0.5) in the Luc-ASO encapsulation efficiency was found when increasing the L5 content from 5% to 15%, however, an above three-fold increase in the Luc-ASO loading was achieved</li> <li>- with an increase in L5 content from 15% to 20%, a pronounced decrease in encapsulation efficiency from 82% to 23% was observed</li> <li>- this was accompanied by a decrease in loading from 6.1 to 2.3 µg Luc-ASO/mg LPNs.</li> <li>- an L5 content of 15% (w/w) was chosen for further optimisation studies</li> </ul> </li> <li>• The L5:Luc-ASO Ratio Affects the Physicochemical Properties of LPNs:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- wide range of L5:ASO ratios (35:1 to 5:1, w/w) were tested to assess the effect on the physicochemical properties of the LPNs at a constant L5 content (15%, w/w).</li> <li>- there was a slight, but not statistically significant, increase in the particle size up to a 7.5:1 ratio (225 nm to 247 nm).</li> <li>- however, at a ratio of 5:1 (w/w), both the size and the PDI increased abruptly to 509 nm and 0.71, respectively.</li> </ul> </li> </ul>
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- the zeta potential was highest (+33.6mV) at the higher ratios of L5:ASO and lowest (-8.62mV) for the lowest ratio.</li> <li>- a pronounced increase in the Luc-ASO loading was observed as a function of the L5:Luc-ASO ratio.</li> <li>- the loading capacity was increased more than sixfold from approximately 2.33 to 14.17 µg Luc-ASO/mg LPNs, although the encapsulation efficiency decreased at lower ratios.</li> <li>- the encapsulation efficiency remained almost constant in the range from 35:1 to 15:1 (~80%), but decreased at lower ratios.</li> <li>• Statistical Optimisation of L5-Modified LPNs and Contour Profiling of the Response Variables:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- the z-average was not significantly affected by the independent variables and ranged within 179–205 nm</li> <li>- similar results were also observed for the PDI, which ranged from 0.056 to 0.164. A minor increase in the PDI of approximately 0.164 was found at higher lipidoid content and L5:Luc-ASO ratio, which was still within the acceptable ranges of the QTPP</li> <li>- the zeta potential of the LPNs increased with a higher L5 content at all L5:Luc-ASO ratios. The influence of the L5:Luc-ASO ratio on the zeta potential of the LPNs was only evident at a lower L5 content. With a higher L5:Luc-ASO ratio, a concomitant increase in the zeta potential was found. Notably, for all formulations, the zeta potential remained positive and was within the range of +3 mV to +37 mV</li> <li>- the encapsulation efficiency was highly dependent on both the L5 content and the L5:Luc-ASO ratio. A clear declining trend in encapsulation efficiency was noted with an increase in L5 content beyond 16% (w/w), irrespective of the L5:Luc-ASO ratio</li> <li>- at lower L5 content (&lt;15%), very high encapsulation efficiencies (&gt;90%) were obtained at higher L5:Luc-ASO ratios. At higher L5 content, the encapsulation efficiency decreased proportionately with the increase in L5 content. The contour plot for the Luc-ASO loading revealed a non-linear correlation with an optimal range of 14–18% L5 content, within which the loading varied from 6 to 12 µg Luc-ASO/mg LPNs. In contrast to the declining encapsulation efficiency observed in this region when decreasing the L5:Luc-ASO ratio, the Luc-ASO loading displayed a pronounced increase due to the higher theoretical loading</li> <li>- of the biological responses, i.e., in vitro splice correction and effect on cellular viability were also determined. Each formulation from the experimental design was tested at five different Luc-ASO concentrations. The obtained splice correction at each Luc-ASO concentration was normalised to the positive control and plotted as a function of the Luc-ASO concentration, followed by fitting the data to a linear function by using regression analysis. The slope of the linear fit represents the splice-correction rate</li> <li>- as observed in the OFAT experiments, the ability to mediate splice correction was highly dose-dependent. The luciferase activity resulting from the splice-correction event was generally highest at 154 nM Luc-ASO, except for the LPNs with the highest L5 content, which mediated efficient splice correction even at 10-fold lower concentrations</li> <li>- the splice-correction rate increased with higher L5 content</li> <li>- the extent of enhancement was more pronounced at higher L5:Luc-ASO ratio, as compared to that determined at lower ratios</li> <li>- a similar trend was found for all formulations concerning their effects on cell viability. The formulations were better tolerated when the L5 content was lower and the L5:Luc-ASO ratio was higher, as compared to that of LPNs with a higher L5 content</li> <li>- for instance, LPNs prepared with an L5 content of 20% (w/w) and an L5:Luc-ASO ratio of 30:1 had an IC50 of 30 nM, while the formulation prepared with 10% (w/w) and an L5:Luc-ASO ratio of 10:1 displayed a remarkably high IC50 value of ~398 nM</li> <li>- however, for most formulations, the IC50 value was within the range 120–260 nM</li> <li>• The OOS area:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- 14–17% (w/w) L5 content and L5:Luc-ASO ratios from 11:1 to 21:1</li> <li>- the extent of the OOS was mainly defined by the biological responses, and it was restricted by the splice correction efficiency and the effect on cell viability</li> <li>- in addition, the zeta potential was also an important factor in determining the extent of the OOS</li> <li>- finally, five formulations within the OOS were selected for preparation to assess the validity of the model. These formulations all displayed CQAs according to the pre-set QTPP, and hence the constructed design space was found to be valid</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
[38]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipid type and lipid concentration were the only significant factors</li> <li>• Cephalin lipid identity had the strongest effect, with <math>p = 0.0018</math></li> <li>• Cephalin LPNs with a ratio of total lipids to RNA of 18:1 (w/w), low lipid concentration, and medium particle concentration yielded a 7-fold increase in luciferase expression over the original formulation</li> <li>• Flow cytometry revealed that all of the formulations enhanced the eGFP expression in human skin cells and paralleled the enhanced delivery with cephalin, DDA, and DOTAP LNPs observed with luciferase imaging studies</li> <li>• Epithelial cells and fibroblasts were found to comprise the majority of the resident skin cell population and the immune cells were found to express more of the administered RNA, concerning their proportion of the total cell population.</li> </ul>
[39]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Particle size and PEG to phospholipid ratio (PEG:PL) are other key factors for liver-specific gene expression in addition to the examined formulation factors</li> <li>• The optimized formulation showed better gene expression compared to other lipid formulations from industry leaders</li> <li>• DoE with multiple responses has clear advantages over conventional DoE with only one response, and it is capable of efficiently revealing the parameters that are important in predicting optimal formulations</li> <li>• 1° DoE: identification of critical factors for mRNA-loaded LNPs by DSD:</li> </ul>

- particle diameters: from 26 to 107 nm
- PdI: from 0.126 to 0.439
- gene expression in the tested tissues: from 104 to 108 RLU/mg protein
- one formulation showed a much lower mRNA encapsulation efficiency (42.4%) and a larger diameter (107 nm) compared to the others (over 90% and less than 70 nm, respectively), and was, therefore, omitted from the subsequent correlations
- Nluc expression between the two organs – no significant correlation (R2=0.392, p=0.087)
- Nluc expression in the liver against LNP diameter – significant positive correlation (R2=0.747, p=0.0031)
- Nluc expression in the liver against PdI – significant negative correlation (R2=0.670, p=0.00094)
- uniform particles with diameters of at least 40 nm are required for gene expression in liver
- gene expression in the spleen against diameter – significant positive correlation (R2=0.422, p=0.024)
- gene expression in the spleen against PdI – significant negative correlation (R2=0.169, p=0.182)
- relatively larger diameter is required for gene expression in the spleen
- three statistically significant main factors (CL, PL, and %PEG) were found concerning the increase in LNP diameter
- two statistically significant main factors (CL and PL) and two secondary factors (CL\*%PEG and PL\*%PEG) were identified concerning the decrease in PdI
- three statistically significant main factors (CL, PL, and %CL) and two secondary factors (CL\*PL and CL\*%CL) were found concerning the expression of Nluc in the liver
- three statistically significant main factors (CL, %CL, and %PEG) and one secondary factor (%CL\*%PEG) were found concerning Nluc expression in the spleen
- CL4H6 and DSPC can be used to synthesize significantly large, uniform and potent LNPs
- higher %CL was important in terms of maximizing gene expression
- the mRNA/lipid ratio was not a significant factor for any of the responses
- for both %PL and %PEG, a clear conclusion was not obtained by the above model fitting
- it should be noted that the top two formulations in the liver showed significantly different gene expressions in off-target organs and that the major difference in the formulation parameter between the two LNPs was the PEG/PL ratio
- specifically, formulation with a higher PEG/PL ratio of 0.5 showed a higher liver-specificity (3 to 9-fold) compared to the LNPs with a lower ratio of 0.06
- a correlation between the PEG/PL ratio and liver specificity was observed in the library. These results suggest that the LNPs with higher PEG/PL ratios are rapidly eliminated from the blood circulation and accumulate in the liver whereas those with lower PEG/PL ratios circulate in the blood longer and are distributed in the liver and off-target organs as well
- 2<sup>nd</sup> DoE: identification of optimal mRNA-loaded LNPs by L18-Taguchi FFD
  - the LNP diameter, PdI, and Nluc expression in the liver in the case of library B were significantly higher, lower, and higher, respectively, compared with those of library A
  - Nluc expression in the liver and spleen – no significant correlation (R2=0.146, p=0.130)
  - particle diameter and gene expression in the liver – no significant correlation (R2=0.0454, p=0.411)
  - diameter and gene expression in the spleen – a significant positive correlation (R2=0.301, p=0.023)
  - optimal range of particle diameter is different between the liver and spleen
  - liver-specific formulations of particles showed significantly lower diameters and higher PEG/PL ratios
  - two statistically significant main factors (%CL and %PEG) to the increase in LNP diameter
  - no statistically significant factor to the decrease of PdI
  - two statistically significant main factors (%PL and %PEG) to the increased Nluc expression in the liver
  - one statistically significant main factor (%PEG) to an increased Nluc expression in the spleen
- LNPs (B13), composed of CL4H6/ESM/cholesterol/PEG-DMG at a molar ratio of 60/5/35/1.5, best met the criteria for both Nluc expression in the liver and liver-specificity. TEM analyses revealed that the this-LNPs formulation had a spherical structure
- Characterization of the optimized mRNA-loaded LNPs:
  - the highest serum EPO concentration was observed for the B-13-LNPs over the other two LNPs, a result that was similar to that for Nluc expression
  - the hEPO level of the B-13-LNPs (8756 ng/mL) was 1.24-fold higher than that of the C12-200-LNP which was optimized for hEPO expression at a 1.5-fold higher dose (0.75 mg mRNA/kg). The C12-200-LNPs showed an expression of hEPO at therapeutically relevant levels in non-human primates and restored blood clotting time in haemophilia B model mice by the expression of human factor IX at the same dose. These collective findings suggest that the B-13-LNPs induce therapeutically relevant levels of protein expression
  - distribution in non-liver organs (spleen, lung, and kidneys) and blood in ApoE-deficient mice was significantly higher than those in wild-type mice, whereas that in the liver was similar
  - the B-13-LNPs were localized in hepatocytes (extravascular region, arrows) in wild-type mice but not in ApoE-deficient mice. Nluc expression in livers in ApoE-deficient mice was significantly (approximately 5-fold) lower than that in wild-type mice whereas that in the spleen was not significant. These collective results suggest that ApoE facilitated the rapid clearance by hepatocytes, liver-specific distribution and gene expression of the B-13-LNPs
  - compared with other lipid formulations from industry leaders like MC3-LNPs, the B-13-LNPs showed approximately a 2.5-fold higher Nluc expression in the liver

<ul style="list-style-type: none"> <li>- the mCherry-encoding mRNA-loaded B-13-LNPs also showed a higher expression in hepatocytes compared with the MC3-LNPs</li> <li>- biosafety was confirmed of the optimized mRNA-loaded LNPs</li> <li>- B-13-LNPs have better properties for safe and effective treatment compared with the recently developed formulations</li> <li>• Main conclusions:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- the desired size ranges for efficient gene expression in the liver and liver-specific gene expression and the results revealed that the PEG/PL ratio can be an indicator of liver-specificity</li> <li>- DSPC was significantly preferable to DOPE for gene expression in the liver but not in the spleen</li> <li>- DOPE-containing LNPs showed significantly lower gene expression in the liver compared to DSPC-containing LNPs</li> <li>- although the precise reason why optimal PL is different between pH-sensitive cationic lipids and liposomes could be related to the mechanism of uptake in hepatocytes</li> <li>- approximately 60 nm would be a critically minimal diameter and a diameter from 60 to 100 nm would be the optimal range to maximize total gene expression in the body (e.g. for secretory protein replacement therapy)</li> <li>- diameter from 60 to 70 nm would be optimal from the viewpoint of liver specificity, which would be important for non-secretory protein replacement therapy and genome editing</li> <li>- chemical structure and the molar ratio of lipids were significant regulatory factors for both formulation diameter and gene expression</li> <li>- formulation diameter also significantly affected gene expression</li> <li>- formulation diameter is a confounding factor</li> <li>- higher PEG/PL ratios facilitate rapid blood clearance and hepatic accumulation of the LNPs</li> <li>- the diameter and PEG-lipid to-phospholipid ratio were found to be significant parameters for liver-specific expression, which were newly found in the present study.</li> <li>- the optimized B-13-LNPs showed an ApoE-dependent liver-specific biodistribution and gene expression and exhibited significantly higher gene expression efficiency compared to other lipid formulations from industry leaders</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Significant differences were not observed in the z-average and PDI, and the values were within the range of the QTPP</li> <li>• A ~1.9-fold increase in the loading was observed when the L5 content was increased from 15 to 25% at L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratios from 7.5:1 to 15:0:1</li> <li>• The loading dropped to 1.5-fold when the ratio was 5:0:1</li> <li>• The zeta potential increased with the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio due to an increase in the content of cationic L5</li> <li>• Z-average and PDI of the LNPs remained almost constant at all tested L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratios</li> <li>• Significant decrease in the zeta potential was observed as the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio was decreased (corresponding to a higher amount of siRNA without increasing the L5 content)</li> <li>• The L5 content and the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio influence the zeta potential and the siRNA loading</li> <li>• The encapsulation efficiency was neither affected by the L5 content nor the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio, and no significant differences were observed the responses were within the QTPP (&gt;60%)</li> <li>• The encapsulation efficiency increased (from 64.4 to ~80%) as the L5 content increased from 15 to 25%</li> <li>• The relatively lower encapsulation efficiency could be due to the high pH (7.5) during the emulsification process as L5 might not be fully protonated</li> <li>• Hence, a value higher than 60% was set for the encapsulation efficiency, while a higher siRNA loading (&gt; 6 <math>\mu</math>g siRNA/mg LNPs) would have a positive impact on the gene silencing effect and reduction in cytotoxicity</li> <li>• Both the L5 content and the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio affected the gene silencing</li> <li>• At an siRNA concentration of 5.6 nM for LNPs having 15% L5 content, the TNF-<math>\alpha</math> mRNA expression was ~60%, and the expression was at least 80% with the remaining LNPs.</li> <li>• At the highest tested siRNA concentration (55.8 nM), the TNF-<math>\alpha</math> mRNA expression generally decreased as the L5 content increased at a constant L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio.</li> <li>• LNPs containing an L5 content of 15, 20, and 25% with an L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio of 15:1 were most efficient in causing a significant concentration-dependent decrease in TNF-<math>\alpha</math> mRNA expression.</li> <li>• Of all the LNPs tested for cell viability, only a few of them (15%, 10:0:1 and 7.5:1; 20%, 7.5:1, and 5:0:1; 25% 15:0:1) seemed to have cytotoxic potential but none of them caused &gt; 50% loss in cell viability even at 222.8 nM.</li> <li>• In terms of cytotoxicity and TNF-<math>\alpha</math> gene silencing effect, formulations having an L5 content and L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA wt. the ratio of 15%, 15:0:1 and 20%, 15:0:1 exhibited a balanced profile and were consequently used for model validation</li> <li>• The differences in z-average were not significant in the design space</li> <li>• The z-average decreased considerably when the L5 content was higher than 20%, and the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio was &gt;7.5:1, and vice versa</li> <li>• There was a gradual increase in the PDI (from ~0.100 to 0.175) as the L5 content increased from 15 to 25%. A minor increase in the PDI was observed when the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio decreased at an L5 content of 15%.</li> <li>• The zeta potential increased gradually from 6.7mV to a maximum of 39.0mV</li> <li>• The encapsulation efficiency remained almost constant (64~78%) throughout the design space, which may indicate that the encapsulation efficiency is more dependent on the process of preparing the LNPs rather than on the independent variables.</li> <li>• The siRNA loading was affected by both independent variables L5 content and L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio</li> <li>• When keeping the L5 content constant and varying the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio, it was observed that the siRNA loading decreased 3-fold when the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio was increased from 5:0:1 to 15:0:1.</li> </ul>
--	--



<ul style="list-style-type: none"> <li>• The L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio displayed a greater impact on the loading, which was expected as a higher amount of siRNA would correspond to increased loading per weight of LPNs</li> <li>• To test the performance of the formulations loaded with TNF-<math>\alpha</math> siRNA in a biologically relevant system, the IC<sub>50</sub> values were calculated as a function of the TNF-<math>\alpha</math> siRNA concentration in formulations responsible for half-maximal inhibition of TNF-<math>\alpha</math> mRNA expression in macrophages</li> <li>• The IC<sub>50</sub> values for transfection efficiency of all formulations ranged from 10.2 to 50.0 nM</li> <li>• Formulations displaying the highest L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA wt. ratio, i.e., the least amount of TNF-<math>\alpha</math> siRNA relative to L5, at 15, 20, and 25% L5 had transfection efficiencies below 20 nM</li> <li>• The IC<sub>50</sub> value for naked TNF-<math>\alpha</math> siRNA was found to be 63.7 nM</li> <li>• Fold-change in TNF-<math>\alpha</math> mRNA inhibition relative to naked siRNA was obtained by the ratio of IC<sub>50</sub> values of TNF-<math>\alpha</math> siRNA-loaded LPNs and naked TNF-<math>\alpha</math> siRNA</li> <li>• At a constant L5 content, the fold-change increased as per the quadratic model fitting from 7.5:1 to 15.0:1 ratio.</li> <li>• When the L5:TNF-<math>\alpha</math> ratio was kept constant, the fold change generally increased with an increase in the L5 content. Interestingly, LPNs with an L5 content of 15 and 25% had similar IC<sub>50</sub> values</li> <li>• The dose-response of siRNA LPNs demonstrated a lack of cytotoxic potential for different formulations tested at certain concentrations for gene silencing and only a few of them (15%, 10.0:1 and 7.5:1; 20%, 7.5:1; 25% 15.0:1) seemed to have cytotoxic potential. The possibility of potential apoptotic and necrotic effects of the particles should not be disregarded since it may not be apparent from the MIT assay. However, at TNF-<math>\alpha</math> siRNA concentrations of 100 and 200 nM, no significant apoptotic or necrotic cells were observed for 15%, 15.0:1 LPNs</li> <li>• The toxicity of the formulations is most likely caused by the L5 component</li> <li>• The concentration of TNF-<math>\alpha</math> siRNA in the most optimal formulations required to knock down between 60 and 69% of TNF-<math>\alpha</math> was found to be 27.8 nM, while a concentration of 55.8 nM was required for &gt;80% knockdown. At these concentrations, none of the most optimal formulations displayed any cytotoxic potential.</li> <li>• We found a linear increase in the TNF-<math>\alpha</math> gene silencing effect when the L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio was increased from 7.5:1 to 15.0:1 at 15, 20, and 25% L5 content. LPNs with a 5.0:1 ratio silenced TNF-<math>\alpha</math> gene expression more efficiently than 7.5:1.</li> <li>• The highest tested concentration of siRNA, the gene expression of TNF-<math>\alpha</math> in LPS-activated macrophages treated with LPNs containing 15, 20, and 25% L5 and having an L5:TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio of 15.0:1 was only 19, 12, and 6%, respectively.</li> <li>• LPNs composed of 15, 20, and 25% L5 having an L5: TNF-<math>\alpha</math> siRNA ratio of 15.0:1 were found to be most optimal for gene silencing in macrophages, as determined from their IC<sub>50</sub> values</li> <li>• Optimal Operating Space: 15%, 13.5:1 and 25%, 15.0:1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The introduction of Chol-PEG400-SP, Chol-PEG400-Man, and Chol-PEG2000-WRK improved Luc mRNA expression in the liver</li> <li>• SMWLLNs/Luc containing three derivatives achieved the highest bioluminescence intensity compared with other groups</li> <li>• The formulation of SMW-LLNs was chosen for further optimization</li> <li>• No significant difference in the size, zeta potential, and encapsulation efficiency among formulations used for optimization, with different derivatives of cholesterol.</li> <li>• All three input variables showed a good fit to the second-order polynomial model</li> <li>• Increasing the molar ratio of Chol-PEG400-SP, Chol-PEG400-Man, and Chol-PEG2000-WRK resulted in greater bioluminescence intensity of the liver within a certain range.</li> <li>• The optimal ratio of Chol-PEG400-SP, Chol-PEG400-Man, and Chol-PEG2000-WRK in optimal LLN (O-LLNs) were forecasted to be 4.37%, 6.29%, and 3.38%, respectively</li> <li>• Bioluminescence intensity in the liver using O-LLNs was greater than the Origin-LLNs 6 h after i.v. injection of Luc mRNA</li> <li>• The optimized LLNs (O-LLNs) by CCD succeeded in the functional delivery of Cre-recombinase (Cre) mRNA, human erythropoietin (hEPO), and mCherry mRNA, respectively</li> <li>• The O-LLN/mRNA complex showed a spherical morphology in the transmission electron microscopy (TEM) image and had a mean particle size of 136 nm (DLS)</li> <li>• The surface charge of O-LLNs/mRNA complex was positively charged (zeta potential = 35 mV)</li> <li>• mRNA/LLNs could be physically stable at 4 °C for at least 2 weeks</li> <li>• O-LLNs/mRNA with various mRNA concentrations showed negligible cytotoxicity after 24 h (&gt;80% cell viability), indicating an excellent cell compatibility of O-LLNs/mRNA</li> <li>• O-LLNs/Cy5 significantly inhibited macrophages uptake compared with Chol-PEG400-SP-free O-LLNs/Cy5</li> <li>• O-LLNs were one of the potential carriers for in vivo liver-targeted mRNA delivery</li> <li>• O-LLNs/hEPO induced the strongest expression of hEPO in the blood of C57BL/6 mice with intravenous injection of the preparations consisting of hEPO mRNA, compared to Origin/hEPO (p &lt; 0.001) and MC3/hEPO (p &lt; 0.05).</li> <li>• mCherry highly expressed in the albumin antibody-labeled hepatocytes.</li> <li>• O-LLNs optimized by CCD were one of the highly efficient liver-targeted systems for mRNA delivery according to the investigation of the distribution and functional delivery.</li> <li>• O-LLNs achieved more than 8% of base editing efficiency, which was 2.36-fold of the Origin-LLNs or O-LLNs containing CBE mRNA and sgRNA at a total dose of 1 mg kg<sup>-1</sup> (mRNA:sgRNA, 1/1, wt/wt).</li> <li>• Optimized lipid-like nanoparticle with 4.37% Chol-PEG400-SP, 6.29% Chol-PEG400-Man, and 3.38% Chol-PEG2000-WRK, which can synergistically prolong systemic circulation, as well as increase liver targeting and hepatocyte uptake</li> <li>• O-LLNs resulted in functional mRNA delivery to the livers in A19 mice and more than 8% base editing efficiency in PKU mice.</li> </ul>
[18]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The minimum of 2740 \$ costs of T7RNAp and NTPs expressed per g of RNA is at 1.5 × 10<sup>-8</sup>M T7RNAp concentration, at 40.8mM NTP concentration and at an RNA yield of 4.34 g/L.</li> <li>• With high ASO loading, an increase in mixing speeds or cycles did not affect particle size and %EE</li> <li>• Optimal condition: ethanol-to-buffer injection followed by 10 cycles of mixing at medium speed 0.5 mL/s, sufficient to produce homogeneous LNPs</li> </ul>
[19]	[20]

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PEGylated lipid was critical for LNP formation</li> <li>• Increasing the PEGylated lipid content significantly (<math>P &lt; 0.0001</math>) reduced the mean particle size, i.e., lipids containing 1.5, 3, and 5 mol% of DSPE-PEG2000 resulted in LNPs with average diameters of ~120, ~80, and ~60 nm, respectively</li> <li>• DSPE-PEG2000 incorporated at 1.5 mol% of the total lipids produced unimodal nanoparticles with a mean diameter of ~120 nm whereas more PEG increased polydispersity</li> <li>• 5 mol% of DSPE-PEG2000 even produced a subpopulation, possibly due to the formation of small DSPE-PEG2000 micelles</li> <li>• %EE of ASO was mainly determined by the N/P ratios. Percent ASO encapsulation was higher than 80% when the N/P ratio was higher than 1, i.e., there were excess complexation sites in MC3; whereas decreasing the N/P ratio to 0.5 significantly reduced %EE to ~50%</li> <li>• Similar results were also found when MC3 was replaced by another cationic lipid DOTAP or ASO-1 was replaced by ASO-2 using the same formulation conditions such as pH and buffer</li> <li>• ASO-loaded LNPs prepared by the HTS approach and microfluidic formulation showed a similar structure of a condensed core with multiple stacked lipid layers (cryo-TEM images)</li> <li>• Compared with N/P = 1, both methods running at higher N/P ratios produced LNPs with more condensed cores without evident multilamellar structures</li> <li>• The two LNP preparation methods showed similar results:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- LNP size decreased while polydispersity increased with increasing PEG content</li> <li>- compared to PEG contents, LNP sizes were less affected by total lipid concentrations (up to 2 mM) and N/P ratios</li> <li>- excess ASO loading (N/P ratio &lt; 1) resulted in significant decrease in % EE.</li> <li>- The HTS approach successfully predicted the dependence of particle size and polydispersity on the PEGylate lipid content, shown by strong correlations with linear regression <math>R^2 &gt; 0.9</math>.</li> </ul> </li> <li>• 1.5 mol% of DSPE-PEG2000 and the N/P ratio <math>\geq 1</math> would produce optimal LNP formulations with a homogeneous and stable particle size as well as high ASO loading</li> <li>• HTS approach decreased material consumption by ~10 folds and improved processing outputs by ~100 folds, compared to the larger scale microfluidic preparation</li> </ul>
[40]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• siRNA encapsulation values showed approximately 90% in all LNP-siRNA systems</li> <li>• The R2 values for particle size and PDI of empty LNPs before dialysis were 0.94 and 0.99, respectively, these values after dialysis were 0.99 and 0.92, respectively.</li> <li>• Similarly, the R2 values for particle size and PDI of siRNA-containing systems before dialysis were 0.96 and 0.95, respectively, and 0.91 and 0.95, respectively, after dialysis</li> <li>• FRR and FRR * FRR showed a remarkable effect (<math>P &lt; 0.01</math>) on the particle size and PDI of both empty LNPs and LNP-siRNA systems</li> <li>• LNP-siRNA systems, the lipid concentration showed a significant effect on the particle size and PDI</li> <li>• A trend of increase in particle size following dialysis was observed with both empty LNPs and LNP-siRNA systems</li> <li>• The particle size of LNP-siRNA systems was affected by the FRR and lipid concentration and confirmed that the particle size will likely increase if a low FRR (i.e., more aqueous) and a high lipid concentration are used</li> <li>• Lipid concentration influenced (with statistical significance) the particle size of LNP-siRNA systems but not empty LNPs</li> <li>• FRR is a key parameter to control the PDI of LNPs because the diffusion rate in microfluidics is reduced at a low FRR</li> <li>• Increased FRR (to 3) was associated with a decreased PDI in both empty LNPs and LNP-siRNA systems. However, in the range of 3-5 FRR, no impact on PDI was observed</li> <li>• Lipid concentration was found to have a greater impact on the PDI of LNP-siRNA systems than on that of empty LNPs, and there was a tendency for the PDI to increase with increasing lipid concentration</li> <li>• Reduction in the PDI was observed following dialysis in LNP-siRNA systems</li> <li>• LNP-siRNA systems showed substantial reductions in the PDI following dialysis, while the PDI of empty LNPs generally remained the same or slightly increased following dialysis</li> <li>• The increase in the particle size that occurred after dialysis was much higher with LNP-siRNA systems than with empty LNPs</li> <li>• Empty LNPs displayed a similar small particle size at FRR = 3 and 5; however, the particle sizes (and PDI) before and after dialysis were much larger at FRR = 1.</li> <li>• For LNP-siRNA, the particle sizes stayed relatively consistent before dialysis regardless of FRR.</li> <li>• A similar observation was made for the post-dialysis samples, all formulations displayed similar sizes that are generally larger than their pre-dialysis counterparts. This indicates that the presence of anionic cargo such as siRNA limits the rearrangement of lipids.</li> <li>• The method of pH neutralization process in manufacturing is important to obtain LNP-siRNA with desirable properties (defined particle sizes, low polydispersity indices, and high entrapment)</li> <li>• LNP-HA systems (LNP containing HA - complexes with HA with molecular weight similar to that of siRNA) demonstrated that the degree of change in particle size caused by FRR was smaller than that of empty LNPs but larger than that of LNP-siRNA systems, suggesting that the binding affinity of small vesicles with anionic cargos plays a significant role in the formulation of the LNP complexes. Further studies are required to determine how different types of anionic cargos (modified nucleic acids or peptides) influence nanoparticle formation.</li> <li>• CD8 T cell response heavily depends on the LNP composition</li> <li>• Critical effects:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- Single effects:           <ul style="list-style-type: none"> <li>DMG-PEG2000; PEG-lipid,</li> <li>DSG-PEG2000; PEG-lipid and ionizable lipid</li> <li>DSPE-PEG1000; PEG-lipid and ionizable lipid</li> </ul> </li> <li>- Interaction effects:</li> </ul> </li> </ul>
[21]	

	<p>DMG-PEG2000; PEG-lipid and DOPE  DSG-PEG2000; PEG-lipid and DOPE; ionizable lipid and PEG-lipid; ionizable lipid and DOPE  DSPE-PEG1000; PEG-lipid and DOPE</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Quadratic effects: <ul style="list-style-type: none"> <li>DMG-PEG2000; PEG-lipid</li> <li>DSG-PEG2000; PEG-lipid</li> <li>DSPE-PEG1000; DOPE, ionizable lipid, PEG-lipid</li> </ul> </li> <li>T cell response is most sensitive to changes in %PEG-lipid, followed by changes in %DOPE and %ionizable lipid respectively for all types of PEG lipid</li> <li>Changes in %ionizable lipid have a bigger mean impact on T cell response for DSG-PEG2000 LNPs (S= 27%) than for DMG-PEG-2000 (S=21) and DSPE-PEG1000 LNPs (S=16).</li> <li>The ratio of T cell response sensitivity to changes in %PEG-lipid over changes in %ionizable lipid is highest for DSPE-PEG1000LNPs (49/16 = 3), followed by DMG-PEG2000 (42/21 =2) and DSG-PEG2000 (37/27=1.4).</li> <li>quasi-constant sensitivity of the immune response to %DOPE (around 36%), only the ratio %PEG-lipid/%ionizable lipid depends on the PEG-lipid type.</li> <li>For all PEG-lipid types, the predicted optimal T cell response region corresponded to high percentages of the ionizable lipid SS-EC (&gt;50%) and low percentages of PEG lipid (&lt;10%)</li> <li>DSPE-PEG1000 LNPs were excluded - the model could not be validated and unpredictable behaviour and visual toxicity in mice (lethargy, pain symptoms) were observed</li> <li>Optimal LNPs compositions: <ul style="list-style-type: none"> <li>DMG-PEG2000: ionizable lipid 56.5%, DOPE 5.25%, Cholesterol 37.75%, PEG-lipid 0.5%</li> <li>DSG-PEG2000: ionizable lipid 64.4%, DOPE 8%, Cholesterol 27.1%, PEG-lipid 0.5%</li> </ul> </li> <li>Exemplary optimal LNP formulation candidates: <ul style="list-style-type: none"> <li>max potency (weight 1.0, predicted 100.3%), min size (weight 0.2, predicted 68.2 nm): 5% PEG, 48.07% Helper, 10% ionizable lipid, 36.93% Cholesterol, ionizable lipid type H102, flow rate 2.57 mL/min, desirability 0.9895</li> <li>max potency (weight 1.0, predicted 94.2%), min size (weight 0.2, predicted 78.8 nm), force H103, 5% PEG, 45.01% Helper, 10% Ionisable lipid, 39.99% Cholesterol, Ionisable lipid type H103, flow rate 2.56 mL/min, desirability 0.8485</li> <li>max potency (weight 1.0, predicted 101.5%): 5% PEG, 41.88% Helper, 10% Ionisable lipid, 43.12% Cholesterol, Ionisable lipid type H102, flow rate 1.00 mL/min, size (predicted) 100.6 nm, desirability 0.9954</li> </ul> </li> </ul>	[22]
[23]	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vitro transcription space-time yield (STY) significant factor: <ul style="list-style-type: none"> <li>volume flow rate - the biggest influence</li> <li>nucleotide and enzyme concentrations and their interactions with each other and with the volume flow rate</li> </ul> </li> <li>In-line Dialfiltration by SPT significant factor: <ul style="list-style-type: none"> <li>TMP (transmembrane pressure) and the volumetric flow rate of the exchange buffer - the most significant effects on the buffer exchange BE and the volumetric concentration factor VCF</li> <li>optimum is at a TMP of 1.4 bar and a buffer exchange flow rate of 13 mL/min</li> </ul> </li> <li>LNP significant factor: <ul style="list-style-type: none"> <li>encapsulation efficiency (EE) - optimal &gt; 80%</li> <li>mRNA concentration - optimal approx. 0.26-0.30 g/L</li> <li>volume flows of the aqueous (optimal approx. 250-295 mL/min) and organic phases</li> <li>lipids concentrations and their interaction - optimal PEG lipids concentration approx.1.2-1.6 g/L, cholesterol concentration approx. 4.7-6.3 g/L</li> <li>pH influence on EE</li> </ul> </li> </ul>	[23]
[24]	<ul style="list-style-type: none"> <li>MiRNAs are the most studied small ncRNAs</li> <li>More in vivo studies are required to determine whether miRNAs target specific cells under physiological conditions. Nevertheless, the current knowledge represents only a small fraction of the landscape of gene regulatory potential</li> <li>The most important characteristics of nanosystems are zeta potential, particle size and size distribution, shape, morphology, cellular uptake, and transfection efficiency</li> <li>The positively charged nanoparticles can encapsulate negatively charged genetic material by electrostatic interaction</li> <li>Cationic liposomes and cationic polymers generally represent safe and efficient carriers for successful gene delivery</li> <li>Implementing QbD concept could bring a lot of advantages essential to developing non-viral vectors with reproducible physicochemical properties suitable for large-scale production</li> <li>Cationic lipids for gene delivery have become a major research tool for transferring genetic material into cells and there is great potential for progress in this direction</li> </ul>	[24]
[25]	<ul style="list-style-type: none"> <li>The specific combination of ionizable lipid and phospholipid in the LNP design yields high transfection efficiency <i>in vitro</i></li> <li>high-performing LNPs have no toxicity to both the pregnant mice and fetuses</li> <li>LNPs composed of ionizable lipid, C12-200, with DOPE phospholipid, are required for potent mRNA delivery to trophoblasts</li> <li>type of ionizable lipid was a main effect for apparent pKa (p&lt;0.001) with C12-200 in LNPs yielding lower apparent pKa values compared to DLin-MC3-DMA</li> </ul>	[25]

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LNP A10 (35% C12-200, 10% DOPE, 1.5% PEG, 53.5% Cholesterol; 130.2 nm HDD, 0.064 PDI, 56.5% EE, 6.607 pKa) yielded ~190,000-fold higher luciferase expression compared to phosphate-buffered saline (PBS)-treated cells (<math>p&lt;0.0001</math>)</li> <li>• LNPs A5 (25% C12-200, 22% DOPE, 2.5% PEG, 50.5% Cholesterol; 142.2 nm HDD, 0.126 PDI, 64.9% EE, 6.067 pKa), A8 (25% C12-200, 22% DOPE, 3.5% PEG, 49.5% Cholesterol; 131.2 nm HDD, 0.096 PDI, 64.0% EE, 6.031 pKa), and A14 (35% C12-200, 16% DOPE, 2.5% PEG, 46.5% Cholesterol; 110.2 nm HDD, 0.139 PDI, 64.0% EE, 5.619 pKa) had the next highest luciferase expression compared to PBS-treated cells (<math>p&lt;0.0001</math>)</li> <li>• No LNPs prepared with DLin-MC3-DMA or DSPC yielded high luciferase expression</li> <li>• The majority of LNP formulations are not toxic to BeWoS</li> <li>• Type of ionizable lipid (<math>p=0.018</math>) and type of phospholipid (<math>p=0.017</math>) were significant factors affecting transfection</li> <li>• C12-200 or DOPE in LNPs yielded the strongest luciferase expression overall compared to the other LNP components</li> <li>• Maximal transfection efficiency occurs when C12-200 and DOPE are both included in the LNP formulation (<math>p=0.0105</math>)</li> <li>• The model found several pairwise interactions between the type of ionizable lipid and PEG amount (<math>p=0.036</math>), type of phospholipid and PEG amount (<math>p=0.034</math>), and type of ionizable lipid and type of phospholipid (<math>p=0.0105</math>)</li> <li>• Type of ionizable lipid (<math>p=0.005</math>), type of phospholipid (<math>p=0.018</math>), ionizable lipid amount (<math>p&lt;0.0001</math>) and phospholipid amount (<math>p=0.016</math>) were significant factors affecting the viability of BeWoS</li> <li>• The two LNPs that resulted in significantly lower viability compared to the controls were comprised of DLin-MC3-DMA and DOPE - 25% and 10%, respectively</li> <li>• The model found pairwise interactions between the type of phospholipid and phospholipid amount (<math>p&lt;0.0001</math>) and type of phospholipid and ionizable lipid amount (<math>p&lt;0.0001</math>)</li> <li>• Results in vitro do not correlate with delivery efficiency in vivo, optimal LNP composition for high placenta delivery in vitro is different than optimal LNP composition for high in vivo mRNA delivery in trophoblasts</li> <li>• Optimal LNP A10 (35% C12-200, 10% DOPE, 1.5% PEG, 53.5% Cholesterol; 130.2 nm HDD, 0.064 PDI, 56.5% EE, 6.607 pKa)</li> <li>• LNP A10 is nontoxic to both the dams and the fetuses following treatment</li> <li>• DSD method identifies LNP formulation capable of safely delivering mRNA to the placenta, providing an opportunity to treat placental dysfunction during pregnancy</li> </ul>
[26]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HEPES-acetate concentration in buffer treatment is critical for stabilizing the size of nascent LNPs</li> <li>• LNPs can be dialyzed against formulation buffer after stabilization without significant variation in sizes</li> <li>• buffer strength and pH have critical impacts</li> <li>• optimal LNPs diameter 60–180 nm (<math>\pm 10</math> nm), PDI <math>\leq 0.200</math></li> </ul>
[27]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desirable LNPs have the following physicochemical characteristics: <ul style="list-style-type: none"> <li>- particle size (Z-average diameter) between 80 and 100 nm,</li> <li>- polydispersity index (PDI) less than 0.2</li> <li>- encapsulation efficiency (EE) at least 80%,</li> <li>- neutral zeta potential</li> </ul> </li> <li>• The presence of PEG was crucial for improved physicochemical properties of LNPs</li> <li>• It is optimal to minimize the PEGylated lipid content (danger of hypersensitivity reactions or anaphylactic shock)</li> <li>• Increasing TFR significantly reduced the hydrodynamic diameter of particles</li> <li>• Greater turbulence produced by a higher TFR may prevent neutral lipids from aggregating before encapsulating the RNA molecules</li> <li>• Temperature had a significant role in affecting particle size LNPs were smaller as temperature increased during formulation</li> <li>• Aqueous-phase pH affects particle size, increasingly acidic (lower) pH results in smaller particles</li> <li>• Size was negatively correlated with a higher N/P ratio</li> <li>• Significant parameters for size did not overlap with those for PDI</li> <li>• PDI was affected by phospholipid type and content, ionizable lipid type, and RNA type</li> <li>• PDI was highest in DSPC-containing LNPs formulated with low phospholipid content</li> <li>• EE was significantly affected by temperature, phospholipid content, and ionizable content</li> <li>• EE was generally highest at a midrange ambient temperature (20°C) with midrange phospholipid content (15%) and midrange ionizable lipid content (40%)</li> <li>• Encapsulated RNA and PDI were significantly different between the mRNA and saRNA</li> <li>• Both RNA types were affected by the ionizable lipid type and content, and temperature</li> <li>• The same LNP technology can be used interchangeably between saRNA and mRNA</li> <li>• saRNA can replace current mRNA-optimized LNP systems with relative ease and minimal optimization required in terms of process conditions</li> <li>• Ionizable lipid type played a critical role in protein expression</li> <li>• MC3-containing LNPs did not enable potent protein expression relative to the other ionizable lipids</li> <li>• The highest levels were observed in LNPs containing ALC-0315, followed by those containing SM-102</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein expression increased with higher ionizable lipid content and pH, and this effect was strongest when SM-102 was used</li> <li>• Optimal Conditions for siRNA-LNP Formulation with Regards to Cellular Activation or LNP CQAs:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- phospholipid content (mol%): 15.9 (minimize cellular activation); 17.5 (maximize cellular activation); 17.5 (optimize CQAs)</li> <li>- aqueous-phase pH: 4.53 (minimize cellular activation); 6 (maximize cellular activation); 5.25 (optimize CQAs)</li> <li>- ionizable lipid type: ALC-0315 (minimize cellular activation, optimize CQAs) SM-102 (maximize cellular activation)</li> <li>- ionizable lipid content (mol %): 45 (minimize cellular, maximize cellular activation); 35 (optimize CQAs)</li> <li>• fixed parameters: N/P ratio: 10; phospholipid type: DOPE; DMG-PEG-2000 content: 1.25 %;mol; total flow rate: 16 mL/min, ambient temperature during formulation: 20°C</li> </ul> </li> <li>• Ionisable cationic lipid (ICL):       <ul style="list-style-type: none"> <li>- strong correlation between pKa and in vivo activity</li> <li>- ideally pKa in the range of 6.2-6.5, neutral at neutral pH (7.4) and positively charged at acidic pH (&lt;6.0)</li> <li>- ICLs outside the range 6.2-6.5 display a rapid decline in hepatic gene silencing activity, emphasizing the importance of the ionization behaviour</li> </ul> </li> <li>• Linker       <ul style="list-style-type: none"> <li>- linker oxygen plays a key part in transfection efficacy, affects the pKa, controls the chemical and enzymatic stability of the lipid</li> <li>- depending on the structure, linkers are grouped into ethers, esters, amides, carbamates and disulfide groups</li> <li>- the spacing between the headgroup and the linker (steric hindrance) impacts transfection efficiency</li> </ul> </li> <li>• Lipid tail:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- lipid tail double bond content (saturation/unsaturation), length, level of substitution and the tail structure (branched vs. linear) can affect the transfection efficiency</li> </ul> </li> <li>• Helper lipids       <ul style="list-style-type: none"> <li>- the chemistry and concentration of helper lipids affect nanoparticle surface charge and impact the distribution and effectiveness of nanoparticles in specific tissue</li> <li>- e.g. DOFC-neutral helper lipids preserved liver targeting.</li> <li>- anionic helper lipids (phosphatidylserine, phosphatidylglycerol and phosphatidic acid) increased the distribution to the spleen</li> <li>- DOTAP-cationic lipids shifted the protein expression to the lung</li> </ul> </li> <li>• Cholesterol       <ul style="list-style-type: none"> <li>- improves intracellular delivery by promoting the fusion of the LNP with the membrane of endosomes in the presence of unsaturated lipids depending on its percentage in the composition</li> <li>- high concentrations of cholesterol enhance the activity of cationic lipids which supports the aforementioned fusogenicity</li> </ul> </li> <li>• PEG-lipid       <ul style="list-style-type: none"> <li>- PEGylation decreases particle size prevents LNP aggregation during storage and extends the shelf-life</li> <li>- PEGylation chemistry and the density of PEG on the LNP surface can modify the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the LNPs</li> <li>- PEG with molecular weight - 2 kDa is used for LNP modification in a ratio &lt;5%</li> </ul> </li> <li>• Particle size:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- preferential: 20-200 nm</li> <li>- optimal for cellular uptake - about 100 nm</li> </ul> </li> <li>• Zeta potential (charge of the formulated LNP):       <ul style="list-style-type: none"> <li>- crucial for sufficient exposure in the circulation and uptake into tissue</li> <li>- high surface charge, either positive (+30 mV) or negative (-30 mV), usually results in faster blood clearance</li> <li>- neutrally charged LNPs (from -10 to +10 mV) promote prolonged blood circulation</li> <li>- positively charged NPs exhibited higher internalization than neutral or negatively charged NPs owing to the interaction with the cell membrane which is negatively charged, resulting in increased toxicity</li> </ul> </li> <li>• LNPs with near-neutral zeta potential have been predominantly used in the clinic</li> <li>• LNP composition:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- ionisable lipid: 40-50 mol%, phospholipid: 10-12 mol%, cholesterol: 38-45 mol%, PEG lipid: 1-2 mol%</li> <li>- ICL content influences the morphology and encapsulation efficiency</li> <li>- 30% rise in the ICL molar ratio (reduction of cholesterol content) resulted in a reduction of encapsulation efficiency, although the same solid core structure was maintained</li> <li>- cholesterol influences the morphology and the encapsulation</li> <li>- using an inadequate molar ratio leads to a decreased encapsulation</li> </ul> </li> <li>• PEG lipid:       <ul style="list-style-type: none"> <li>- higher content, decreased encapsulation efficiency</li> <li>- smaller size as the PEG-lipid content is increased</li> </ul> </li> </ul>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LNPs with low PEG-lipid content (0.5 mol%), have the best gene silencing activity, owing to the superior endosomal release</li> <li>• Formulation and manufacturing</li> <li>- microfluidic technologies</li> <li>- T-junction mixing</li> <li>- hydrodynamic flow focusing</li> <li>- staggered herringbone and toroidal mixer</li> <li>• Stability profile</li> <li>- to improve LNP-RNA stability the following strategies were used: the addition of buffers, surfactants and other excipients, effective process controls, freezing or lyophilization using appropriate cryoprotectants (sucrose, trehalose or mannitol)</li> <li>• Delivery to the liver and beyond the liver, Biodistribution and pharmacokinetics:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- intravenous administration</li> <li>- subcutaneous, intradermal and intramuscular administration</li> <li>- oral administration</li> </ul> </li> </ul>
[29]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LNP size is the most critical material attribute of stability, far ahead of the PEG proportion</li> <li>• stability is increasing with PEG proportion) but decreasing with the LNP size</li> <li>• PEG concentration is the most critical factor impacting transfection efficiency, and LNP size is the least influential factor</li> <li>• DOTAP and Lecithin proportions do not appear as active factors</li> </ul>

---

### 10.3. Publikacja P3

Michałek S., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Zagozda M., Maj A. M., Ochal Z.,  
Dubiel K., Wieczorek M.;

The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed  
oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of  
phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415);

RSC Adv., 2022, 12, 33605-33611, <https://doi.org/10.1039/d2ra07003k>

IF: 3,9; MNiSW: 100

Cite this: *RSC Adv.*, 2022, 12, 33605

## The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)<sup>†</sup>

Stanisław Michałek,<sup>a,b</sup> Lidia Gurba-Bryskiewicz,<sup>a</sup> Wioleta Maruszak,<sup>a</sup> Marcin Zagozda,<sup>a</sup> Anna M. Maj,<sup>b,\*</sup> Zbigniew Ochal,<sup>b</sup> Krzysztof Dubiel<sup>a</sup> and Maciej Wieczorek<sup>a</sup>

Received 4th November 2022  
Accepted 11th November 2022

DOI: 10.1039/d2ra07003k

rsc.li/rsc-advances

Herein, we describe the development of a green, scalable flow Pd-catalyzed aerobic oxidation for the key step in the synthesis of CPL302415, which is a new PI3K $\delta$  inhibitor. Applying this environmental-friendly, sustainable catalytic oxidation we significantly increased product yield (up to 84%) and by eliminating of workup step, we improved the waste index and E factor (up to 0.13) in comparison with the stoichiometric synthesis. The process was optimized by using the DoE approach.

The first class of PI3K (phosphoinositide 3-kinase) inhibitors including four heterodimeric proteins (PI3K $\alpha$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$ , and PI3K $\theta$ ) is considered to be very attractive for the treatment of many diseases like SLE (Systemic Lupus Erythematosus), MS (Multiple Sclerosis), asthma and another inflammatory, autoimmune and respiratory diseases.<sup>1</sup> Recently we published the synthesis, biological activity, and toxicology of a new PI3K $\delta$  inhibitor based on the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine core the CPL302415 (Fig. 1) which is now under evaluation for the treatment of Systemic Lupus Erythematosus.<sup>2</sup> A critical step in its synthesis is oxidation of primary alcohol the {5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1*H*-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl}methanol (**1**) to an aldehyde 5-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-carbaldehyde (**3**) in penultimate step. The selective oxidation of pharmaceutical precursors, which are often complex organic molecules bearing multiple functional groups, is generally very demanding.<sup>3</sup> In our case, not only catalyst must selectively carry out the oxidation of the alcohol group to the aldehyde with high efficiency but also recover one double bond in the benzimidazole ring, which is very important for CPL302415 stability. Also, the whole oxidation step should be economically and environmentally sustainable and easily integrate with large-scale production of

active pharmaceutical ingredient (API) (CPL302415). An additional problem in this reaction is the very low solubility of **1**.

For this transformation we have already explored 15 oxidation procedures therein: MnO<sub>2</sub>,<sup>4</sup> Dess-Martin Periodinane (DMP),<sup>5</sup> ABNO/CuI/NMI,<sup>6</sup> TEMPO/NaBr/NaOCl,<sup>7</sup> TEMPO/tBuONO/HCl,<sup>7</sup> TEMPO/tBuNBr/NaOCl,<sup>7</sup> TEMPO/BuNBr/OXONE®,<sup>8</sup> IBX,<sup>9</sup> IBX/Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub>/OXONE®,<sup>10</sup> NaOCl/Bu<sub>4</sub>NBr,<sup>11</sup> Pt-Bi/C/KOH/air,<sup>12</sup> Pt-Bi/C/O<sub>2</sub>,<sup>13</sup> Pt-Bi/C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,<sup>11</sup> Ru/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Air<sup>14</sup> or O<sub>2</sub>,<sup>15</sup> Aurolite®/O<sub>2</sub>,<sup>16</sup> and only two methods resulted in the formation of the desired product. Although the oxidations with activated MnO<sub>2</sub> and DMP were sufficient to produce 250 g of **3**, due to unsatisfactory yield on a large-scale, purification problems, and a huge quantity of waste generated in those reactions as well as commercial goals the alternative oxidation procedure was necessary. The Dess-Martin procedure is too expensive in large-scale production while oxidation with MnO<sub>2</sub> requires 10-fold excess of MnO<sub>2</sub>. Besides it, the reaction is strongly dependent on the quality of MnO<sub>2</sub> lot and sometimes a longer reaction time is required to obtain a high yield. Moreover, we also

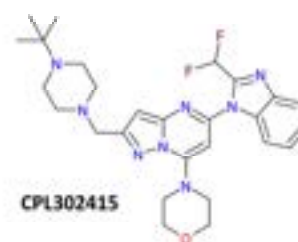


Fig. 1 Structure of CPL302415.

<sup>a</sup>Celon Pharma S.A., Ul. Maryncka 15, 05-152 Kazanów, Poland. E-mail: anna.maj@celonpharma.com

<sup>b</sup>Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, Ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2ra07003k>





confronted the problem with the adsorption of the desired product on the surface of  $\text{MnO}_2$ . Thus we turned towards an aerobic oxidation with molecular oxygen as a stoichiometric oxidant, which is preferred on large scale because of its low cost, and insignificant environmental impact, as well into flow techniques which are the safe and scalable technology leading at intensified conditions to maximizing yield and throughput.<sup>17–20</sup> The aim of this work was to develop flow aerobic oxidation of 5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1*H*-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)methanol (**1**) to 5-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-carbaldehyde (**3**) the precursor of CPL302415 in the presence of cheap and environmental-friendly catalyst, in order to achieve the commercial goal. In this objective, we adopted the already known  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ /pyridine catalytic system,<sup>20</sup> but to our knowledge, it has not yet been used in the oxidation of such a complicated molecule with the pharmaceutical interest. For this purpose, we also applied DoE approach,<sup>21</sup> a structured, cost-effective statistical method to organize, limit the number of experiments, determine critical process parameters and their interactions as well, and set the optimal reaction conditions for high yield and low levels of impurities.<sup>22</sup>

Flow experiments were performed using a combined two Vapourtec easy-Medchem systems comprising peristaltic pumps and together with four PFA tubular reactors (10 mL, id = 1 mm) (Fig. 2). The second Vapourtec easy-Medchem system was used only for heating additional two reactors, the temperature was set manually. The two liquid feeds were introduced with peristaltic pumps and oxygen gas was introduced through a mass flow controller (Vapourtec SF-10 pump; input pressure 5 bar). The System Solvent Bottle was filled with toluene. The substrate feed and gas feed were mixed using a Y-shaped mixer, then run through a 28 cm (id = 1 mm) tube to enable substrate solution to saturate it with oxygen and later combined with catalyst solution. The reaction was performed first within two heated PFA tubular reactors (10 mL, id = 1 mm). Next, in order to extend the reaction time, the reaction mixture feed was supplemented with oxygen and transferred into two additional heated PFA tubular reactors (10 mL, id = 1 mm). The pressure

was applied by using an adjustable back pressure regulator (BPR - Vapourtec SF-10 pump, set up pressure = 5 bar). The oxygen feeds were always set at the same value for each mass flow controller. For all flow experiments, fractions were collected at the end of the reaction and analyzed offline with UHPLC. The different reactions were controlled with Flow-Wizard™ software which calculated reaction time, and operated the easy-Medchem system and the collection/waste valve. Previously,<sup>20</sup> the catalyst has been reported to slowly decompose in absence of oxygen and it was oxygenated before adding the substrate but surprisingly, in our case, we observed better results when the substrate was oxygenated first and then the solution of the catalyst was added. The DoE study and statistical analysis were performed by using the design of experiment tools of STATISTICA software (v.13.3).<sup>23,24</sup>

For the first screening, we have implemented a six-parameter two-level fractional factorial experimental design plan ( $2^6(6-3)$ ) (Table 1) containing ten experiments and including two repeats at a center point for the reproducibility study.

The following parameters were considered for the multivariate optimization: catalyst loading, equivalents of pyridine per catalyst, temperature, oxygen pressure, the flow of oxygen, and finally, the flow of the catalyst and substrate solutions. In order to facilitate the adequate mixing of the streams, and secure the appropriate substrate/catalyst ratio, flows of the catalyst and substrate solutions were identical. To ensure the solubility of all the reaction components, substrate **1** was dissolved in a mixture of toluene and caprolactone, and in addition, we carried out our flow experiments at a very low concentration (0.0125 M). The temperature varied between 80–120 °C, the oxygen pressure between 2–5 bar, the rate of reagents and oxygen between 0.1–1.0 mL min<sup>-1</sup>, the catalyst loading from 5–40%, and base equivalents from 1.3 to 4.0 equivalents per catalyst. The aerobic flow oxidation of **1** (the CPL302415 precursor) may lead to multiple products: the alcohol with recovered double bond in benzimidazole ring (**2**), the desired aldehyde with recovered double bond (**3**), and overoxidized acidic product **4**. In our case, we observed mainly products **2** and **3**, and the acidic product was formed in a very limited quantity under specific conditions (see ESI†).

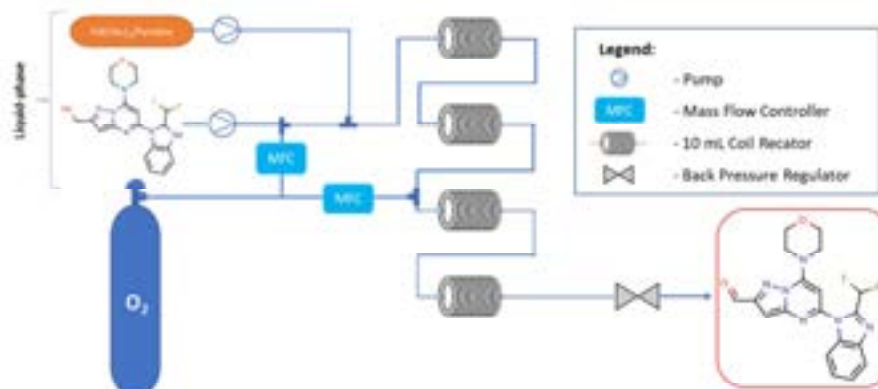
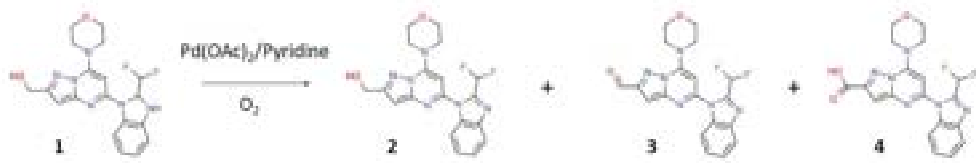


Fig. 2 Continuous flow setup for the Pd-catalyzed oxidation of alcohol **1** to aldehyde **3**.



Table 1 Input parameters and results from CCD DoE 2<sup>k</sup>(6–3) plan performed in flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine catalyzed aerobic oxidation of 1<sup>a</sup>


Entry	Catalyst loading (mol%)	Pyridine eq. per catalyst	T (°C)	P <sub>O<sub>2</sub></sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	V of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of 1 <sup>b</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 3 <sup>b</sup> (%)	Yield of 4 <sup>b</sup> (%)
1	5	1.3	80	5	1.0	1.0	9.7	7.4	2.3	0.0
2	5	1.3	120	5	0.1	0.1	12.3	0.0	12.2	0.0
3	5	4	80	2	0.1	1.0	39.0	38.9	0.0	0.0
4	5	4	120	2	1.0	0.1	4.8	4.8	0.0	0.0
5	22.5	2.65	100	3.5	0.55	0.55	51.6	0.0	51.6	0.0
6	22.5	2.65	100	3.5	0.55	0.55	51.1	0.0	51.1	0.0
7	40	1.3	80	2	1.0	0.1	21.7	0.0	21.6	0.0
8	40	1.3	120	2	0.1	1.0	80.2	0.0	80.2	0.0
9	40	4	80	5	0.1	0.1	44.2	0.0	44.2	0.0
10	40	4	120	5	1.00	1.0	60.6	0.0	60.6	0.0

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/caprolactone = 1 : 1. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for details see supplementary material.

Based on the DoE screening study results gathered in Table 1 the mathematical model with the main linear effects for the product 3 yield was generated with a good fit to the experimental data,  $R^2 = 0.86$ . ANOVA analysis shows that catalyst loading, temperature, reagents flow rate, and O<sub>2</sub> pressure have a statistically significant ( $p < 0.05$ ) influence on the product 3 yields. The quantity of catalyst has the most important positive effect ( $p = 0.0032$ ) on the aldehyde yield. Next, the temperature ( $p = 0.0072$ ) and reagents flow speed ( $p = 0.0094$ ) have also

a beneficial effect on the yield of 3 however, the flow speed of O<sub>2</sub> has a negative influence ( $p = 0.0116$ ), diminished the yield of the desired product. O<sub>2</sub> pressure has a small positive effect ( $p = 0.0347$ ) whereas the effect of equivalents of pyridine per catalyst is near the significance level limit ( $p = 0.052$ ) (Fig. S1†).

Because the screening study with fractional factorial design examines only main linear effects further optimization study was performed by using central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). It has been performed

Table 2 Input parameters and results from DoE response surface methodology performed in flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine catalyzed aerobic oxidation of 1<sup>a</sup>

Entry	Catalyst loading (mol%)	T (°C)	V of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of 1 <sup>b</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 3 <sup>b</sup> (%)
1	5	80	0.1	0.4	0.4	0.0
2	5	80	1.0	17.0	17.0	0.0
3	5	120	0.1	12.3	0.0	12.2
4	5	120	1.0	6.4	0.4	6.0
5	40	80	0.1	20.8	0.0	20.8
6	40	80	1.0	41.2	0.0	41.2
7	40	120	0.1	36.3	0.0	36.3
8	40	120	1.0	70.4	0.0	70.4
9	5	100	0.55	6.0	4.4	1.6
10	40	100	0.55	27.4	0.0	27.4
11	22.5	80	0.55	6.5	0.0	6.5
12	22.5	120	0.55	39.1	0.0	39.1
13	22.5	100	0.1	22.3	0.0	22.3
14	22.5	100	1.0	15.0	0.0	15.0
15	22.5	100	0.55	24.1	0.0	24.1
16	22.5	100	0.55	22.6	0.0	22.6
17	22.5	100	0.55	22.6	0.0	22.6

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate 1 = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/caprolactone = 1 : 1; P<sub>O<sub>2</sub></sub> = 5 bar; catalyst/pyridine = 1/1.3; V<sub>O<sub>2</sub></sub> = 0.1 mL min<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for details see ESI.



with three variable parameters (with the most significance from screening DoE) *i.e.*: catalyst loading, temperature, and reagents flow rate (Table 2). Values of the other parameters were selected to maximize the aldehyde product yield based on the results of the analysis screening step. Oxygen pressure was set up at 5 bar (the higher, the higher efficiency), the flow of oxygen at 0.1 mL min<sup>-1</sup> (the lower, the greater efficiency), and equivalents of pyridine per catalyst on 1.3 eq. (no significant effect on efficiency).

CCD model has good fit,  $R^2 = 0.92$ . The main statistically significant effects of tested parameters on the aldehyde yield are linear, similarly to those obtained from fractional factorial design. Only an additional interaction effect of the catalyst loading with the flow of reagents as a statistically significant positive effect ( $p = 0.0157$ ) was identified. Quadratic effects are not statistically significant (Fig. S2†). The catalyst loading has the most positive influence ( $p = 0.0024$ ) on the aldehyde product yield based on this CCD (RSM) model. Then, the

temperature ( $p = 0.0080$ ) and the flow of the reactants ( $p = 0.0414$ ) have a positive effect as well.

As it results from the CCD model of maximum predicted aldehyde product yields in the tested range are not greater than 80% at the maximum value of the catalyst loading (40%), temperature (120 °C), and reactants flow (1.0 mL min<sup>-1</sup>) (Fig. 3).

Based on the literature data<sup>25</sup> and the experience with catalytic reactions, our doubts were raised by the lack of dependence of the reaction efficiency on pyridine eq. per catalyst. We conducted additional DoE experiments according to the D-optimal plan with three variable parameters, catalyst loading, equivalents of pyridine per catalyst, and reagents flow (Table 3). Oxygen pressure was set up at 5 bar, the flow of oxygen at 0.1 mL min<sup>-1</sup>, and the temperature at 120 °C. The obtained model confirms that pyridine eq. per catalyst has little effect on the reaction yield (Fig. S3†).

Moreover, the obtained results confirmed that in the investigated range, the maximum predicted performance is 85% with the maximum value of catalyst loading equaling 40%, the flow of each liquid reagent equals 1.0 mL min<sup>-1</sup> and pyridine eq. per catalyst equals 4, (84% for pyridine eq. per catalyst equals 1.3)

Initially, we carried out the oxidation of **1** in pure toluene. At 120 °C under 5 bars of oxygen, and in reagents flow rate = 0.4 mL min<sup>-1</sup> we observed 89% yield of **3**, while the original stoichiometric procedures with MnO<sub>2</sub> or DMP gave us only 68% or 78% yield respectively. Yet in some cases using pure toluene the substrate precipitated in the inlet feeding tubes before the pump even when the substrate solution was preheated and with additional isolation of inlet tubes, this made the procedure uncertain and unrepeatable. The addition of caprolactone to toluene let us solubilize alcohol **1** and carry out the reaction in flow conditions without precipitation of **1**, thus we performed the optimization in the toluene/caprolactone mixture. However, we observed a similar or higher yield in comparison to stoichiometric methods (78% of **3**), the caprolactone, due to its high boiling temperature (241 °C) and good miscibility with water and organic solvents, generated problems in the purification of the final product (CPL302415) in large scale and it was almost impossible to separate it without using column chromatography. Thus, we also tried oxidation of **1** in a mixture of

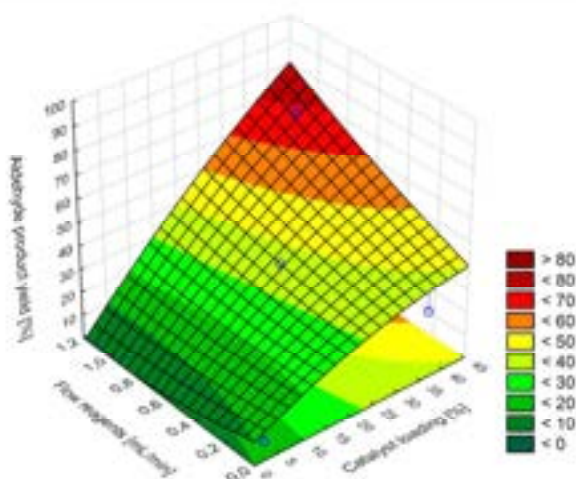


Fig. 3 Surface response for aldehyde product yield, central composite design model 2<sup>3</sup>(3), temperature = 120 °C,  $P_{O_2} = 5$  bar,  $V_{O_2} = 0.1$  mL min<sup>-1</sup>.

Table 3 Input parameters and results from DoE D – optimal plan performed in flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine catalyzed aerobic oxidation of **1**.<sup>a</sup>

Entry	Catalyst loading (mol%)	Pyridine eq. per catalyst	$V$ of reagents (mL min <sup>-1</sup> )	Conv. of <b>1</b> <sup>b</sup> (%)	Yield of <b>2</b> <sup>b</sup> (%)	Yield of <b>3</b> <sup>b</sup> (%)
1	5	1.3	0.1	51.3	0.0	44.2
2	5	1.3	1.0	22.1	1.1	19.5
3	5	2.65	0.55	19.7	0.0	18.4
4	5	4	1.0	44.3	1.7	36.5
5	22.5	1.3	0.55	63.6	0.0	57.7
6	22.5	2.65	1.0	70.4	0.0	70.4
7	22.5	4	0.1	83.0	0.0	70.1
8	40	1.3	0.1	97.5	3.3	52.1
9	40	1.3	1.0	92.4	0.0	81.2
10	40	4	1.0	88.5	1.6	79.4

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL toluene/caprolactone = 1 : 1;  $P_{O_2} = 5$  bar;  $T = 120$  °C;  $V_{O_2} = 0.1$  mL min<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> % determined by UHPLC for.



## Paper

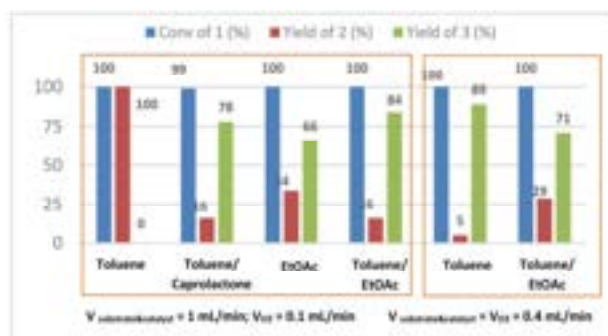


Fig. 4 Other solvents screened for the Pd-catalyzed oxidation of **1**. Standard reaction conditions: substrate **1** = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL; catalyst = 20 mol%; catalyst/pyridine = 1/1.3;  $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

toluene and ethyl acetate (1:1) and we observed similar tendencies as in the case of reactions performed in the toluene/caprolactone mixture (see ESI† Table S3). The toluene/ethyl acetate mixture turned out to be the most promising option for us, because of better solubility of our substrate and product in this mixture than in pure even preheated toluene. The substrate did not precipitate any more in inlet tubes and the procedure becomes repetitive. The 1 g test carried out under the best conditions *i.e.* catalyst = 20 mol%; catalyst/pyridine = 1/1.3;  $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $P_{\text{O}_2} = 5\text{ bar}$ ;  $V_{\text{O}_2} = 0.1\text{ mL min}^{-1}$ ;  $V_{\text{reagents}} = 1\text{ mL min}^{-1}$  and operated during 100 min resulted in productivity  $0.589\text{ g h}^{-1}$  of **3**. What's more, we obtained very good results towards selective oxidation of alcohol to an aldehyde group, 84% yield of product **3** having a double bond in the benzimidazole ring we also got less alcohol **2** (Fig. 4). While the counterpart experiment carried out in a batch autoclave gave only 45% yield (see ESI†). That solvent mixture had also two additional and pivotal advantages, especially regarding large scale production, can be used as the reaction mixture without any workup and proceed with the next and simultaneously final step in the synthesis of the 5-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-carbaldehyde our CPL302415 and beside the EtOAc is four times cheaper than caprolactone.

The comparison of the qualitative and quantitative green metrics<sup>26</sup> between Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine in toluene/EtOAc mixture, MnO<sub>2</sub>, and Dess–Martin procedures (Table 4) clearly shows the benefits of the flow Pd-catalyzed process over the stoichiometric methods. Using Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine we got a higher yield of more than 6 or 17% respectively, moreover, the catalytic process is also characterized by a higher atom economy (AE) and higher reaction mass efficiency (RME).

Contrary to the Dess–Martin process, which necessitates the undesirable DMF, the synthesis with Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine and MnO<sub>2</sub> use the mixture of toluene and EtOAc or BuOAc admitted as acceptable or green solvents.<sup>26,27</sup> Furthermore from the environmental point of view as manganese is considered a critical element,<sup>28</sup> the supply of which may run out in the next 5–50 years, thus the tenfold excess of MnO<sub>2</sub> required to achieve

Table 4 Green metrics for the catalytic flow protocol and stoichiometric oxidations of **1**<sup>a, b</sup>

Criterion	Pd(OAc) <sub>2</sub> /pyridine	MnO <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Dess–Martin <sup>a,2</sup>
Qualitative green metrics			
Type of reaction	Catalytic	Stoichiometric	Stoichiometric
Reactor	Flow	Batch	Batch
Temperature [°C]	120	120	r.t.
Reflux	No	Yes	No
Workup	No	Filtration	Filtration
Solvent	Toluene/EtOAc	Toluene/BuOAc	DMF/EtOAc
Critical element	Pd, pyridine	Mn	no
Solid waste	Negligible	Large quantity	Large quantity
Solvent recycling	Yes	No	No
Quantitative green metrics <sup>c</sup>			
Conv. [%]	100	100	100
Yield [%]	84	68	78
AE	91.71	81.41	48.20
RME	64.43	31.62	24.29
OE	70.26	25.52	76.26
PMI reaction	209.05	38.32	34.66
PMI work-up	0	20.05	273.46
PMI total	209.05	58.37	308.12
E factor	0.13b	57.37	307.12
WI	0.0006 <sup>a</sup>	0.983	0.997
Space-time yield	12.66	6.07	20.4

<sup>a</sup> For details see supplementary material. <sup>b</sup> value calculated considering solvent recycling; color code: green preferred, yellow acceptable, red undesirable.

high efficiency is one of the major drawbacks of the MnO<sub>2</sub> protocol. While the palladium reserve is expected to be 100–500 years. In addition, when the reaction is carried out on large scale, we observed adsorption of our desired product on the surface of MnO<sub>2</sub> and we faced problems with the recovery of **3** from the reaction mixture.<sup>28</sup> Another drawback of the reaction with MnO<sub>2</sub> is its lower energy efficiency in comparison with the procedure applied Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine catalyst. The oxidation with MnO<sub>2</sub> is carried out under atmospheric pressure at reflux and thus is less energy efficient than the reaction in the presence of Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine which is carried out also at 120 °C but under 5 bars of O<sub>2</sub> and the energy input required to run the reaction may be smaller especially when heating flow reactors with small diameter tubes. It is well known that running a reaction at reflux results in a 6-fold increase in energy consumption as opposed to doing so at 5 °C below,<sup>29</sup> thus we consider the flow process as less energy-consuming. Moreover, the complicated workup, additionally requiring washing with non-green solvent (DCM) in the MnO<sub>2</sub> oxidation process does not allow easy and cost-effective recycling of the solvents. While in the case of aerobic oxidation with Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine, no workup is necessary to proceed the following step of the synthesis. This and the large excess of MnO<sub>2</sub> necessary for high yield results in more than 1600-fold higher waste index for this process compared to the Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine oxidation. No



workup and solvent recycling causes also much better *E* factor for the Pd-catalyzed flow process in comparison with MnO<sub>2</sub> or DMP oxidations (Table 4). Over and above all these arguments the flow process provides higher spacetime yield in comparison to batch oxidation with MnO<sub>2</sub>, thus is more favorable for industrial application.

## Conclusion

The development and DoE optimization of this study was realized in order to improve the synthesis of the 5-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-carbaldehyde (**3**) an important precursor in the production of our new PL3Kδ inhibitor (CPL302415). The difficulty of this work relies on the oxidation of relatively complicated molecule which may potentially lead to at least two undesired by-products. Besides it, our substrate is low soluble and tends to adsorb on the MnO<sub>2</sub> surface. The catalytic flow gas-liquid aerobic oxidation of **1** in the presence of Pd(OAc)<sub>2</sub>/pyridine is characterized by higher yield, better atom economy, lower environmental impact and consume less energy. That allows us to refine our process of the CPL302415 production compared to two already existing stoichiometric methods of {5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1*H*-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl}methanol oxidation. Moreover, the flow synthesis let us skip the complicated workup and reduce about 1600-fold the waste intensity factor thus we consider that procedure a green synthesis.

The use of various tools of the DoE approach made it possible to find important factors influencing the efficiency of the process and determine the operational range that gives the maximum product yield.

## Abbreviations

### Acronyms

AE	Atom economy
DCM	Dichloromethane
DoE	Design of experiment
DMF	Dimethylfuran
DMP	Dess–Martin Periodinane
<i>E</i> factor	Environmental factor
OE	Optimum Efficiency
PFA	Perfluoroalkoxy alkanes
PMI	Process Mass Intensity
RME	Reaction Mass Efficiency
WI	Waste Index

## Conflicts of interest

The authors declare the following financial interest/personal relationships which may be considered as potential competing interests. All contributors to this work (except Z. Ochal) at the time of their direct involvement in the project were full-time employees of Celon Pharma SA. M. Wiczorek is the CEO of Celon Pharma SA. Some of the authors are the

shareholders of Celon Pharma SA. This work was financially supported by The National Centre for Research and Development (POIR.01.02.00-00-0085/18-00).

## Acknowledgements

This research was co-financed by the National Centre for Research and Development "Narodowe Centrum Badan i Rozwoju" and Celon Pharma, SA., project "KICHA1 – Preclinical and clinical development of innovative lipid kinases inhibitor as a candidate for the treatment of steroid-resistant and severe inflammatory lung diseases", grant number POIR.01.02.00-00-0085/18-00.

## Notes and references

- (a) T. Saurat, F. Buron, N. Rodrigues, M. L. de Tazua, L. Colliandre, S. Bourg, P. Bonnet, G. Guillaumet, M. Akssira, A. Corlu, C. Guillouzo, P. Berthier, P. Rio, M. L. Jourdan, H. Bénédicti and S. Routier, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**(3), 613; (b) J. A. Engelman, J. Luo and L. C. Cantley, *Nat. Rev. Genet.*, 2006, **7**(8), 606; (c) P. J. Parker, *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, **32**(6), 893; (d) J. G. Foster, M. D. Blunt, E. Carter and E. S. G. Ward, *Pharmacol. Rev.*, 2012, **64**(4), 1027.
- M. Stypik, S. Michalek, N. Orłowska, M. Zagozda, M. Dziachan, M. Banach, P. Turowski, P. Gunerka, D. Zdzalik-Bielecka, A. Stańczak, U. Kędzińska, K. Mulewski, D. Smuga, W. Maruszak, L. Gurba-Bryśkiewicz, A. Leniak, W. Pietrusz, Z. Ochal, M. Mach, B. Zygmunt, J. Pieczykolan, K. Dubiel and M. Wiczorek, *Pharmaceuticals*, 2022, **15**, 927.
- M. N. Kopylovich, A. P. C. Ribeiro, E. C. B. A. Alegria, N. M. R. Martins, L. M. D. R. S. Martins and A. J. L. Pombeiro, *Adv. Organomet. Chem.*, 2015, **67**, 91.
- (a) R. J. Gritter and T. J. Wallace, *J. Org. Chem.*, 1959, **24**(8), 1051; (b) G. Tojo and M. Fernandez, *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*, Springer, 2006, pp. 289.
- J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, A. K. Basak and A. V. Narsaiah, *Tetrahedron*, 2004, **60**(9), 2131.
- J. E. Stevens, Y. Preger, J. R. Martinelli, C. J. Welch, T. W. Root, J. M. Hawkins and S. S. Sthal, *Org. Process Res. Dev.*, 2015, **19**(11), 1548.
- (a) R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. J. T. Brink and A. Dijkman, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 774; (b) P. D. Hampton, M. D. Whealon, L. M. Roberts, A. A. Yaeger and R. Boydson, *Org. Process Res. Dev.*, 2008, **12**, 946; (c) A. Hinzmann, M. Stricker, J. Busch, S. Glinski, K. Oike and H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.*, 2020, **16**, 2399.
- C. Bolm, A. S. Magnus and J. P. Hildebrand, *Org. Lett.*, 2000, **2**(8), 1173.
- (a) A. Schulze and A. Giannis, *Synthesis*, 2006, **2**, 257; (b) J. D. More and N. S. Finney, *Org. Lett.*, 2002, **4**(17), 3001.
- Y. X. Yanga, X. Q. Ana, M. Kanga, W. Zenga, Z. W. Yanga and H. C. Ma, *Russ. J. Org. Chem.*, 2020, **56**(3), 521.
- A. B. Ledue and T. F. Jamison, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, **16**(5), 1082.



## Paper

- 12 R. K. Bowman, A. D. Brown, J. H. Cobb, J. F. Eaddy, M. A. Hatcher, M. R. Leivers, J. F. Miller, M. B. Mitchell, D. E. Patterson, M. A. Toczko and S. Xie, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**(23), 11680.
- 13 R. Anderson, K. Griffin, P. Johnston and P. L. Alsters, *Adv. Synth. Catal.*, 2003, **345**(4), 517.
- 14 (a) Y. Bessard and J. Heveling, WO 99/25696, 1999; (b) Y. Bessard and J. Heveling, *US Pat.*, 6258958B1, 1999; (c) Y. Kon, H. Yazawa, Y. Usui and K. Sato, *Chem.-Asian J.*, 2008, **3**, 1642; (d) Y. Kon, T. Nakashima, A. Yada, T. Fujitani, S. Onozawa, S. Kobayashi and K. Sato, *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 111.
- 15 (a) N. Zotova, K. Hellgardt, G. H. Kesall, A. S. Jessiman and K. K. (M. ). Hii, *Green Chem.*, 2010, **12**, 2157; (b) K. Yamaguchi and N. Mizuno, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**(23), 4538.
- 16 C. Marsden, E. Taarning, D. Hansen, L. Johansen, S. K. Klitgaard, K. Egeblad and C. H. Christensen, *Green Chem.*, 2008, **10**, 168.
- 17 (a) A. Gavrilidis, A. Constantinou, K. Hellgardt, K. K. (M. ). Hii, G. J. Hutchings, G. L. Brett, S. Kuhn and S. P. Marsden, *React. Chem. Eng.*, 2016, **1**, 595; (b) S. G. Newman and K. F. Jensen, *Green Chem.*, 2013, **15**, 1456; (c) H. P. L. Gemoets, Y. Su, M. Shang, V. Hessel, R. Luque and T. Noël, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 83.
- 18 A. I. Alfano, M. Brindisi and H. Lange, *Green Chem.*, 2021, **23**, 2233.
- 19 C. A. Hone and C. O. Kappe, *Chem. Methods*, 2021, **1**, 454.
- 20 (a) T. Nishimura, T. Onoue, K. Ohe and S. Uemura, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 6750; (b) J. Muzart, *Tetrahedron*, 2003, **59**(31), 5789; (c) X. Ye, M. D. Johnson, T. Diao, M. H. Yates and S. S. Stahl, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1180.
- 21 (a) B. Durakovic, *Period. Eng. Nat. Sci.*, 2017, **3**, 421; (b) S. A. Weissman and N. G. Anderson, *Org. Process Res. Dev.*, 2015, **19**, 1605.
- 22 J. C. Taylor, A. Baker, M. R. Chapman, W. R. Reynolds, K. E. Jolley, G. Clemens, G. E. Smith, A. J. Blacker, T. W. Chamberlain, S. D. R. Christie, B. A. Taylor and R. A. Bourne, *J. Flow Chem.*, 2021, **11**, 75.
- 23 TIBCO Software Inc., *Data Science Textbook*, 2020, <https://docs.tibco.com/data-science/textbook>, accessed: 19th September 2022.
- 24 StatSoft's *Electronic Statistics Textbook*, StatSoft Inc., 2006, <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>, accessed 19th September 2022.
- 25 B. A. Steinhoff, I. A. Guzei and S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 11268.
- 26 (a) R. A. Sheldon, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2018, **6**, 32; (b) D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. McElroy, S. Abou-Shehadad and P. J. Dunn, *Green Chem.*, 2016, **18**, 288.
- 27 D. Prat, J. Haylerb and A. Wells, *Green Chem.*, 2014, **16**, 4546.
- 28 C. R. McElroy, A. Constantinou, L. C. Jones, I. Summerton and J. H. Clark, *Green Chem.*, 2015, **17**, 3111.



## The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)

Stanisław Michalek,<sup>a,b</sup> Lidia Gurba-Bryskiewicz,<sup>b</sup> Wioleta Maruszak,<sup>b</sup> Marcin Zagozda,<sup>b</sup> Anna M. Maj,<sup>b\*</sup> Zbigniew Ochal,<sup>a</sup> Krzysztof Dubiel<sup>b</sup> and Maciej Wieczorek<sup>b</sup>

### Contents

1. Materials and Methods .....	S1
1.1. Design of Experiments (DoE).....	S2
1.2. High Field NMR.....	S2
1.3. UHPLC analytical method.....	S2
1.4. Note of Caution .....	S3
2. Experimental Details .....	S4
3. DoE Analysis .....	S7
4. Green metrics calculations.....	S11
5. NMR spectrum and HRMS analysis .....	S19
6. Real photo of the flow equipment.....	S24
7. References.....	S24

### 1. Materials and Methods

Solvents and chemicals were obtained from commercial suppliers and were used without any further purification unless otherwise noted. The [5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl]methanol (**1**) was synthesized according to the procedure published by us.<sup>1,2</sup> Oxygen was purchased from Air Product. Experiments were performed using a combined two Vapourtec easy-Medchem with four standard PFA tubular reactors (10mL each, id=1mm). All tubes and mixers were bought from Vapourtec.

Pressure to the system was delivered to the system using a second Vapourtec SF-10 pump and back pressure regulator (BPR) Vapourtec SF-10 pump was used as a mass flow controller.

Main components utilized within a continuous flow reactor	
Pump	Vapourtec V-3 Peristaltic pump
Mass flow meter	Vapourtec SF-10
Mixer	Vapourtec Y-type mixer Material: PTFE i.d.= 1 mm <0.1mL
Reactor	Vapourtec PFA 10 mL coil reactor i.d.=1mm Temperature control: Vapourtec easy-Medchem
Back pressure regulator	Vapourtec SF-10

	Adjustable pressure
Miscellaneous fittings	Vapourtec PFA tubes i.d.=1mm

### 1.1 Design of Experiments (DoE)

The DoE study and statistical analysis were performed by using the design of experiment tools of STATISTICA software (v.13.3). The experimental data were fitted by using multiple linear regression. The main and interaction effects were generated based on multivariate ANOVA. The statistical significance level was set up to 0.05. The goodness of fit of the models was expressed in regression coefficient  $R^2$ .

### 1.2 High Field NMR

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were performed on JOEL JNMR-ECZR 600 MHz spectrometers with  $^1\text{H}$  being observed at 600 MHz and  $^{13}\text{C}$  at 151 MHz. Chemical shifts for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  were reported in  $\delta$  (ppm) using the residual proton in a deuterated solvent. Mass spectra (Atmospheric Pressure Ionization Electrospray, API-ES) were obtained on Agilent 6130 LC/MSD spectrometer or Agilent 1290 UHPLC coupled with Agilent QTOF 6545 mass spectrometer.

### 1.3 UHPLC analytical method

Reaction in-process monitoring was conducted by the RP UHPLC method using the parameters listed in Table 1.3.1:

**Table 1.3.1. Chromatographic conditions**

Parameters	Range	
Instrumentation	Ultra-high performance liquid chromatograph equipped with an UV/DAD detector, autosampler, and column heater	
Column	Acquity UPLC CSH C18; 2.1 mm x 100 mm, 1.7 $\mu\text{m}$	
Mobile phases	Phase A: 0.1% ortho-phosphoric acid in water Phase B: 0.1% ortho-phosphoric acid in ACN	
Diluent	Methanol	
Flow	0.5 mL/min	
Run time	11 min	
Column temperature	30°C	
Autosampler temperature	10°C	
Injection volume	1 $\mu\text{L}$	
Detection Wavelength	254 nm	
Typical Retention Time	Alcohol <b>1</b> about 4.1 min, Aldehyde <b>3</b> about 5.5 min	
Rinsing the column	After analysis rinse the column for 10 min using ACN : water (10:90, v/v) solution then during 10 min using ACN; store the column with ACN	
Gradient program		
Time, min	Mobile phase A, %	Mobile phase B, %
0.0	90.0	10.0
6.0	40.0	60.0
7.5	10.0	90.0
9.0	10.0	90.0
9.10	90.0	10.0
11.0	90.0	10.0

### Reporting of results and calculations

#### System suitability:

- The resolution between the peaks of alcohol **1** and its nearest impurity must not be less than 1.5;



- Symmetry factor for alcohol **1** peak: within the range from 0.8 to 1.5;

#### *Evaluation of chromatograms*

- Disregard peaks from the blank matrix and diluents;
- Disregard peaks less than 0.05%;

#### *Calculations*

The progress of the reaction (product aldehyde yield) was controlled based on the normalization procedure according to the following formula:

$$X = \frac{A_X \cdot CF \cdot 100\%}{\Sigma A_{X_i}}$$

where:

$X$  – aldehyde product **3** percentage of in the chromatogram of the sample solution,

$A_X$  – aldehyde **3** peak area in the chromatogram of the sample solution,

$CF$  – correction factor of aldehyde **3** versus alcohol **1**

$\Sigma A_{X_i}$  – the sum of the areas of all integrated peaks in the chromatogram of the sample solution.

#### 1.4 Note of Caution

The mixture of  $O_2$  with organic solvents vapours is extremely flammable! Pressurized equipment should be operated with care! Before conducting any experiments, an individual, careful safety assessment including reaction kinetics and explosive hazards should be carried out!

## 2. Experimental Details

### General procedure

Alcohol **1** was dissolved in an appropriate solvent or mixture (200 mg/20 mL) (Reagent A).

Palladium acetate was dissolved in toluene, then pyridine was added using an automatic pipette (Reagent B). The solvent bottle was filled with toluene for the reaction, 2 mL of each solution was used. Both reagents and oxygen were pumped at an appropriate flow rate. Reagent A was mixed with oxygen using the Y-shaped mixer, run through a 28 cm long tube to saturate it with gas, and later combined with reagent B in the Y-shape mixer. The reaction was performed at different temperatures at first within two heated PFA tubular reactors. Next, in order to extend the reaction time, the reaction mixture feed was supplemented with oxygen and transferred into next two heated reactors at the same temperature. FlowWizard™ software, which calculated reaction time, controlled the easy-Medchem system and the collection/waste valve. The reaction mixture (4 mL) was collected offline into the flask and analyzed by UHPLC.

### Synthesis of compound **3** in flow – 1g test

Alcohol **1** (1.05 g; 2.61 mmol) was dissolved in 105 mL mixture of toluene: ethyl acetate 1:1 and kept in an oil bath at 80°C (Reagent A). Palladium acetate (0.12 g; 0.524 mmol; 20%mol) was dissolved in 105 mL toluene, then pyridine (60  $\mu$ L; 0.745 mmol; 26%mol) was added using automatic pipette (Reagent B). Upon addition of pyridine to palladium acetate solution (orange) brightened to yellow. The solvent bottle was filled with toluene (for both reagents). For the reaction, 100 mL of each solution was used (1.00 g of substrate; 2.49 mmol). Both reagents were pumped at flow rate = 1 mL/min, and oxygen was pumped with flow rate of 0.1 mL/min. Reagent A was mixed with oxygen using the Y-shaped mixer, run through a 28 cm long tube to saturate it with gas, and later combined with reagent B in the Y-shape mixer. The reaction was performed at 120°C at first within two heated PFA tubular reactors. Next, in order to extend the reaction time, the reaction mixture feed was supplemented with oxygen and transferred into next two heated reactors. FlowWizard™ software which calculated reaction time, controlled the easy-Medchem system and the collection/waste valve. The fraction obtained during "steady-state" operation, which corresponded to an operating time of 93 min (186 mL; 0.93 g of substrate) collected into the round bottom flask, vaporized, and purified via column chromatography. 0.671 g of yellow solid was obtained (yield=72.6%). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.21 (s, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.49-7.42 (m, 2H), 7.44-7.16 (t, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.05-3.92 (m, 8H)

### Synthesis of compound **3** in batch autoclave using Pd(OAc)<sub>2</sub>

The reaction was prepared under an inert argon atmosphere. Alcohol **1** (100 mg; 0.25 mmol) was placed in 35 mL vial under argon and solubilised with dry and degassed toluene/EtOAc 1:1 mixture (25 mL). The palladium acetate (11.4 mg; 0.05 mmol; 20%mol) was also placed in a 35 mL vial under argon and solubilised with toluene/EtOAc 1:1 mixture (15 mL) and then mixed with pyridine (5.2  $\mu$ L; 0.0649 mmol; 26%mol). Next, the content of the both vials was transferred under argon to a 300 mL Büchi miniclave containing a magnetic stirrer bar. After three purges with O<sub>2</sub> the reactor was then pressurised at 5 bar O<sub>2</sub> at ambient temperature then heated at 120°C during 2h. After the reaction, the autoclave was cooled at ambient temperature. The vented and the crude mixture was filtered through silica gel pad and analysed by using UHPLC. Resulted with 45% yield of **3**.

### Synthesis of compound **3** in batch using MnO<sub>2</sub><sup>1</sup>

According to the described procedure described by us in Ref [1]

The 2L batch reactor was loaded with 27 g of compound **1** (0.067 mol), 58.4 g activated manganese oxide (0.667 mol), 350 mL and toluene, and 350 mL butyl acetate. The reaction mixture was heated and mixed (200 rpm). The temperature was set to 120°C. After reaching reflux, the timer was set to 1.5h. The reaction was controlled using TLC. After reaction completion, the mixture was cooled to 25°C. Reaction mixture was filtered on Schott funnel G-4 using 100 g Celite® 545 and washed with 200 mL DCM. Filtrate was evaporated resulting in 18.2 g creamy solid (yield=68.1%) <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.21 (s, 1H), 7.94-7.92 (m, 1H), 7.71-7.69 (m, 1H), 7.48-7.42 (m, 2H), 7.39-7.21 (t, 1H), 7.11-7.10 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.04-3.95 (m, 8H)

### Synthesis of compound **3** in batch using Dess-Martin periodinane<sup>1</sup>

According to the described procedure described by us in Ref [1]

**Table S1.** Additional conditions screened for flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine catalyzed aerobic oxidation of **1** in Toluene.

Entry	Catalyst loading (%)	Pyridine eq. per catalyst	T (°C)	PO <sub>2</sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL/min)	V of reagents (mL/min)	Conv. of <b>1</b> (%)	Yield of <b>2</b> (%)	Yield of <b>3</b> (%)
1	20 mol%	4	100	4	0.1	0.1	68.87	0	63.16
2	20 mol%	4	100	5	0.222	0.222	72.3	0	72.3
3	20 mol%	4	100	5	2.02	2.02	10.82	0	10.82
4	20 mol%	1.3	130	5	1	0.15	0	0	0
5	20 mol%	1.3	130	5	1	0.1	0	0	0
6	20 mol%	1.3	130	5	0.5	0.25	54.32	0	54.32
7	20 mol%	1.3	130	5	1	0.15	13.65	0	13.65
8	20 mol%	1.3	130	5	1	0.25	100	0	0
9	20 mol%	1.3	120	5	0.4	0.4	94.16	0	89.14

\* Standard reaction conditions: : substrate **1** = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL Toluene.**Table S2.** Additional conditions screened for flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine catalyzed aerobic oxidation of **1** in different solvents or solvent mixture.

Entry	Catalyst loading (%)	Pyridine eq. per catalyst	Solvent	T (°C)	PO <sub>2</sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL/min)	V of reagents (mL/min)	Conv. of <b>1</b> (%)	Yield of <b>2</b> (%)	Yield of <b>3</b> (%)	Yield of <b>4</b> (%)
1	20 mol%	0	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	1	0.15	18.53	0.17	16.98	0
2	20 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	0.5	0.15	83.3	1.16	77.67	0
3	20 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	1	0.15	77.78	0	77.78	0
4	5 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	120	5	0.1	0.55	10.05	0	4.25	0
5	5 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	0.1	1	11.19	0	5.18	0
6	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	100	3	0.1	0.1	39.52	0.6	37.90	0
7	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	100	3	0.22	0.1	49.0	0	48.96	0
8	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	100	3	0.22	0.33	53.62	0	53.62	0
9	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	100	5	0.4	0.4	52.86	0.27	52.58	0
10	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	120	5	0.4	0.4	78.99	0	78.99	0
11	20 mol%	4	Toluene/Caprolactone 1:1	100	5	0.1	0.1	41.2	0.67	39.4	0
12	10 mol%	4	DMA	100	2	0.11	0.11	2.0	0	0	0
13	10 mol%	4	DMA	130	5	0.11	0.11	25.01	0.69	7.4	0
14	20 mol%	4	DMA	150	8	0.25	0.25	60.1	0	16.3	9.5
15	20 mol%	1.3	EtOAc	130	5	1	0.1	66.12	0	66.12	0
16	20 mol%	1.3	EtOAc	130	5	1	0.15	45.32	0	44.06	0
17	20 mol%	1.3	EtOAc	120	5	0.4	0.4	26.64	0	24.23	0
Air instead of O <sub>2</sub>											
18	20 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	1	0.15	72.45	0	27.55	0
19	20 mol%	1.3	Toluene/Caprolactone 1:1	130	5	0.5	0.15	52.82	0	47.18	0

\* Standard reaction conditions: substrate **1** = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL of solvent.

**Table S3.** Additional conditions screened for flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine catalyzed aerobic oxidation of **1** in different solvents or solvent mixtures.

Entry	Catalyst loading (%)	Pyridine eq. per catalyst	Solvent	T (°C)	PO <sub>2</sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL/min)	V of reagents (mL/min)	Conv. of <b>1</b> (%)	Yield of <b>2</b> (%)	Yield of <b>3</b> (%)	Yield of <b>4</b> (%)
1	5	1.3	Toluene/EtOAc 1:1	120	5	0.1	0.1	23.22	0	20.61	0
2	22.5	2.6	Toluene/ EtOAc 1:1	120	5	0.1	1	80.18	0	75.16	0
3	40	1.3	Toluene/ EtOAc 1:1	120	5	0.1	0.1	90.25	0	67.63	0
4	40	1.3	Toluene/ EtOAc 1:1	120	5	0.1	1	83.71	0	74.07	0
1	5	1.3	Toluene/EtOAc 1:1	120	5	0.1	0.1	23.22	0	20.61	0

\* Standard reaction conditions: substrate **1** = 20 mg (0.05 mmol) dissolved in 2 mL of solvent.

**Table S4.** Additional conditions screened for flow Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine catalyzed aerobic oxidation of **1** in Toluene/EtOAc - 1g synthesis.

Entry	Catalyst loading (%)	Pyridine eq. per catalyst	T (°C)	PO <sub>2</sub> (bar)	V of O <sub>2</sub> (mL/min)	V of reagents (mL/min)	Conv. of <b>1</b> (%)	Yield of <b>2</b> (%)	Yield of <b>3</b> (%)
1	20 mol%	1.3	120	5	0.1	1	100	16	84 (72.6%)*

\* isolated yield.

**Remark 1:** For the higher temperature (130°C) catalyst starts decomposing slowly in the reactor. It is easy to overlook, but after running a couple of experiments, palladium deposition on the reactor's walls becomes visible.

**Remark 2:** At a higher temperature (150°C) we observed the formation of the acidic product **4**.

**Remark 3:** The additional microreactor LTF-MS (Volume 0,2 ml; id: 1mm) used as a mixer installed after the second reactor in order to increase the mixing of the additional O<sub>2</sub> portion did not increase the yield of the desired product.<sup>7</sup>

### 3. DoE Analysis

Figure S1. Summary of the model for screening DOE 2<sup>6</sup>(6-3) for product 3 yield.

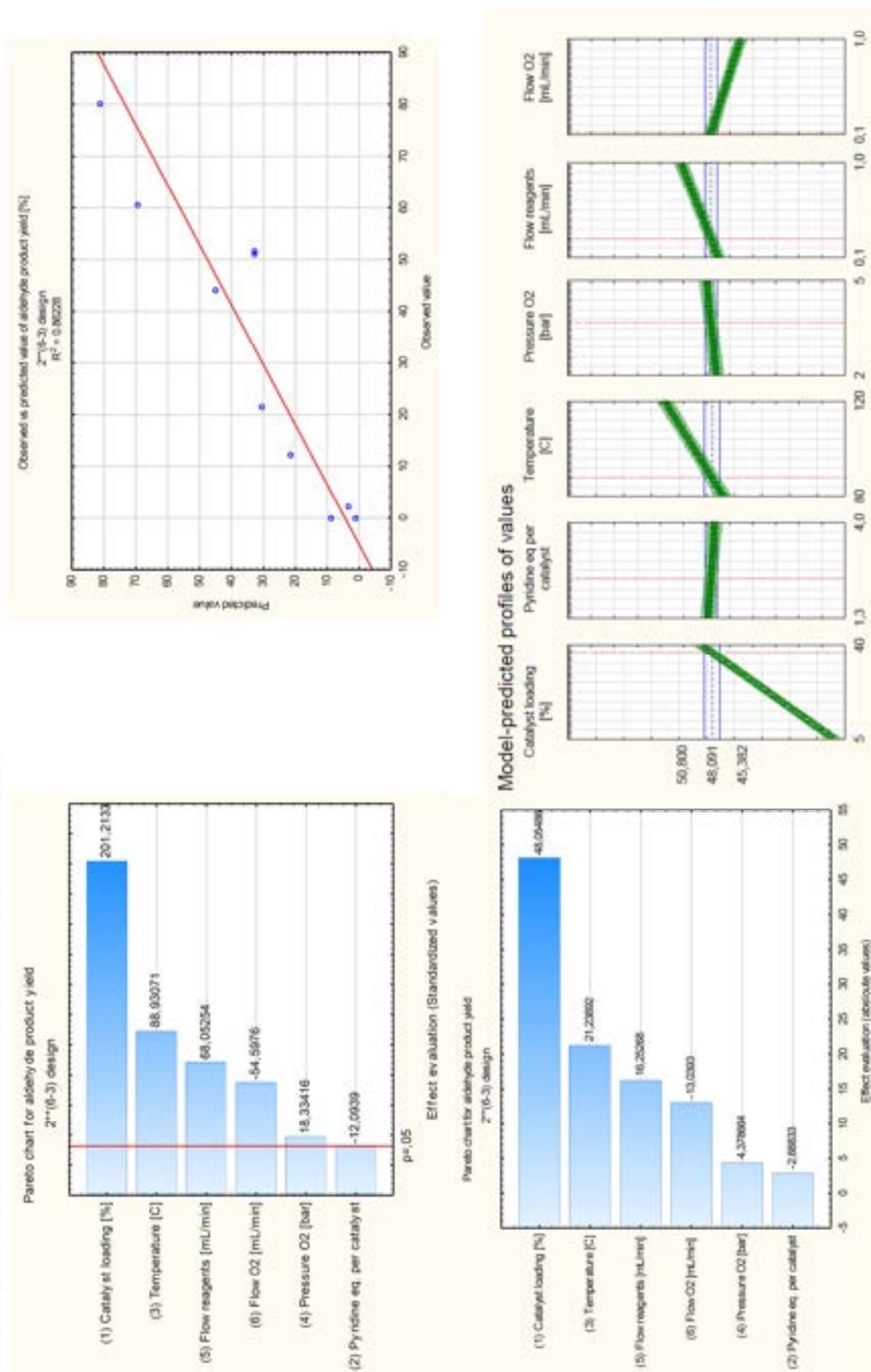
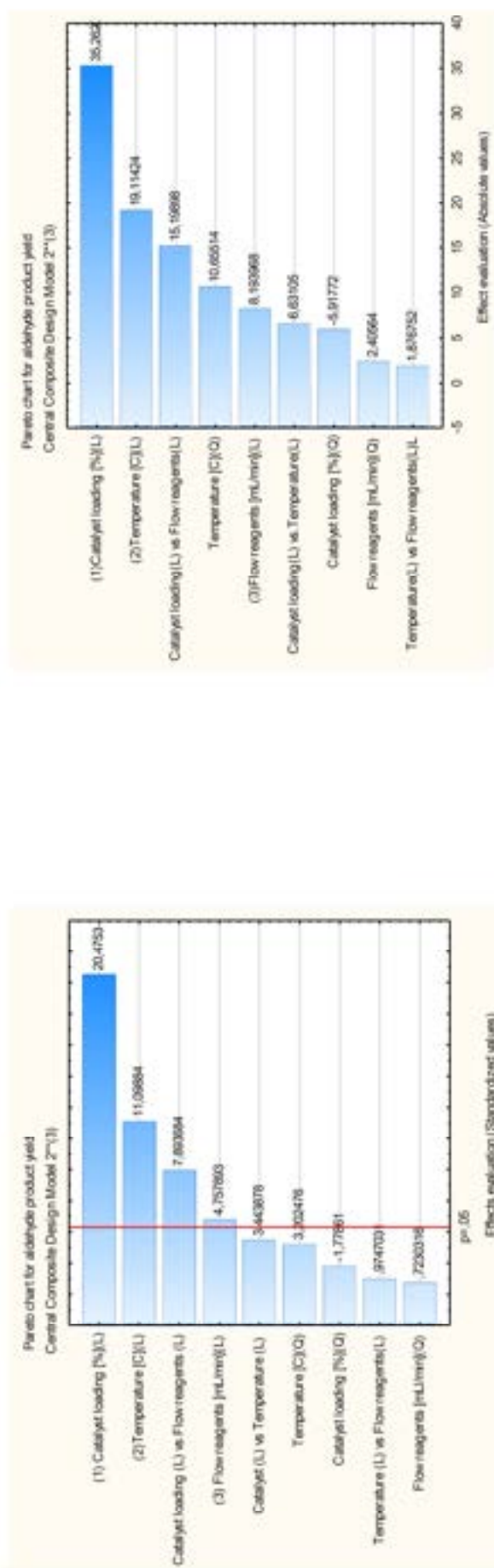
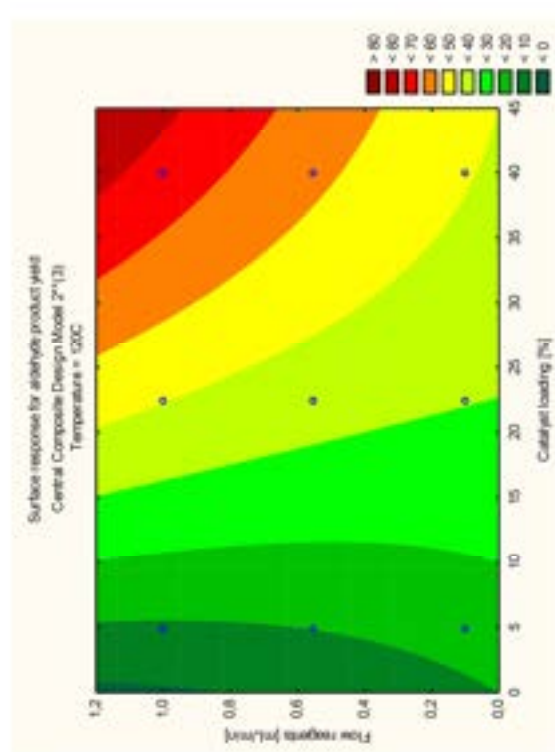
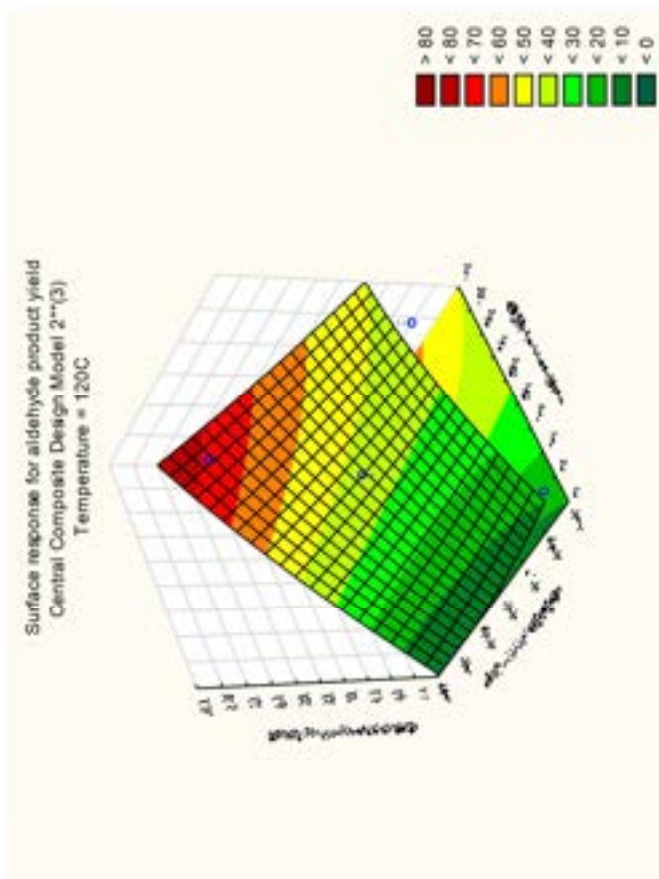
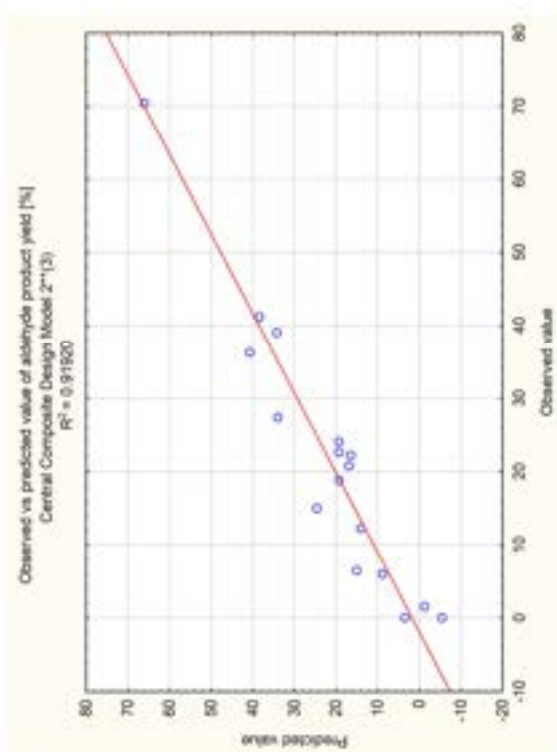
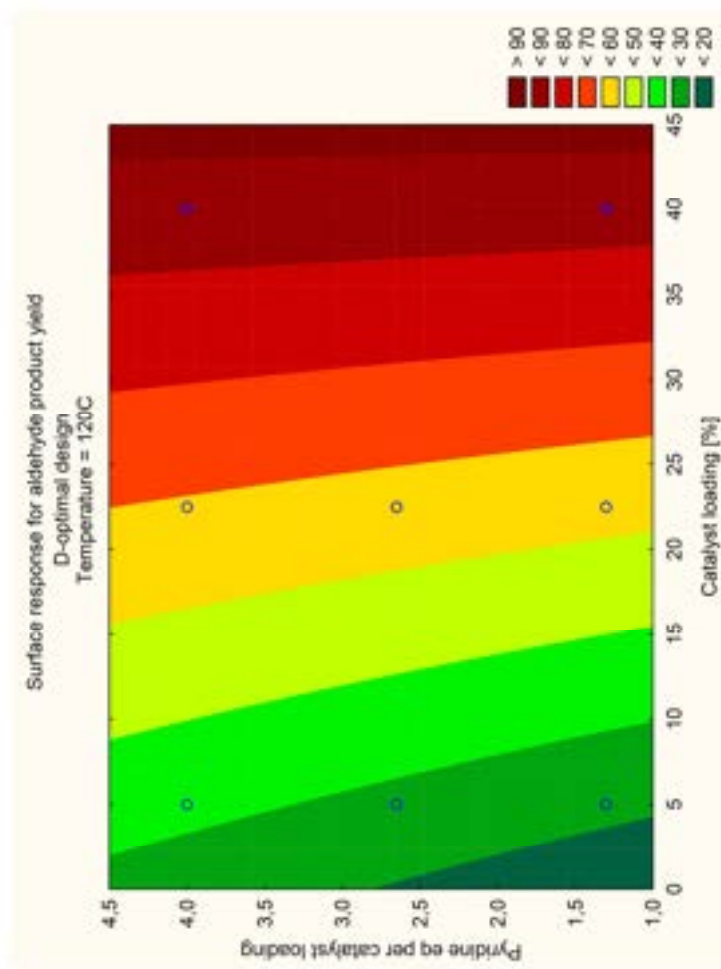


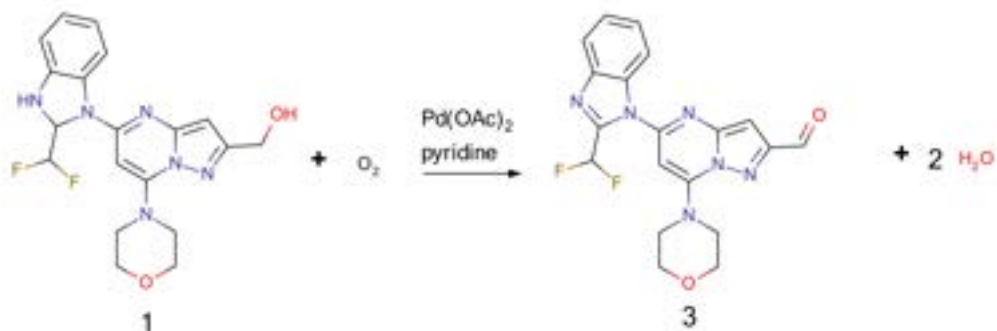
Figure S2. Summary of the Central Composite Design (CCD) model 2<sup>4</sup>(3) for product 3 yield.



Surface response for aldehyde product yield, Central Composite Design Model 2\*\*(3),  
Temperature = 120C

Figure S3. D-optimal design for product **3** yield.



4. Green metrics calculations<sup>3-5</sup>4.1 Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine - no workup

MW (g/mol)	
1	402.40
3	398.37
O <sub>2</sub>	32.00

$$AE (\%) = \frac{\text{Mol wt of product} \times 100}{\text{Sum of mol wts of reactants}} = 91.71$$

Role	Chemical	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g/mol)
<b>Reaction</b>				
Reactant	Alcohol (1)	0.3		
Reactant	Oxygen	0.133		
Catalyst	Pd(OAc) <sub>2</sub>	0.106		
Reagent	Pyridine	0.049	0.054	0.982
Solvent	Toluene	120.95	150	0.867
Solvent	Ethyl acetate	41.94	50	0.902
	<b>Reaction total</b>	164.11		
<b>Product</b>				
Product	Aldehyde (3)	0.785		

$$RME (\%) = \frac{\text{Mass of product} \times 100}{\text{Total mass of reactants}} = 64.43$$

$$OE (\%) = \frac{RME \times 100}{AE} = 70.26$$

$$PMI(\text{reaction}) = \frac{\text{Total mass in reaction}}{\text{Mass of product}} = 209.05$$

$$E = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Mass of product}} = \frac{0.106 + 0.300}{0.785} = 0.52$$

$$WI = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Total mass input}} = 0.00025$$

---

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.000785	1.55	0.00004

$$\text{Spacetime yield} = \frac{\text{Mass of product}}{\text{Reaction time} \times \text{volume of reactor used}} = 12.66$$

4.2 Pd(OAc)<sub>2</sub>/Pyridine - with product isolation

	MW (g/mol)
1	402.40
3	398.37
O <sub>2</sub>	32.00

$$AE (\%) = \frac{\text{Mol wt of product} \times 100}{\text{Sum of mol wts of reactants}} = 91.71$$

Role	Chemical	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g/mol)
<b>Reaction</b>				
Reactant	Alcohol (1)	0.93		
Reactant	Oxygen	0.133		
Catalyst	Pd(OAc) <sub>2</sub>	0.106		
Reagent	Pyridine	0.049	0.054	0.982
Solvent	Toluene	120.95	150	0.867
Solvent	Ethyl acetate	41.94	50	0.902
	<b>Reaction total</b>	164.64		
<b>Work-up</b>				
LC	Silica-gel column	47.5		
Solvent	Heptane	145.0	212	0.684
Solvent	Ethyl acetate	68.6	76	0.902
	<b>Work-up total</b>	261.1		
	<b>Reaction and work-up total</b>	425.7		
<b>Product</b>				
Product	Aldehyde (3)	0.671		

$$RME (\%) = \frac{\text{Mass of product} \times 100}{\text{Total mass of reactants}} = 55.09$$

$$OE (\%) = \frac{RME \times 100}{AE} = 60.06$$

$$PMI(\text{reaction}) = \frac{\text{Total mass in reaction}}{\text{Mass of product}} = 244.57$$

$$E = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Mass of product}} = \frac{425.7 - 0.671}{0.671} = 632.69$$

$$WI = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Total mass input}} = 0.998$$

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.000671	1.55	0.00004

$$\text{Spacetime yield} = \frac{\text{Mass of product}}{\text{Reaction time} \times \text{volume of reactor used}} = 10.82$$



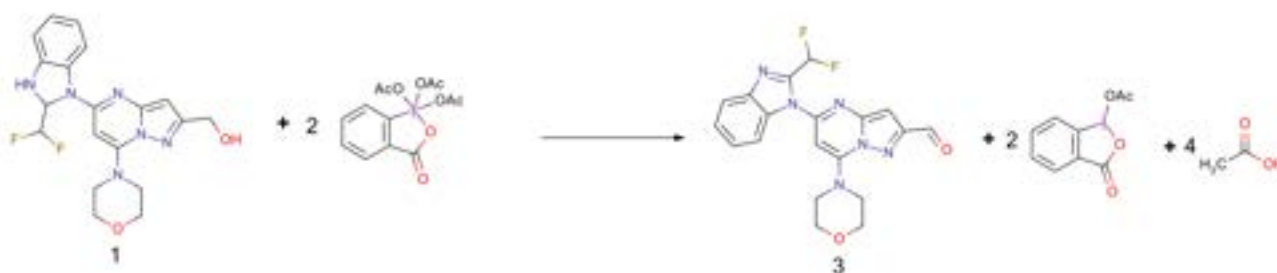
$$E = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Mass of product}} = 57.37$$

$$WI = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Total mass input}} = 0.983$$

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.0182	1.5	0.002

$$\text{Spacetime yield} = \frac{\text{Mass of product}}{\text{Reaction time} \times \text{volume of reactor used}} = 6.07$$

## 4.4 Dess-Martin Periodinane



MW (g/mol)	
1	402.40
3	398.37
DMP	424.14

$$AE (\%) = \frac{\text{Mol wt of product} \times 100}{\text{Sum of mol wts of reactants}} = 31.85$$

Role	Chemical	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g/mol)
<b>Reaction</b>				
Reactant	Alcohol (1)	0.9		
Reactant	DMP	1.31		
Solvent	DMF	24.54	26	0.944
<b>Reaction total</b>		26.75		
<b>Work-up</b>				
Solvent	Ethyl acetate	13.53	15	0.902
LC	Silica-gel column	33.30		
Solvent	Heptane	103.97	152	0.684
Solvent	Ethyl acetate	51.41	57	0.902
<b>Work-up total</b>		202.21		
<b>Reaction and work-up total</b>		228.97		
<b>Product</b>				
Product	Aldehyde (3)	0.70		

$$RME (\%) = \frac{\text{Mass of product} \times 100}{\text{Total mass of reactants}} = 24.29$$

$$OE (\%) = \frac{RME \times 100\%}{AE} = 76.26$$

$$PMI(\text{reaction}) = \frac{\text{Total mass in reaction}}{\text{Mass of product}} = 34.66$$

$$PMI(\text{workup}) = \frac{\text{Total mass used for workup}}{\text{Mass of product}} = 273.46$$

$$PMI(\text{total}) = \frac{\text{Total mass process}}{\text{Mass of product}} = 308.12$$

$$E = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Mass of product}} = 307.12$$

$$WI = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Total mass input}} = 0.997$$

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.00102	1	0.00005

$$\text{Spacetime yield} = \frac{\text{Mass of product}}{\text{Reaction time} \times \text{volume of reactor used}} = 20.4$$



## 5. NMR spectrum

{5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1H-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl)methanol (1)

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ 7.78 (d, 1H), 6.81 (td, 1.1 Hz, 1H), 6.75 (d, 1H), 6.71 (td, J = 7.7, 1H), 6.67 (dd, 1H), 6.30-6.11 (t, 1H, CF<sub>2</sub>H), 6.24 (d, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.23 (t, 1H), 4.55 (d, 2H), 3.82-3.65 (m, 8H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ 157.6, 152.4, 150.6, 149.7, 142.0, 133.2, 122.7, 118.6, 113.9, 113.0, 109.4, 91.1, 80.6, 73.9, 65.6, 58.0, 48.0

HRMS (ESI/MS): *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 402.1616 found 402.1613.

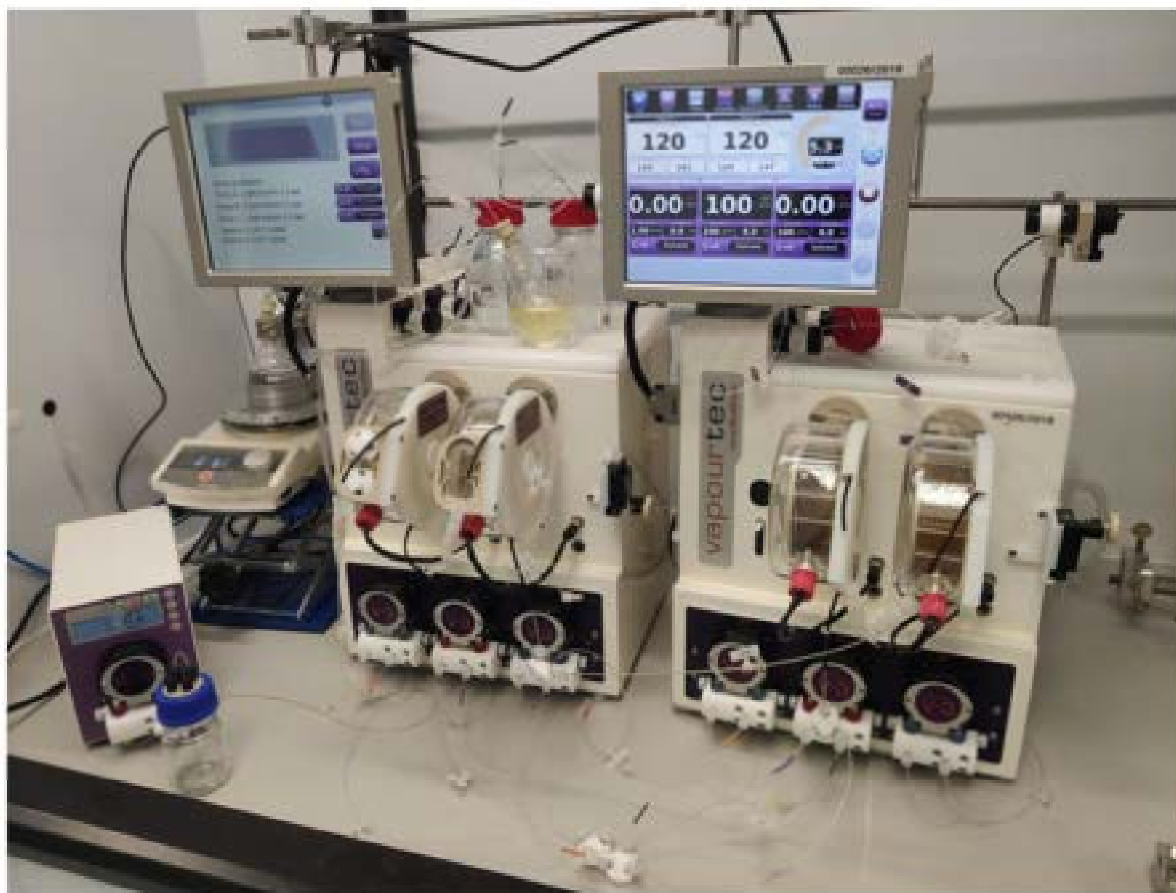








## 6. Real photo of the flow equipment



7.

## 8. References

- [1] Stypik, M.; Michałek, S.; Orłowska, N.; Zagozda, M.; Dziachan, M.; Banach, M.; Turowski, P.; Gunerka, P.; Zdzalik-Bielecka, D.; Stańczak, A.; Kędzierska, U.; Mulewski, K.; Smuga, D.; Maruszak, W.; Gurba-Bryskiewicz, L.; Leniak, A.; Pietruś, W.; Ochal, Z.; Mach, M.; Zygmunt, B.; Pieczykolan, J.; Dubiel, K.; Wieczorek, M. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 927.
- [2] D. J. C. Constable, A.D. Curzons, V. L. Cunningham *Green Chem.*, 2002, *4*, 521.
- [3] C. R. McElroy, A. Constantinou, L. C. Jones, L. Summerton and J. H. Clark, *Green Chem.*, 2015, *17*, 3111.
- [4] R. A. Sheldon, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018, *6*, 32.

#### 10.4. Publikacja P4

Michałek S., Maj M. A., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W., Zagozda M., Ochal Z.,  
Dubiel K., Wieczorek M.;

Development and optimization of a continuous flow ester reduction with LiAlH<sub>4</sub> in the  
synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415);

React. Chem. Eng., **2023**, Advanced Article, <https://doi.org/10.1039/D2RE00561A>

IF: 3,9; MNiSW: 100



Cite this: DOI: 10.1039/d2re00561a

## Development and optimization of a continuous flow ester reduction with $\text{LiAlH}_4$ in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$ inhibitor (CPL302415)<sup>†</sup>

 Stanisław Michatek,<sup>a</sup> Anna M. Maj,<sup>a</sup> Lidia Gurba-Bryskiewicz,<sup>b</sup> Wioleta Maruszak,<sup>b</sup> Marcin Zagozda,<sup>a</sup> Zbigniew Ochal,<sup>b</sup> Krzysztof Dubiel<sup>a</sup> and Maciej Wieczorek<sup>a</sup>

Herein we present the development of highly productive and chemoselective ester reduction in a continuous flow system with lithium aluminum hydride (LAH) at mild temperature. The reaction was utilized for the reduction of an important precursor in the synthesis of a new PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415), which is now under evaluation for the treatment of systemic lupus erythematosus. The productivity and the selectivity of the flow LAH reduction were compared with those of batch reaction, as well those of Ru-catalyzed ester reduction. The reaction has a high space-time yield ( $1130 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ ). The process was optimized using a design of experiments (DoE) approach.

 Received 21st December 2022;  
Accepted 7th February 2023

DOI: 10.1039/d2re00561a

rsc.li/reaction-engineering

Phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  (PI3K $\delta$ ), a member of the class I PI3K family, is a very important signaling molecule that regulates the differentiation, proliferation, migration, and survival of immune cells.<sup>1–3</sup> Different PI3K isoforms regulate distinct cellular events, enabling therapeutic opportunities for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases including asthma or systemic lupus erythematosus (SLE).<sup>4,5</sup> Unfortunately, many known PI3K $\delta$  inhibitors have unfavorable effects,<sup>6</sup> which prompts scientists to search for safer molecules. One of the new promising compounds in this class is our CPL302415.<sup>7</sup> The last three steps of its synthetic route are shown in Fig. 1. Sadly, we could not simplify it, although there are many examples of direct reduction of the ester group to the corresponding aldehyde using DIBAL-H<sup>8–10</sup> or Red-AL<sup>®</sup>,<sup>11</sup> in our case, none of them leads to the desired aldehyde **3** in satisfactory yield and selectivity. Thus we were obliged first to carry out ester reduction to alcohol, followed by oxidation to aldehyde in the next step. The aim of this work was to develop the catalytic or stoichiometric reduction of ester group in 5-[2-(difluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolopyrimidine-2-carboxylate (**1**) to the corresponding primary alcohol, {5-[2-(difluoromethyl)-1H-1,3-benzodiazol-1-

yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-2-yl)methanol (**2**), in a continuous flow process in order to combine it in a telescoped sequence with Pd-catalyzed flow oxidation of **2** to aldehyde **3**.<sup>12</sup> The hydrogenation of ester group in substrate **1** itself is quite a demanding transformation, which may lead to multiple products: the substrate with the hydrogenated benzimidazole ring (**1b**) (Table 1), the desired alcohol with a double bond in the benzimidazole ring (**2**), and alcohol with a reduced double bond in the benzimidazole ring (**2b**). However, in the next step of CPL302415 synthesis, we can recover the double bond in the benzimidazole ring,<sup>12</sup> which is very important for CPL302415 stability, but the **2b** alcohol is much less soluble than **2**. This generates synthetic problems in the next stages, for example, higher solvent expenditure, especially in large-scale production. Thus the high selectivity of the reduction towards product **2** was the second objective that we wanted to achieve simultaneously.

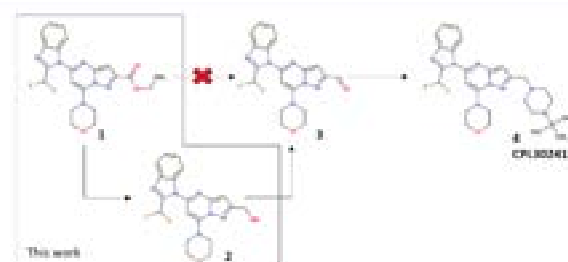


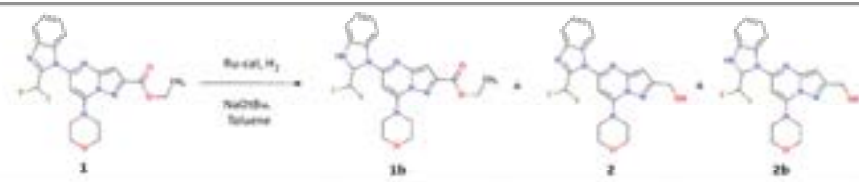
Fig. 1 The synthesis pathway of CPL302415.

<sup>a</sup>Celion Pharma S.A., ul. Marymoncka 15, 05-153 Kazanów, Poland.

E-mail: stanislaw.michatek@celionpharma.com, anna.maj@celionpharma.com

<sup>b</sup>Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2re00561a>



Table 1 Ru-catalyzed hydrogenation of 1 batch reactions<sup>a</sup>


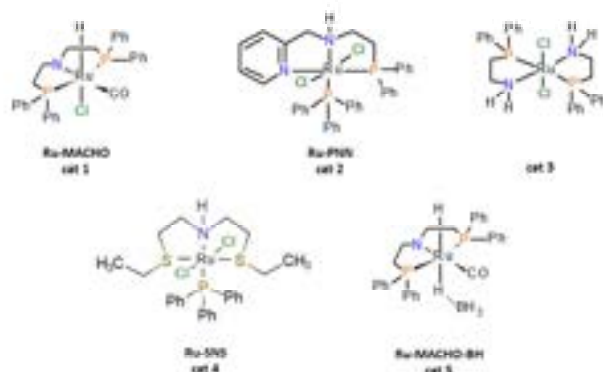
Entry	PH <sub>2</sub> (bar)	T (°C)	Time (h)	Conversion of 1 <sup>b</sup> (%)	Yield of 1b <sup>b</sup> (%)	Yield of 2 <sup>b</sup> (%)	Yield of 2b <sup>b</sup> (%)	Yield of 2 + 2b (%)
<b>Cat 1</b>								
1	75	80	70	100	0	0.1	88.9	89.0
<b>Cat 2</b>								
2	50	80	80	24	100	0	2.3	87.4
3	50	80	80	65	100	0	2.6	95.7
4	75	80	80	6	96.3	0	85.8	7.0
5	75	50	50	24	98.7	0	90.2	2.3
6 <sup>c</sup>	75	65	65	15	98.2	0	85.4	9.9
<b>Cat 3</b>								
7	50	80	80	65	95.8	4.1	43.4	41.7
<b>Cat 4</b>								
8	50	70	70	12	32.8	0	23.7	1.0
9	50	70	70	24	94.7	0	2.1	88.4

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate = 150 mg (0.339 mmol); catalyst = 5 mol%; catalyst/NaOtBu = 1/10; toluene = 8 mL. <sup>b</sup> % determined by UHPLC; for details see the ESI<sup>†</sup>. <sup>c</sup> Substrate = 150 mg (0.339 mmol); catalyst = 0.0375 mol%.

We started our study with standard batch reduction with DIBAL-H; however, it was limited by the very poor solubility of **1** at low temperatures, and so even at  $-78$  °C an undesirable over-reduced **2b** product was observed in large quantity. We also tried a reduction with  $\text{NaBH}_4$  but in that case, even, at an elevated temperature (60 °C), the reaction required at least 16 hours to complete leading mainly to less soluble **2b**. Likewise, the batch reduction with lithium aluminum hydride (LAH) at 0 °C gave mainly **2b** product. Thus, to avoid overreduction to **2b** and problems with future scaling-up we moved to homogeneous Ru-based catalysts,<sup>13–21</sup> which display a high functional tolerance, and to a continuous flow reactor, which allows better reaction temperature and time control. For our research we selected

several commercially available Ru-based catalysts (Fig. 2). We focused our attention mainly on pincer complexes such as Ru-MACHO, patented by Takasago International Corporation,<sup>18</sup> and two complexes published by Gusev's group Ru-PNN and Ru-SNS;<sup>14</sup> additionally we also selected those developed by Firmenich and bearing two bidentate ligands dichlorobis(2-(diphenylphosphino)ethylamine) ruthenium(n) (cat 3). All of the selected complexes are very active in the hydrogenation of esters, and the Firmenich catalyst is observed to be very effective at 100 °C with 0.05 mol% catalyst loading, while the Ru-PNN demonstrated exceptional activity with a Ru loading as low as 50 ppm at 40 °C.<sup>14</sup> Ru-MACHO is less vulnerable to inhibition by methanol and consequently is not deactivated by alcohol formed in the reaction.<sup>18</sup> Contrary to Ru-MACHO the Ru-SNS complex is air-stable but toxic.<sup>14</sup> However, the Ru-MACHO complex was developed to perform with high activity in alcoholic solvents, particularly in MeOH,<sup>18</sup> due to the low solubility of our substrate 5-[2-(difluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolopyrimidine-2-carboxylate (**1**) in that solvent, and we studied its hydrogenation in toluene. Toluene was also a favorable solvent in order to combine the reduction in a telescoped sequence with our already developed flow oxidation of **2** to aldehyde **3**, where it was also used as a solvent.<sup>12</sup> The first optimization tests were done in a batch autoclave using NaOtBu as a base.

Although the reactions were carried out in toluene, the results gathered in Table 1 show the high activity of all tested complexes towards the reduction of the ester group in **1**. The

Fig. 2 Ru catalyst used in the hydrogenation of ester **1**.

## Reaction Chemistry &amp; Engineering

Ru-MACHO complex at 80 °C and under 70 bar of H<sub>2</sub> gave almost 89% yield of additionally hydrogenated benzimidazole ring alcohol product **2b** (Table 1; entry 1). The best results (98.3%) of the combined two alcoholic products (**2** and **2b**) were observed in the presence of 5 mol% Ru-PNN at 80 °C and under 50 bar of hydrogen after 65 h; but in that case, we also obtained 95.7% of undesired additionally reduced benzimidazole ring product (**2b**) (Table 1; entry 3). However, increasing the H<sub>2</sub> pressure to 75 bar achieved 90.2% of product **2** within 6 h (Table 1; entry 5). Although the catalyst generated from the cat 3 complex led to a high yield of 85% (**2** and **2b**), it turned out to be less active and less selective than the catalysts generated from Ru-MACHO, Ru-PNN or Ru-SNS; after 65 h we still observed the compound with an unreduced ester group, **1b** (Table 1; entry 7). Interestingly the Ru-MACHO first hydrogenated the double bond in the benzimidazole ring, and then the ester was reduced giving the main less soluble product **2b**, while the Ru-PNN complex reduced first the ester resulting in desired product **2** (see the ESI,† Table S1). Unfortunately, the reaction continues, and product **2** very quickly transforms into undesired **2b**. Therefore in order to establish the fine balance between the reaction conditions and stop the reaction on product **2**, as well to reduce the number of experiments, we applied the design of experiments (DoE).

The DoE study and statistical analysis were performed by using the design of experiments tools of the STATISTICA software (v.13.3).<sup>22,23</sup> We have implemented the central composite design (CCD), response surface methodology (RSM) 2<sup>4</sup>(4), including two repeats at a center point for the reproducibility study. The following parameters were considered for the multivariate optimization, *i.e.*, catalyst loading (varied between 2.5–5%), temperature (between 50–80 °C), H<sub>2</sub> pressure (between 50–75 bar) and reaction time (between 6–24 hours) (Table S2†).

The fit of the obtained CCD model is  $R^2 = 0.73$  (Fig. S1†). ANOVA analysis shows that the main statistically significant effects of the tested parameters on the product **2** yield are the interaction effect of the catalyst loading with the temperature ( $p = 0.0124$ ), linear ( $p = 0.0180$ ), and quadratic ( $p = 0.0141$ ) positive effect of the H<sub>2</sub> pressure, a linear positive effect of temperature ( $p = 0.0224$ ), and quadratic negative effect of reaction time ( $p = 0.0240$ ) (Fig. S1†). As it results from the CCD model, the predicted alcohol product **2** yields above 98% is based on the value of the catalyst loading (2.5%), temperature (80 °C), H<sub>2</sub> pressure (75 bar), and reaction time (in the range from 6.5 to 18.5 hours, maximum at 12.8 hours) (Fig. 3a and b). Generally, at catalyst loading 2.5% and H<sub>2</sub> pressure 75 bar (Fig. 3a), in the whole range of temperature, we observe a maximum of alcohol product **2** yields at the intermediate reaction time. At a lower time, the substrate (**1**) was not consumed entirely, but on the other hand, at the time above 20 hours, more **2b** side product was generated. At a temperature below 60 °C alcohol product **2** yields did not exceed 60%. At a catalyst loading of 2.5% and a temperature of 80 °C we observe quite a narrow optimal range of H<sub>2</sub>

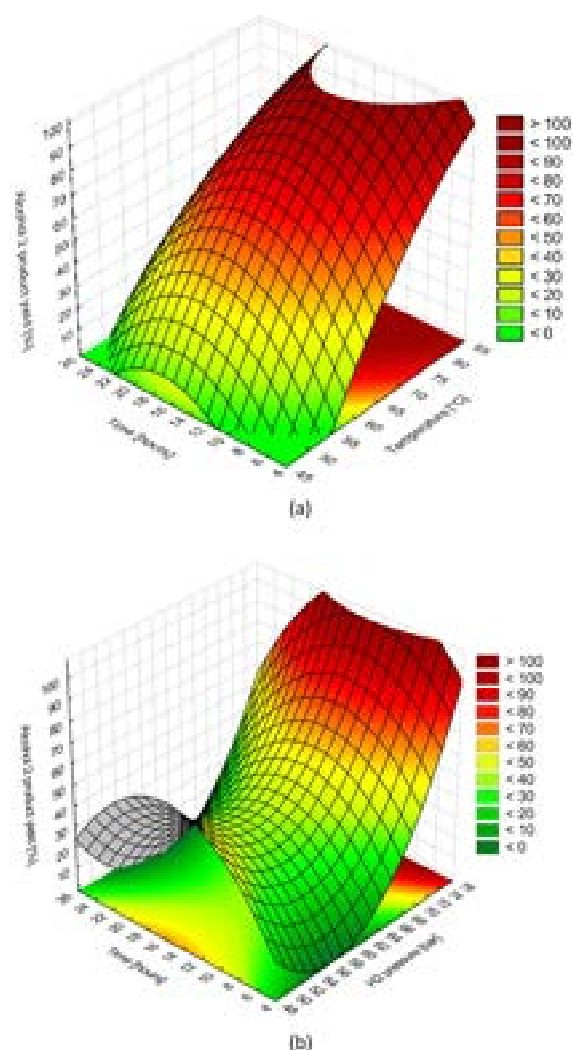


Fig. 3 (a) Surface response for alcohol product **2** yield, central composite design model 2<sup>4</sup>(4), catalyst loading = 2.5%, H<sub>2</sub> pressure = 75 bar. (b) Surface response for alcohol product **2** yield, central composite design model 2<sup>4</sup>(4), catalyst loading = 2.5%, temperature = 80 °C.

pressure. Maximum alcohol product **2** yields were achieved at about 73–75 bar; at a H<sub>2</sub> pressure below 70 bar, the yields did not exceed 60%.

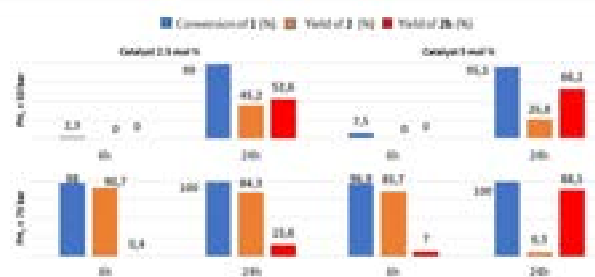


Fig. 4 Ru-PNN catalyzed hydrogenation of ester **1** at  $T = 80$  °C.

**Table 2** Input parameters and results from the response surface methodology performed in the flow process reduction of **1** in the presence of LAH

Reaction conditions <sup>a</sup>				Results <sup>b</sup> (%)			
Entry	T (°C)	Eq LAH	Time (min)	Conversion of <b>1</b>	Yield of <b>2</b>	Yield of <b>2b</b>	Yield of <b>2 + 2b</b>
1	0	1.0	0.5	77.8	62.3	4.0	66.3
2	0	1.6	0.5	95.0	77.8	7.6	85.4
3	0	1.0	10.0	93.7	73.9	9.2	83.1
4	0	1.6	10.0	99.3	56.6	26.7	83.3
5	40	1.0	0.50	85.1	70.0	5.0	75.0
6	40	1.6	0.50	99.6	38.5	21.9	60.4
7	40	1.0	10.0	88.2	72.4	5.6	78.0
8	40	1.6	10.0	99.8	19.3	45.2	64.5
9	0	1.3	4.75	98.8	63.9	20.6	84.5
10	40	1.3	4.75	99.0	65.8	16.2	82.0
11	20	1.3	0.50	99.4	64.2	19.9	84.1
12	20	1.3	10.0	99.4	38.0	37.6	75.6
13	20	1.0	4.75	92.0	75.3	7.3	82.7
14	20	1.6	4.75	99.7	34.9	29.7	64.6
15	20	1.3	4.75	99.7	38.0	37.6	75.6
16	20	1.3	4.75	99.7	41.2	35.0	76.2

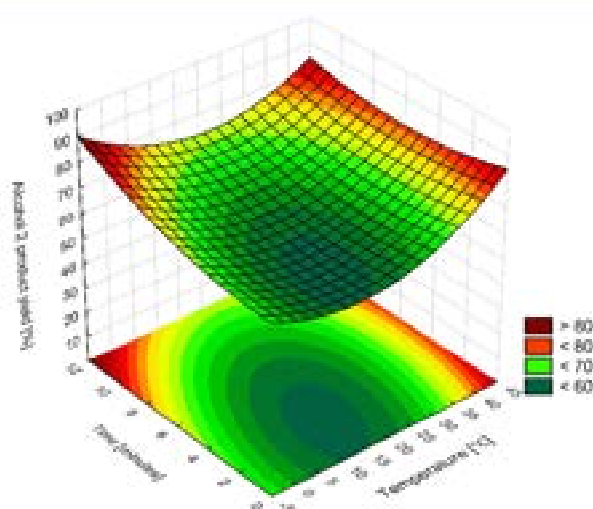
<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 50 mg (0.11 mmol); dissolved in 2 mL THF. <sup>b</sup> % determined by UHPLC; for details, see the ESI†

Furthermore, the reaction can be carried out with 2.5 mol% Ru-PNN with the high yield of both alcohols (up to 97.8%), but in this case, a longer reaction time is required to reach a high yield of alcohol products, and simultaneously we observed lower selectivity. Increasing the hydrogen pressure to 75 bar enhances the selectivity towards the desired **2** (Fig. 4); also the reaction is completed within 6 h. We also observed the same trend at 5 mol% loaded catalyst, and higher pressure led to better selectivity. Also in this case, 6 h was enough to achieve high yield, but we already started noticing the undesired product **2b**.

After the satisfactory results obtained in the batch procedure we tried to translate this process under continuous gas-liquid flow conditions. Flow experiments were performed using a Vapourtec R2C+ (Vapourtec Ltd, United Kingdom) system comprising HPLC pumps together with one gas-

liquid reactor (15 mL, id = 1 mm) and two stainless still reactors (10 mL, id = 1 mm). The two liquid feeds were introduced with HPLC pumps, and hydrogen gas was introduced through the gas-liquid reactor. The system pressure was maintained by three 8 bar passive back pressure regulators (for details and the scheme of the continuous flow experiments with Ru-complexes, see the ESI†). However, Kappe *et al.*<sup>21</sup> successfully hydrogenated ethyl 2,2-difluoro-2-phenylacetate to the corresponding alcohol using Ru-MACHO in MeOH in flow, we used Ru-PNN or Ru-MACHO complexes in toluene, recuperated only the hydrogenated substrate **1b**. Probably due to the very low solubility of NaOtBu in toluene and also the relatively short activation time in comparison to batch synthesis, we were not able to generate the active form of the catalyst under flow conditions. To confirm this hypothesis we also carried out the reaction catalyzed by the Ru-MACHO-BH catalyst previously reported to work without additional base activation. In the case under 23 bar of H<sub>2</sub> at 150 °C and in reagent flow rate = 0.1 mL min<sup>-1</sup> we obtained a 38% yield of both alcohol products (**2 + 2b**). Unfortunately, Ru-MACHO-BH is known to rapidly decompose in the presence of air, which makes it an undesirable choice for large-scale production, and we did not continue the assays with this catalyst.

Because of the failure of the Ru-catalyzed reduction of **1** in the flow process we continued the development of flow reduction in the presence of other reductive agents. In the literature, there are many examples of the reduction of esters or amides to aldehydes or amines in a continuous-flow reactor.<sup>24–26</sup> The most common reagent is DIBAL-H in toluene, while reactions are carried at low temperatures (–78–0 °C). In our case, ester **1** is almost insoluble in cold toluene. THF was most suitable for this reaction. The lowest temperature that we could achieve with a cooled gas generator was –60 °C. We carried out reactions at



**Fig. 5** Surface response for alcohol product **2** yield, central composite design model 2<sup>4</sup>(3), LiAlH<sub>4</sub> equivalent = 1.0.

**Table 3** Flow reduction of **1** results for a 1.7 mL microchip reactor

Reaction conditions <sup>a</sup>				Results <sup>b</sup> (%)			
Entry	T (°C)	Eq LAH	Time (min)	Conversion of <b>1</b>	Yield of <b>2</b>	Yield of <b>2b</b>	Yield of <b>2</b> + <b>2b</b>
1	20	1.3	0.166 (10 s)	98.5	76.2	11.9	88.1
2	20	1.3	0.25 (15 s)	99.3	74.2	13.8	88.0
3	20	1.3	0.33 (20 s)	99.7	70.6	18.2	88.8
4	20	1.3	0.42 (25 s)	99.9	66.9	21.6	88.5
5	20	1.3	0.5	99.7	66.9	21.0	87.9

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 50 mg (0.11 mmol); dissolved in 2 mL THF. <sup>b</sup> % determined by UHPLC for details see ESI†

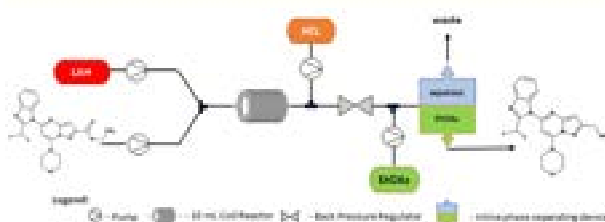
temperatures in the range of -60–0 °C and reaction times of 0.5–10 min. Unfortunately, in all cases, we observed a reduction to **2** and **3** (max. 30% yield) with **1** still remaining in large quantity. We also tried the same conditions with Red-Al®<sup>11</sup> with no success. In all cases, it was impossible to avoid overreduction to alcohol, and we decided to return to LAH, which is twice as cheaper as DIBAL-H. We found only one publication with the reduction of acids and esters to alcohols using LAH, where for this transformation Mohammadzadeh *et al.* designed a special flow system to avoid gas evolution and production of gelatinous solids.<sup>29</sup> In our work, we used a commercially available Vapourtec easy-Medchem system with three peristaltic pumps and two types of 10 mL PFA tube reactors (id = 1 mm). For the reactions at lowered temperatures (0–20 °C) we used Vapourtec cooled tube reactor. It consists of two internal 0.4 mL loops for pre-cooling the substrate feeds, a Y-shaped mixer, a 10 mL reaction loop, a quenching feed inlet, a Y-shaped mixer, and a 0.4 mL loop for quenching. For cooling, we used a cooled gas generator (part of the set) which required only compressed air and dry ice. The reaction was quenched in the reactor with 1 M HCl in water at a flow speed equal to half of the LAH flow speed. For the reactions at elevated temperatures (20–40 °C), we used a standard Vapourtec tubular reactor. The reactor was heated with a heater. For the standard tubular reactor the reaction was quenched just after the reaction using 1 M HCl in water solution in a Y-shaped mixer. The results acquired at a temperature of 20 °C were the same for both reactors. The system pressure was controlled using a manual backpressure regulator, depending on the flow speed to maintain 4–5 bar. During the reactions, there was no gas evolution observed from LiAlH<sub>4</sub> in the reactor; however, it could be observed after the BPR. No

gelatinous products were formed.<sup>29</sup> We also applied DoE to find the critical reaction parameters.

The central composition plan was used with three input variables such as reaction temperature (0–40 °C), residence time (0.5–10 min), and LiAlH<sub>4</sub> equivalents (1.0–1.6). Based on the results gathered in Table 2 the mathematical model with main linear effects for the product **2** yield was generated with a good fit to the experimental data,  $R^2 = 0.82$ . ANOVA analysis shows that only the LiAlH<sub>4</sub> equivalent has a statistically significant ( $p = 0.0426$ ) linear, negative influence on the product **2** yields. There are two statistically important factors for the substrate conversion (see the ESI†). The first one is the number of LAH equivalents, and the second is time. The number of LAH equivalents with a linear effect is negative, but the quadratic is positive. What's more, LAH eq. has the only statistically important positive linear effect of **2b** creation. The reaction time has a negative linear effect on substrate conversion. The longer the reaction time, the slower the reagents' flow speeds, and probably, the weaker the mixing. According to the model, the temperature has almost no impact on substrate conversion and the amount of **2b** creation but has a significant linear positive effect on the amount of side products (the higher the temperature, the more the impurities). For the reaction yield (sum of **2** and **2b**) the LAH equivalents have a linear positive effect, but a negative quadratic effect, probably due to emerging impurities. Moreover, both LAH equivalents in relation to time and temperature have a negative linear effect (Fig. S2†). As it results from the CCD model, the maximum predicted alcohol **2** product yield in the tested range is not greater than 77.3% at the minimum value of the temperature (0 °C), a minimum value of LiAlH<sub>4</sub> equivalent (1.0) and maximum time (10 min) (Fig. 5).

The model shows that the maximum yield can be obtained when the reaction is carried out at a temperature of 0 °C.

Cooling is not preferable in the flow process. Therefore, we calculated at what values of LiAlH<sub>4</sub> equivalent and reaction time we could obtain the maximum predicted product **2** yield at a more operable temperature of 20 °C (Fig. 5) At the minimum value of the LiAlH<sub>4</sub> equivalent (1.0) and maximum time (10 minutes) and temperature of 20 °C, we could theoretically obtain reaction efficiency up to 67%. We conducted a reaction for 1.0 LAH equivalents for the time of 10 min and at temperatures of 0 °C and 20 °C. Although



**Fig. 6** Continuous flow scheme for the LAH reduction experiments following by extraction.

## Paper

## Reaction Chemistry &amp; Engineering

**Table 4** Green metrics for the catalytic flow protocol and stoichiometric reduction of **1**<sup>a,b</sup>

Criterion	Ru-PNN-H <sub>2</sub> Batch <sup>a</sup>	LAH Batch <sup>a</sup>	LAH Flow <sup>a</sup>
Quantitative green metrics			
Conv. [%]	100	100	100
Yield [%]	93	89	83
AE	90.1	80.5	80.5
RME	59.5	70.4	67.8
OE	66.0	87.4	84.2
PMI reaction	32.5	18.1	95.2
PMI work-up	3.25	85.5	125.6
PMI total	35.8	103.6	220.9
E factor	34.6	102.6	219.9
Space-time yield [kg h <sup>-1</sup> m <sup>-3</sup> ]	2.83	6.33	1130
Qualitative green metrics			
Type of reaction	catalytic	stoichiometric	stoichiometric
Reactor	high pressure batch	batch	flow
Temperature [°C]	75	0	20
Critical element	Ru	Li, Al	Li, Al

<sup>a</sup> For details see the ESI.† <sup>b</sup> Value calculated considering solvent recycling; color code: ■ preferred, ■ acceptable, and ■ undesirable.

the conversion was full, the long reaction time led to overreduction to **2b** (70.3% of **2** and 20.6% for **2b** at 0 °C, and 53.8% of **2** and 32.4 for **2b** at 20 °C). These results did not match the model so we looked once again at the results from the DoE plan. Reaction entry 11 from Table 2 caught our attention due to the almost complete conversion of **1**. Short reaction time (0.5 min) and ambient temperature conditions were preferred for upscaling. The amount of LAH equivalents is lower than that used under batch conditions. Reaction in 1 g scale resulted in an overall yield of 83% and productivity of 11.3 g h<sup>-1</sup>. The shortest reaction time that we could achieve with a 10 mL reactor was 0.5 min (max. flow speed for each pump is 10 mL min<sup>-1</sup>; thus we acquired a 1.7 mL glass microchip reactor LTF-V (Little Things Factory GmbH, Germany)). We repeated the reaction with a time of 0.5 min, 20 °C, 1.3 LAH eq. The conversion in shorter times was almost quantitative. However, the rate of overreduction was higher than for the 10 mL reactor (Table 3). We also explored the possibility of doing extraction in flow using a Zaiput SEP-10 liquid/liquid separator (Zaiput, USA) (Fig. 6). Due to THF's high miscibility with water, we used a hydrophobic membrane (OB-400, Zaiput) and 1 M HCl in water:brine 1:1 instead of 1 M HCl in water. Also, the water phase had to be increased to the same flow speed as the LAH flow speed. For the organic phase extraction, we used an additional Vapourtec SF-10 pump and ethyl acetate. The flow speed of ethyl acetate had to be the same as the sum of the substrate and LAH flow speeds. The maximum total flow speed for this separator is 10 mL min<sup>-1</sup>, so the shortest

reaction time for which we could try the continuous extraction was 0.5 min. Due to lower microchip reaction volume, the productivity would be lower. It would be possible to intensify the process in a 10 mL reactor by using more efficient pumps and a liquid/liquid separator (e.g., Zaiput SEP-200).

In order to evaluate the environmental impact of the different modes of 5-[2-(difluoromethyl)-1*H*-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolopyrimidine-2-carboxylate (**1**) reduction we also compared the green metrics<sup>30–32</sup> of all three successful methods (Table 4). In all cases the conversion is complete. The atom economy in the catalytic reaction is higher, yet the reaction mass efficiency and optimum efficiency are much lower than those for reduction with LAH, both in batch and in flow. Notably the higher PMI and E-factor in flow reduction are caused by the low solubility of the substrate. However, the most important difference is the almost 400-fold and 180-fold higher space-time yields, in comparison to those in the Ru-PNN-H<sub>2</sub> batch reaction and LAH batch reaction, respectively. Reduction with LAH in flow at ambient temperature does not require additional heating or cooling; thus we consider the flow process as less energy-consuming than the batch LAH reduction or catalytic reduction with Ru-complexes. The additional drawback from the environmental point of the Ru-MACHO reduction is that the catalyst is not recycled, and ruthenium is considered a critical element, the stock of which could be expired within 50 years, while the supplies of aluminum and lithium are bigger.<sup>31</sup>

## Conclusions

We developed a simple method under mild conditions, using lithium aluminum hydride solution to reduce the ester to the alcohol in the flow procedure. The reaction was conducted on a commercially available Vapourtec easy-Medchem system. The developed method is not only very effective but also chemoselective, giving the desired product **2** in an 83% yield (selectivity towards **2** = 91.1%) with a productivity of 11.3 g h<sup>-1</sup>. The process has also a very high space-time yield (1130 kg h<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>). By avoiding overreduction in the difluoro-methyl benzimidazole ring we obtained a more soluble product. This may reduce the amount of solvents used in the next synthesis steps.

## Abbreviations

### Acronyms

AE	Atom economy
DIBAL-H	Diisobutylaluminum hydride
DoE	Design of experiment
E factor	Environmental factor
eq.	Equivalents
LAH	Lithium aluminium hydride (LiAlH <sub>4</sub> )
OE	Optimum efficiency
PMI	Process mass intensity

Red-Al® Sodium bis(2-methoxyethoxy)aluminum hydride  
 RME Reaction mass efficiency  
 THF Tetrahydrofuran

## Author contributions

Synthesis, S. M. and A. M.; analytical evaluation, L. G.-B. and W. M.; investigation, S. M. and A. M.; writing - original draft preparation, S. M. and A. M.; writing - review and editing, L. G.-B., W. M., M. Z., and Z. O.; DoE and statistical analysis: L. G.-B.; visualization A. M. and L. G.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Conflicts of interest

The authors declare the following financial interest/personal relationships which may be considered as potential competing interests. All contributors to this work (except Z. O.) at the time of their direct involvement in the project were full-time employees of Celon Pharma SA. M. Wieczorek is the CEO of Celon Pharma SA. Some of the authors are the shareholders of Celon Pharma SA. This work was financially supported by The National Centre for Research and Development (POIR.01.02.00-00-0085/18-00).

## Acknowledgements

This research was co-financed by the National Centre for Research and Development "Narodowe Centrum Badan i Rozwoju" and Celon Pharma SA, project "KICHA1 - Preclinical and clinical development of innovative lipid kinases inhibitor as a candidate for the treatment of steroid-resistant and severe inflammatory lung diseases", grant number POIR.01.02.00-00-0085/18-00. We thank Dr Krzysztof Wisniewski and Dr Damian Smuga (Celon Pharma SA) for fruitful discussion, Ms Aleksandra Świdorska and Mr Arkadiusz Leniak (Celon Pharma SA) for NMR analyses and practical suggestions, and Ms Mariola Stypik (Celon Pharma SA) for help in some preliminary tests with batch reduction with LAH.

## Notes and references

- T. Saurat, F. Buron, N. Rodrigues, M.-L. de Tauzia, L. Colliandre, S. Bourg, P. Bonnet, G. Guillaumet, M. Akssira, A. Corlu, C. Guillouzo, P. Berthier, P. Rio, M.-L. Jourdan, H. Bénédetti and S. Routier, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 613.
- P. J. Parker, *Biochem. Soc. Trans.*, 2004, **32**, 893.
- J. A. Engelman, J. Luo and L. C. Cantley, *Nat. Rev. Genet.*, 2006, **7**, 606.
- J. G. Foster, M. D. Blunt, E. Carter and S. G. Ward, *Pharmacol. Rev.*, 2012, **64**, 1027.
- B. S. Safina, S. Baker, M. Baumgardner, P. M. Blaney, B. K. Chan, Y.-H. Chen, M. W. Cartwright, G. Castaneda, C. Chabot, A. J. Cheguillaume, P. Goldsmith, D. M. Goldstein, B. Goyal, T. Hancox, R. K. Handa, P. S. Iyer, J. Kaur, R. Kondru, J. R. Kenny, S. L. Krintel, J. Li, J. Lesnick, M. C. Lucas, C. Lewis, S. Mukadam, J. Murray, A. J. Nadin, J. Nonomiya, F. Padilla, W. S. Palmer, J. Pang, N. Pegg, S. Price, K. Reif, L. Salphati, P. A. Savy, E. M. Seward, S. Shuttleworth, S. Sohal, Z. K. Sweeney, S. Tay, P. Tivitmahaisoon, B. Waszkowycz, B. Wei, Q. Yue, C. Zhang and D. P. Sutherlin, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 5887.
- (a) A. Hanlon and D. M. Brander, *Hematology*, 2020, **2020**, 346; (b) FDA approval of lymphoma medicine Ukoniq (umbralisib) is withdrawn due to safety concerns, FDA.
- M. Stypik, S. Michalek, N. Orłowska, M. Zagozda, M. Dziachan, M. Banach, P. Turowski, P. Gunerka, D. Zdzalik-Bielecka, A. Stańczak, U. Kędzierska, K. Mulewski, D. Smuga, W. Maruszak, L. Gurba-Bryśkiewicz, A. Leniak, W. Pietrusz, Z. Ochal, M. Mach, B. Zygmunt, J. Pieczykołan, K. Dubiel and M. Wieczorek, *Pharmaceuticals*, 2022, **15**, 927.
- L. Ducry, D. Roberge, M. Mathier and M. Gottspöner, WO2009003661A1, 2008.
- L. I. Zakharkin and I. M. Khorlina, *Tetrahedron Lett.*, 1962, **3**, 619.
- (a) A. R. Jeon, M. E. Kim, J. K. Park, W. K. Shin and D. K. An, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 4420; (b) Z. Fülöp, P. Bana, I. Greiner and J. Éles, *Molecules*, 2021, **26**, 2040.
- W. K. Shin, D. Kang and D. K. An, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2014, **35**, 2169.
- S. Michalek, L. Gurba-Bryśkiewicz, W. Maruszak, M. Zagozda, A. M. Maj, Z. Ochal, K. Dubiel and M. Wieczorek, *RSC Adv.*, 2022, **12**, 33605.
- J. Pritchard, G. A. Filonenko, R. van Putten, E. J. M. Hensen and E. A. Pidko, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3808.
- D. Spasyuk, S. Smith and D. G. Gusev, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 2538.
- P. A. Dub and T. Ikariya, *ACS Catal.*, 2012, **2**, 1718.
- L. A. Saudan, C. M. Saudan, C. Debieux and P. Wyss, *Angew. Chem.*, 2007, **119**, 7617.
- D. Spasyuk, S. Smith and D. G. Gusev, *Angew. Chem.*, 2012, **124**, 2826.
- W. Kuriyama, T. Matsumoto, O. Ogata, Y. Ino, K. Aoki, S. Tanaka, K. Ishida, T. Kobayashi, N. Sayo and T. Saito, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, **16**, 166.
- S. Werkmeister, K. Junge and M. Beller, *Org. Process Res. Dev.*, 2014, **18**, 289.
- Y. Shaalan, L. Boulton and C. Jamieson, *Org. Process Res. Dev.*, 2020, **24**, 2745.
- M. Prieschl, J. Garcia-Lacuna, R. Munday, K. Leslie, A. O'Kearney-McMullan, C. A. Hone and C. O. Kappe, *Green Chem.*, 2020, **22**, 5762.
- TIBCO Software Inc., *Data Science Textbook*, 2020, <https://docs.tibco.com/data-science/textbook>, accessed: 30th November 2022.
- StatSoft's *Electronic Statistics Textbook*, StatSoft Inc., 2006, <https://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>, accessed 30th November 2022.
- M. Yoshida, H. Otaka and T. Doi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, **2014**, 6010.
- N. Uhlir, A. Martins and D. Gao, *Org. Process Res. Dev.*, 2020, **24**, 2326.
- L. Ducry and D. M. Roberge, *Org. Process Res. Dev.*, 2008, **12**, 163.

## Paper

## Reaction Chemistry &amp; Engineering

- 27 D. Webb and T. F. Jamison, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 568.
- 28 D. Riley and N. Neyt, *Synthesis*, 2018, **50**, 2707.
- 29 A. Mohammadzadeh, S. Sharif, V. Semeniuchenko, N. Townsend, A. D. Corbett and M. G. Organ, *J. Flow Chem.*, 2022, **12**, 131.
- 30 C. R. McElroy, A. Constantinou, L. C. Jones, L. Summerton and J. H. Clark, *Green Chem.*, 2015, **17**, 3111.
- 31 D. J. C. Constable, A. D. Curzons and V. L. Cunningham, *Green Chem.*, 2002, **4**, 521.
- 32 R. A. Sheldon, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2018, **6**, 32.

## Development and optimization of a continuous flow ester reduction with $\text{LiAlH}_4$ in the synthesis of a key intermediate for PI3K $\delta$ inhibitor (CPL302415).

Stanisław Michalek,<sup>a,b\*</sup> Anna M. Maj,<sup>a\*</sup> Lidia Gurba-Bryśkiewicz,<sup>a</sup> Wioleta Maruszak,<sup>a</sup> Marcin Zagozda,<sup>a</sup> Zbigniew Ochal,<sup>b</sup> Krzysztof Dubiel<sup>a</sup> and Maciej Wieczorek<sup>a</sup>

### Contents

1. Materials and Methods .....	S1
1.1. Design of Experiments (DoE).....	S2
1.2. High Field NMR.....	S2
1.3. UHPLC analytical method.....	S2
1.4. Note of Caution .....	S3
2. Experimental Details .....	S4
3. DoE Analysis .....	S8
4. Green metrics calculations.....	S12
5. NMR spectrum and HRMS analysis .....	S14
6. Real photo of the flow equipment.....	S17
7. References.....	S17

### 1. Materials and Methods

Solvents and chemicals were obtained from commercial suppliers and were used without any further purification unless otherwise noted. The 5-[2-(difluoromethyl)-1H-1,3-benzimidazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolopyrimidine-2-carboxylate (**1**) was synthesized according to the procedure published by us.<sup>1,2</sup> Hydrogen was purchased from Air Product. The Ru-MACHO, Ru-PNN, dichlorobis[2-(diphenylphosphino)ethylamine]ruthenium(II), and Ru-SNS were obtained from Sigma Aldrich; Ru-MACHO-BH was obtained from TCI; NaOtBu was obtained from MERCK. Lithium aluminum hydride (LAH) 1M in THF solution was purchased from Sigma-Aldrich and used as such. THF was purchased from VWR and dried by adding 3Å molecular sieves at least 48h prior to the reaction.

**The batch hydrogenation** was performed in Büchi stainless steel autoclave (max pressure 100 bar, max temperature 300°C). **Flow experiments with H<sub>2</sub>** were performed using a Vapourtec R2C+ with one gas-liquid reactor (15 mL, id = 1 mm) and two stainless steel reactors (10 mL, id = 1 mm). All tubes and mixers were bought from Vapourtec. Pressure to the system was maintained in the system using a back pressure regulator of 8 bar (BPR).

Main components utilized within a continuous flow reactor in experiments with H <sub>2</sub>	
Pump	Vapourtec RC2+ HPLC pump
Mixer	Vapourtec Y-type mixer Material: PTFE i.d. = 1 mm Internal volume <0.1mL
Reactor	Gas-liquid reactor (15 mL, id = 1 mm) Stainless steel reactors (10 mL, id = 1 mm) Temperature control: Vapourtec RC2+
Back pressure regulator	Vapourtec 8 bar passive BPR
Miscellaneous fittings	Vapourtec PFA tubes i.d. = 1 mm



## Flow experiments with LAH

Main components utilized within a continuous flow reactor in experiments with LAH	
Pump	Vapourtec easy-Medchem V-3 pump peristaltic pump Vapourtec SF-10 peristaltic pump
Mixer	Vapourtec Y-type mixer Material: PTFE i.d. = 1 mm Internal volume < 0.1mL
Reactor	Vapourtec Cooled tube reactor Vapourtec Tubular reactor
Back pressure regulator	Vapourtec adjustable pressure regulator
Miscellaneous fittings	Vapourtec PFA tubes i.d. = 1 mm
Liquid/liquid separator	Zaiput Sep-10 (max. flow rate 10 ml min <sup>-1</sup> ) Membrane OB-400

## 1.1 Design of Experiments (DoE)

The DoE study and statistical analysis were performed using the design of experiment tools of STATISTICA software (v.13.3). The experimental data were fitted using multiple linear regression. The main and interaction effects were generated based on multivariate ANOVA. The statistical significance level was set up to 0.05. The goodness of fit of the models was expressed in regression coefficient  $R^2$ .

## 1.2 High Field NMR

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were performed on JOEL JNMR-ECZR 600 MHz spectrometers with <sup>1</sup>H being observed at 600 MHz and <sup>13</sup>C at 151 MHz. Chemical shifts for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C were reported in  $\delta$  (ppm) using the residual proton in a deuterated solvent. Mass spectra (Atmospheric Pressure Ionization Electrospray, API-ES) were obtained on Agilent 6130 LC/MSD spectrometer or Agilent 1290 UHPLC coupled with Agilent QTOF 6545 mass spectrometer.

## 1.3 UHPLC analytical method

Reaction in-process monitoring was conducted by the RP UHPLC method using the parameters listed in Table 1.3.1:

Table 1.3.1. Chromatographic conditions

Parameters	Range
Instrumentation	Ultra-high-performance liquid chromatograph equipped with an UV/DAD detector, autosampler, and column heater
Column	Acquity UPLC CSH C18; 2.1 mm x 100 mm, 1.7 $\mu$ m
Mobile phases	Phase A: 0.1% ortho-phosphoric acid in water Phase B: 0.1% ortho-phosphoric acid in ACN
Diluent	Methanol
Flow	0.5 mL min <sup>-1</sup>
Run time	11 min
Column temperature	30°C
Autosampler temperature	10°C
Injection volume	1 $\mu$ L
Detection Wavelength	254 nm
Typical Retention Time	Ester <b>1</b> about 5.6 min, Alcohol <b>2</b> about 3.7 min Alcohol <b>2b</b> about 4.1 min
Rinsing the column	After analysis rinse the column for 10 min using ACN : water (10:90, v/v) solution then during 10 min using ACN; store the column with ACN
Gradient program	
Time, min	Mobile phase A, % Mobile phase B, %
0.0	90.0 10.0

6.0	40.0	60.0
7.5	10.0	90.0
9.0	10.0	90.0
9.10	90.0	10.0
11.0	90.0	10.0

#### Reporting of results and calculations

##### System suitability:

- The resolution between the peaks of alcohol **2** and its nearest impurity must not be less than 1.5;
- Symmetry factor for alcohol **2** peak: within the range from 0.8 to 1.5;

##### Evaluation of chromatograms

- Disregard peaks from the blank matrix and diluents;
- Disregard peaks less than 0.05%;

##### Calculations

The progress of the reaction (product alcohol **2** yield) was controlled based on the normalization procedure according to the following formula:

$$X = \frac{A_x \cdot CF \cdot 100\%}{\sum A_{xi}}$$

where:

$X$  – alcohol product **2** percentage of in the chromatogram of the sample solution,

$A_x$  – alcohol **2** peak area in the chromatogram of the sample solution,

$CF$  – correction factor of alcohol **2** versus ester **1**

$\sum A_{xi}$  – the sum of the areas of all integrated peaks in the chromatogram of the sample solution.

#### 1.4 Note of Caution

The  $H_2$  is extremely flammable! Pressurized equipment should be operated with care! Before conducting any experiments, an individual, careful safety assessment including reaction kinetics and explosive hazards should be carried out!

Warning! Lithium aluminum hydride and its solutions are highly corrosive, react vigorously with water, acids, and alcohols and can easily catch fire in contact with air. It can cause friction induced ignition. There is risk of explosion by shock, friction, fire, or other sources of ignition. All operations with lithium aluminum hydride and its solutions should be carried with extreme caution under inert atmosphere.

## 2. Experimental Details

### 2.1 Batch experiments

#### General procedure for hydrogenation of **1**.

All reactions were carried out under an inert argon atmosphere using standard Schlenk techniques. Toluene was dried under molecular sieves and degassed with Ar prior to use. A 50 mL Schlenk flask, equipped with a magnetic stir bar, was charged with the catalyst. Then, the Schlenk was conditioned by three vacuum/nitrogen cycles and the degassed toluene (8 mL) was added. The mixture with the precatalyst was stirred at room temperature for 15 min before cannula transfer into a conditioned by three vacuum/nitrogen cycles 50 mL stainless steel autoclave containing the substrate and NaOtBu. The autoclave was purged and pressurized with molecular hydrogen and the reaction was performed at the specified temperature during the indicated time. At the end of the reaction, the autoclave was cooled and depressurized. The mixture was analyzed by UHPLC.

Entry	Catalyst loading (%)	base (mol%)	T (°C)	PH <sub>2</sub> (bar)	Time (h)	% of <b>1</b> <sup>a</sup>	% of <b>1b</b> <sup>a</sup>	% of <b>2</b> <sup>a</sup>	% of <b>2b</b> <sup>a</sup>
1	0.02	KOtBu 0.2	80	50	24h	3.49	83.69	0.48	5.02
2	0.02	NaOtBu 0.2	80	50	16h30min	1.74	82.30	0	15.96
3	0.02	NaOtBu 0.2	80	50	24h	4.35	61.04	3.25	28.01
4	0.02	NaOtBu 0.2	80	50	70h30min	0.77	54.34	0.19	44.70
5	0.05	NaOtBu 0.5	80	75	70h	0	0	0.18	84.94

**Table S1.** Additional conditions screened for Ru-MACHO (**cat 1**) catalyzed reduction of **1**

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 150 mg (0.339 mmol); catalyst/ base = 1/10; Toluene = 8 mL; <sup>b</sup> determined by UHPLC.

**Table S2.** Results for CCD 2<sup>A</sup>(4) DoE plan for Ru-PNN (**cat 2**) catalyzed reduction of **1**

Entry	Catalyst loading (%)	T (°C)	PH <sub>2</sub> (bar)	Time (h)	% of <b>1</b> <sup>a</sup>	% of <b>1b</b> <sup>a</sup>	% of <b>2</b> <sup>a</sup>	% of <b>2b</b> <sup>a</sup>	Σ % of 2+2b <sup>b</sup>
1	2.5	50	50	6	98.50	0	0	0	0
2	2.5	50	50	24	98.56	0	0	0	0
3	2.5	50	75	6	97.74	0	0	0	0
4	2.5	50	75	24	96.44	0	0	0	0
5	2.5	80	50	6	96.77	0	0	0	0
6	2.5	80	50	24	1.17	0	45.29	52.64	97.93
7	2.5	80	75	6	2.08	0	88.86	0.75	89.61
8	2.5	80	75	24	0.00	0	84.31	15.69	100.00
9	5.0	50	50	6	93.38	0	0.00	0	0
10	5.0	50	50	24	1.86	0	75.95	0	75.95
11	5.0	50	75	6	89.08	0	0.00	0	0
12	5.0	50	75	24	1.09	0	90.15	2.29	92.44
13	5.0	80	50	6	92.58	0	0.00	0	0
14	5.0	80	50	24	4.45	0	21.81	66.20	88.01
15	5.0	80	75	6	3.17	0	85.77	6.97	92.74
16	5.0	80	75	24	0.00	0	6.30	88.53	94.83
17	2.5	65	62.5	15	98.04	0	0.00	0	0
18	5.0	65	62.5	15	5.02	0	67.35	21.73	89.08
19	3.75	50	62.5	15	94.67	0	0.00	0	0
20	3.75	80	62.5	15	12.62	0	45.81	39.06	84.87
21	3.75	65	50	15	0.94	0	60.44	35.22	95.66
22	3.75	65	75	15	1.55	0	85.43	9.93	95.36
23	3.75	65	62.5	6	96.34	0	0.00	0	0
24	3.75	65	62.5	24	0.00	0	6.76	93.24	100.00
25 (C)	3.75	65	62.5	15	0.00	0	26.31	69.32	95.63
26 (C)	3.75	65	62.5	15	0.45	0	38.18	57.11	95.29
27 (C)	3.75	65	62.5	15	0.00	0	23.99	76.01	100.00

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 150 mg (0.339 mmol); catalyst/ NaOtBu = 1/10; Toluene = 8 mL; <sup>b</sup> determined by UHPLC.

Entry	Catalyst loading (%)	T (°C)	P <sub>H<sub>2</sub></sub> (bar)	Time (h)	% of <b>1</b> <sup>a</sup>	% of <b>1b</b> <sup>b</sup>	% of <b>2</b> <sup>b</sup>	% of <b>2b</b> <sup>b</sup>	Σ % of <b>2+2b</b> <sup>b</sup>
1	1	113	60	24	76.64	0	19.55	0	19.55
2	1.5	120	65	36	3.84	7.37	76.41	12.38	88.79

**Table S3.** Additional conditions screened for Ru-PNN (**cat 2**) catalyzed reduction of **1**

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 150 mg (0.339 mmol); catalyst/ NaOtBu = 1/10; Toluene = 8 mL; <sup>b</sup> determined by UHPLC.

### Reduction with LAH in batch

Lithium aluminum hydride solution (1M in THF, 8.00 mL, 7.20 g, 8.00 mmol) was added to the suspension of **13** (2.40 g, 5.30 mmol) in dry THF (28.0 mL) at 0°C. The suspension was stirred at 0°C for 3 h. The reaction was quenched with 1.0M HCl (14.0 mL). Then, water (70 mL) and AcOEt (90 mL) were added and the mixture was then allowed to warm to room temperature and stirred for 0.5 h. The organic layer was separated, dried over sodium sulphate, and filtered. The solvent was removed under reduced pressure. The solid was macerated with DCM to give the compound **2b** (1.90 g, 4.72 mmol) as a light yellow solid with an 89% yield.

## 2.2 Flow experiments

### Flow experiments with Ru-catalyst and hydrogen

**Feed 1:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere using standard Schlenk techniques. Toluene was dried under molecular sieves and degassed with Ar prior to use. A 50 mL Schlenk flask was charged with 100 mg of **1** (0.226 mmol). Next, the Schlenk was conditioned by three vacuum/nitrogen cycles and then the dry and degassed toluene (20 mL) was added. The resulting suspension was placed within an ultrasound bath at 40°C until complete dissolution of **1** was observed.

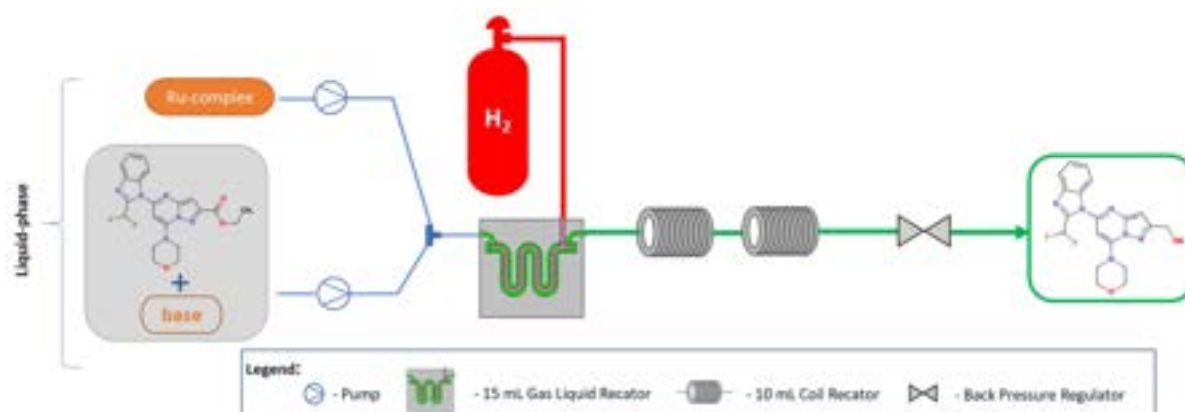
**Feed 2:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere using standard Schlenk techniques. Toluene was dried under molecular sieves and degassed with Ar prior to use. A 50 mL Schlenk flask was charged with 8.8 mg of Ru-PNN (**cat 2**) (0.0113 mmol). The second Schlenk was charged with 12.8 mg of KOtBu (0.113 mmol). Next, both Schlenk tubes were conditioned by three vacuum/nitrogen cycles and then the dry and degassed toluene was added 10 mL to each Schlenk tube. The resulting suspension was heated at 70°C until complete dissolution was observed.

### Flow procedure

The flow setup (Scheme S1) consisted of two high-pressure liquid chromatography (HPLC) pumps (Vapourtec R2C+) for introducing the liquid feeds. H<sub>2</sub> gas was introduced from a gas cylinder through a gas-liquid reactor (Vapourtec Gas-Liquid reactor 15 mL liquid volume). Gas pressure was regulated by a gas reducer. The two liquid feeds were mixed within an arrow-shaped mixer. The liquid stream was then combined with the gaseous in the gas-liquid reactor, then transferred into two following stainless steel reactors. The mixer was connected to the reactor coil using fluoropolymer tubing (PFA, 0.8 mm inner diameter). The temperature was set by Flow Commander software. The pressure was maintained by a back pressure regulator (BPR).

### Reaction conditions

T = 150°C. P<sub>H<sub>2</sub></sub> = 25 bar. P<sub>sys</sub> = 18 bar. Flow of **1** = 0.15 mL min<sup>-1</sup>. Flow of **2** = 0.05 mL min<sup>-1</sup>.



**Scheme S1.** Continuous flow scheme for the Ru-catalysed hydrogenation experiments.

## Flow experiments with Ru-MACHO-BH catalyst and hydrogen

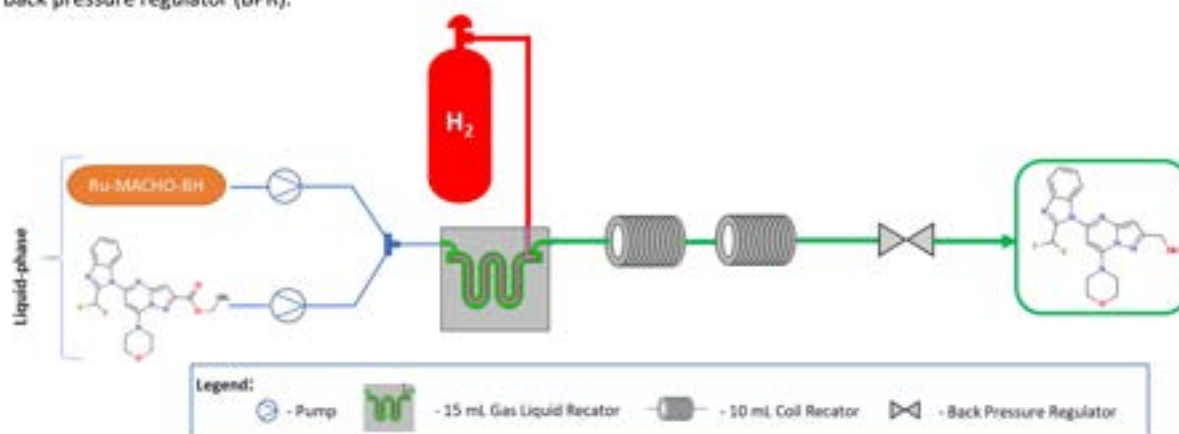
## Feed Preparation

**Feed 1:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere using standard Schlenk techniques. Toluene was dried under molecular sieves and degassed with Ar prior to use. A 50 mL Schlenk flask was charged with 50 mg of **1** (0.113 mmol). Next, the Schlenk was conditioned by three vacuum/nitrogen cycles and then the dry and degassed toluene (6.5 mL) was added. The resulting suspension was placed within an ultrasound bath at 40°C until complete dissolution of **1** was observed.

**Feed 2:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere using standard Schlenk techniques. Toluene was dried under molecular sieves and degassed with Ar prior to use. A 50 mL Schlenk flask was charged with 7.5 mg of Ru-MACHO-BH (cat **5**). Next, the Schlenk was conditioned by three vacuum/nitrogen cycles and then the dry and degassed toluene (13 mL) was added. The resulting suspension was placed within an ultrasound bath at 70°C until complete dissolution of cat **5** was observed.

## Flow procedure

The flow setup (Scheme S5) consisted of two high-pressure liquid chromatography (HPLC) pumps (Vapourtec R2C+) for introducing the liquid feeds. H<sub>2</sub> gas was introduced from a gas cylinder through a gas-liquid reactor (Vapourtec Gas-Liquid reactor 15 mL liquid volume). Gas pressure was regulated by a gas reducer. The two liquid feeds stored all time under Ar were mixed within an Y-shaped mixer. The liquid stream was then combined with the gaseous in the gas-liquid reactor, then transferred into two following stainless still reactors. The mixer was connected to the reactor coil using fluoropolymer tubing (PFA, 0.8 mm inner diameter). The temperature was set by Flow Commander software. The pressure was maintained by a back pressure regulator (BPR).



Scheme S5. Continuous flow scheme for the Ru-MACHO-BH hydrogenation experiments.

Entry	Catalyst loading (%)	PH <sub>2</sub> (bar)	Flow of H <sub>2</sub> (mL/min)	Flow of reagents F1/F2 (mL/min)	Time (min)	% of <b>1</b> <sup>a</sup>	% of <b>1b</b> <sup>b</sup>	% of <b>2</b> <sup>a</sup>	% of <b>2b</b> <sup>b</sup>	Σ % of <b>2+2b</b> <sup>b</sup>
1	Ru-MAHO-BH (7.5mg in 13ml)	23	nd	0.1/0.2	116	14.9	38.1	22.5	15.6	38.1
2 <sup>c</sup>	Ru-MAHO-BH (3.3mg in 7.5ml)	36	10	0.1/0.1		14.1	42.9	12.6	13.7	26.3
3	Ru-MAHO-BH (7.5mg in 13ml)	20	nd	0.1/0.2	116	11.1	32.2	17.6	16.3	33.4

Table S4. Ru-MACHO-BH (cat **5**) catalyzed reduction of **1** in flow conditions.

<sup>a</sup> Standard reaction conditions: substrate **1** = 50 mg (0.113 mmol); T= 150°C; Toluene; F1 – feed 1; F2 – feed 2; <sup>b</sup> determined by UHPLC; <sup>c</sup> the flow of H<sub>2</sub> was determined by incorporated into the line Gas Module ThalesNano

## Flow experiments with LAH

## Feed Preparation

**Feed 1:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere. THF was dried under molecular sieves prior to use. A 50 mL oven dried round flask was charged with 1.25 g of **1** (2.83 mmol) and 50 mL of THF. The resulting suspension was placed within an ultrasound bath at 40°C until complete dissolution of **1** was observed.

**Feed 2:** All reactions were carried out under an inert argon atmosphere. THF was dried under molecular sieves prior to use. A 50 mL oven dried round flask was charged with 47.3 mL THF and 3.7 mL 1M LAH in THF (3.7 mmol; 1.3 eq).

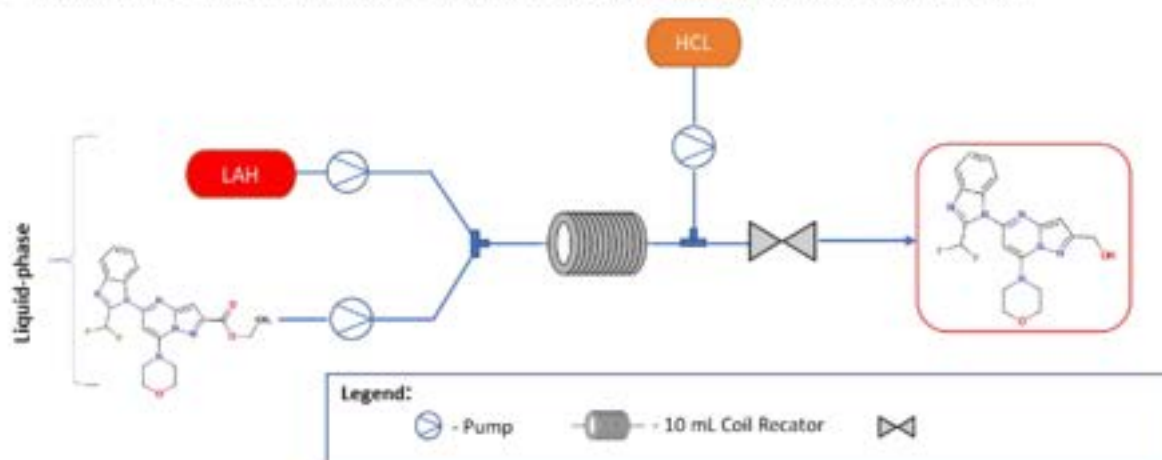
**Feed 3:** 1M HCl was prepared in glass bottle by diluting concentrated HCl with demineralised water

#### Flow procedure

The flow setup (Scheme S3) consisted of two peristaltic pumps (Vapourtec V-3) for introducing the liquid feeds. The two liquid feeds stored all time under Ar were mixed within a Y-shaped mixer inside the reactor, then allowed to react in the tube reactor (Vapourtec 10mL cooled tube reactor). The reaction mixture was quenched by 1M HCl feed in a Y-shape mixer just after reactor. The pressure was maintained manually by back-pressure regulator. The reaction temperature and flow speeds were controlled by Flow Wizard<sup>®</sup> software. The reaction mixture was collected at a steady state for 4min (equivalent of 1.0 g of substrate). Reaction mixture was transferred to funnel separator. Then, brine was added (10mL) and the mixture was extracted with ethyl acetate (2 × 20 mL). Organic phases were combined, dried over sodium sulphate and solvents were evaporated under reduced pressure. To the residue yellow oil, MTBE (10 mL) was added and stirred for 3h. Precipitated solid was filtered and air-dried resulting in 0.753 g of pale yellow solid.

#### Reaction

T = 20°C. Flow of **1** = 10 mL min<sup>-1</sup>. Flow of **2** = 10 mL min<sup>-1</sup>. Flow of **3** = 5 mL min<sup>-1</sup>. System pressure 4 - 5 bar.



Scheme S3. Continuous flow scheme for the LAH reduction experiments.



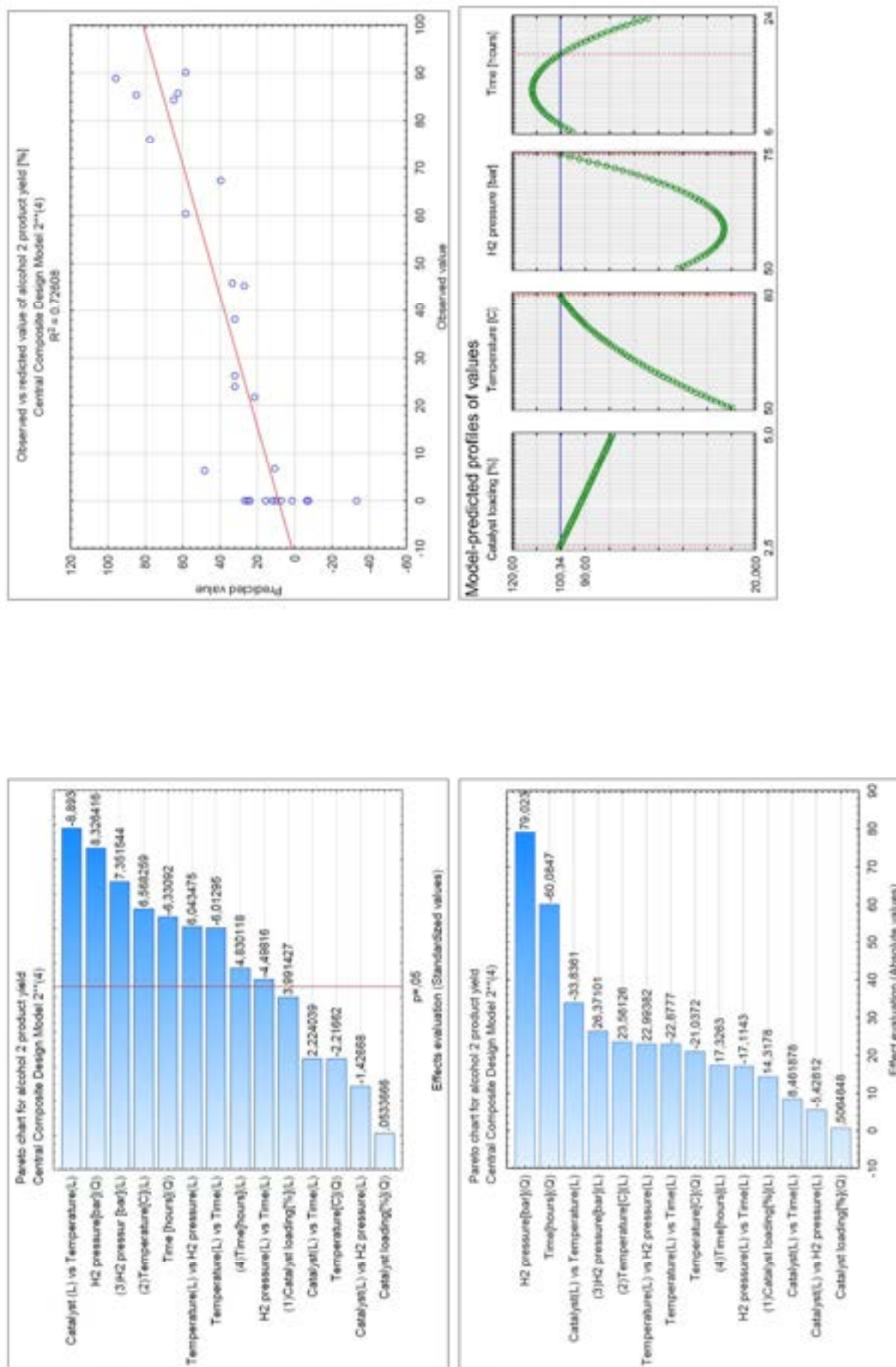
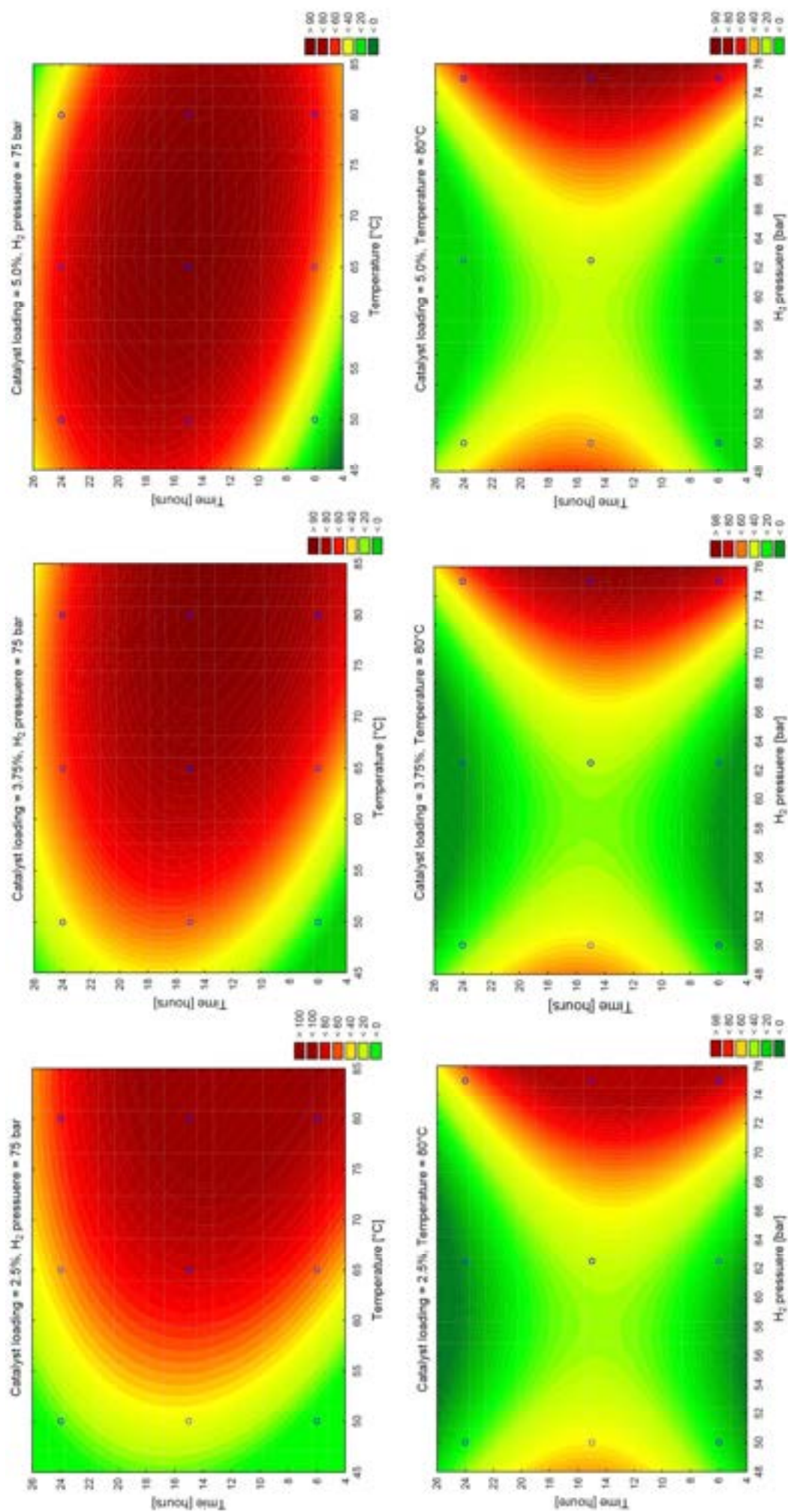


Figure S1. Summary of the CCD 2<sup>4</sup>(4) DoE model for Ru-PNN (cat 2) catalyzed reduction of 1.



Figure S2. Selected graphs of surface responses for alcohol product 2 yield of the CCD 2<sup>(4)</sup> DoE model for Ru-PNN (cat 2) catalyzed reduction of 1.

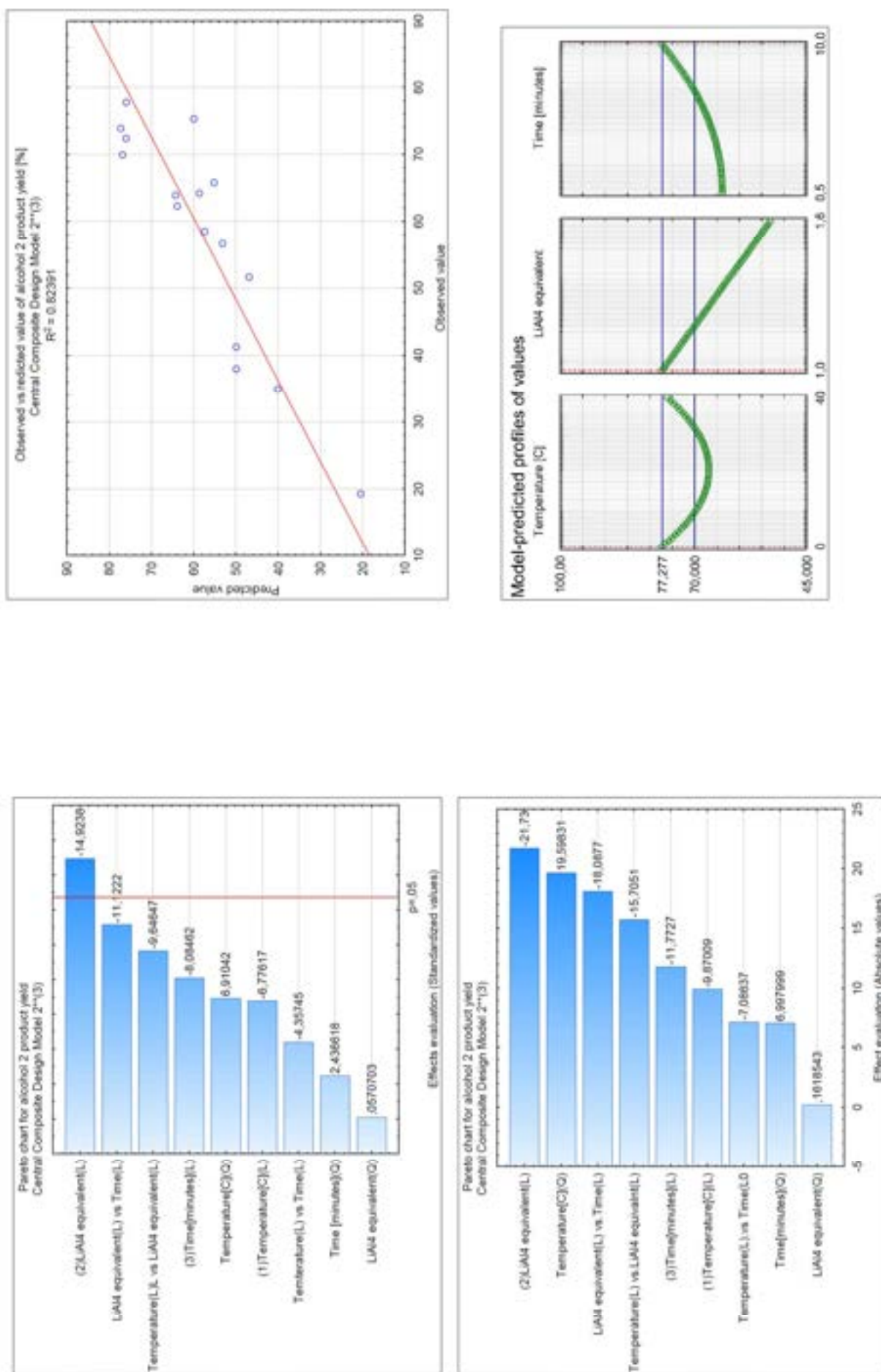


Figure S3. Summary of the CCD 2<sup>3</sup>(3) DoE model for flow reduction of 1 in the presence of LAH.

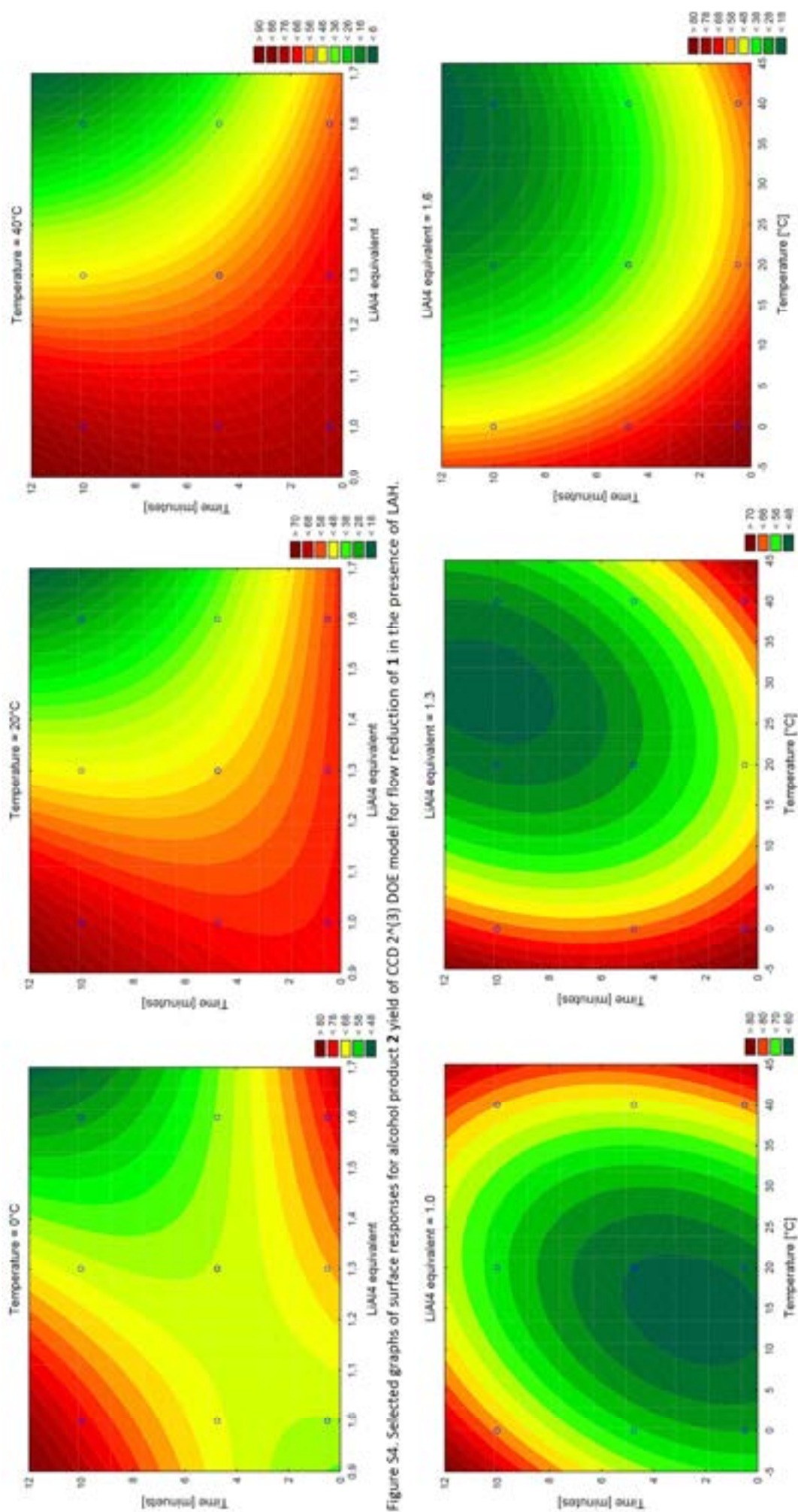


Figure S4. Selected graphs of surface responses for alcohol product 2 yield of CCD 2<sup>(3)</sup> DOE model for flow reduction of 1 in the presence of LAH.

**4. Green metrics calculations**<sup>3-5</sup>

$$AE (\%) = \frac{\text{Mol wt of product} \times 100}{\text{Sum of mol wts of reactants}}$$

$$RME (\%) = \frac{\text{Mass of product} \times 100}{\text{Total mass of reactants}}$$

$$OE (\%) = \frac{RME \times 100}{AE}$$

$$PMI(\text{reaction}) = \frac{\text{Total mass in reaction}}{\text{Mass of product}}$$

$$E = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Mass of product}}$$

$$WI = \frac{\text{Total mass of waste}}{\text{Total mass input}}$$

$$\text{Spacetime yield} = \frac{\text{Mass of product}}{\text{Reaction time} \times \text{volume of reactor used}}$$

**4.1. Ru-PNN -catalyzed batch reduction of 1.**

Role	Chemical	MW (g mol <sup>-1</sup> )	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g mL <sup>-1</sup> )
<b>Reaction</b>					
Reactant	Substrate (1)	442.43	1		
Reactant	H <sub>2</sub>	2	0.428		
Catalyst	Ru-PNN	745.64	0.044		
Reagent	NaOtBu	96.1	0.056		
Solvent	Toluene	92.14	26.1	30	0.867
	<b>Reaction total</b>		27.628		
<b>Work up</b>					
Solvent	Toluene	92.14	2.61	3	0.867
	Celite®		0.15		
	<b>Wort-up total</b>		2.76		
	<b>Reaction and work-up total</b>		30.388		
<b>Product</b>					
Product	Product (2b)	400.39	0.85		

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.00085	6	0.00005

## 4.2. LAH reduction of 1 in batch

Role	Chemical	MW (g mol <sup>-1</sup> )	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g mL <sup>-1</sup> )
<b>Reaction</b>					
Reactant	Substrate (1)	442.43	2.43		
Reductor	1M LAH in THF	37.95	7.24	8	0.905
Solvent	THF	72.11	24.72	28	0.883
	<b>Reaction total</b>		34.39		
<b>Work-up</b>					
Quench	1M HCl		14.8	14	1.06
Solvent	H <sub>2</sub> O		40.0	40	1.00
Solvent	Ethyl acetate		81.0	90	0.90
Solvent	DCM		26.6	20	1.33
	<b>Work-up total</b>		162.4		
	<b>Reaction and work-up total</b>		196.8		
<b>Product</b>					
Product	Product (2b)	402.4	1.90		

Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.0019	3	0.0001

## 4.3. LAH reduction of 1 in flow

Role	Chemical	MW	Mass (g)	Volume (mL)	Density (g mL <sup>-1</sup> )
<b>Reaction</b>					
Reactant	Substrate (1)	442.43	1.0		
Reductor	1M LAH in THF	37.95	2.715	3.0	0.905
Solvent	THF		67.99	77	0.883
	<b>Reaction total</b>		71.71		
<b>Work-up</b>					
Quench	1M HCl		21.2	20	1.06
Solvent	Brine		12.0	10	1.20
Solvent	Ethyl acetate		54.0	60	0.90
Solvent	MTBE		7.4	10	0.74
	<b>Work-up total</b>		94.6		
	<b>Reaction and work-up total</b>		166.3		
<b>Product</b>					
Product	Product (2)	400.39	0.753		

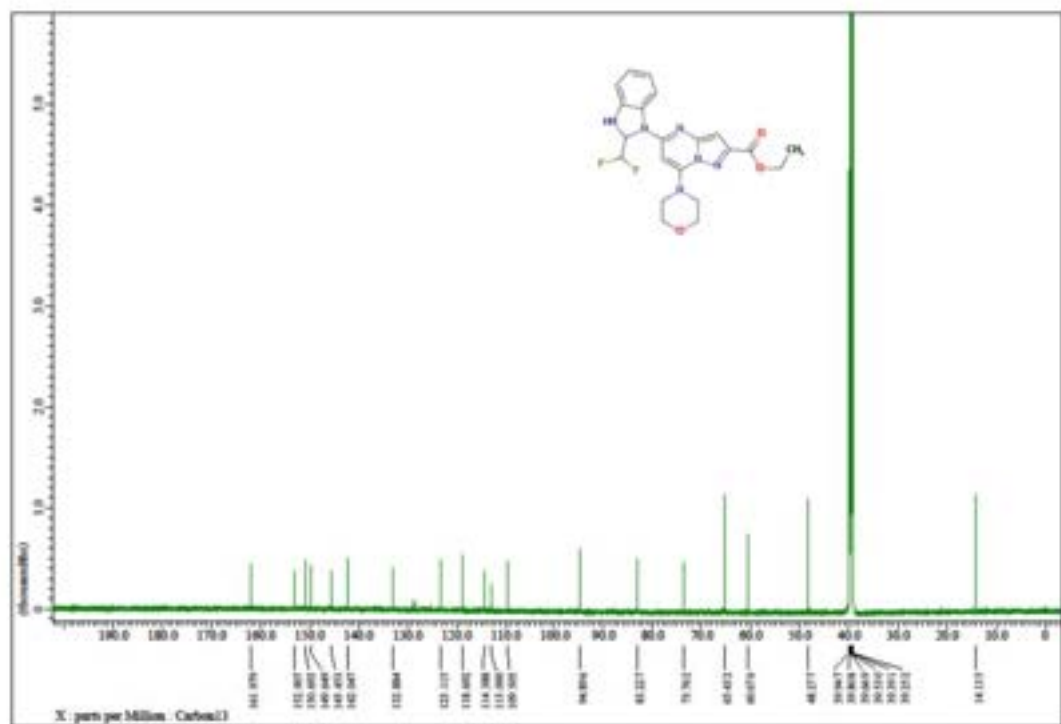
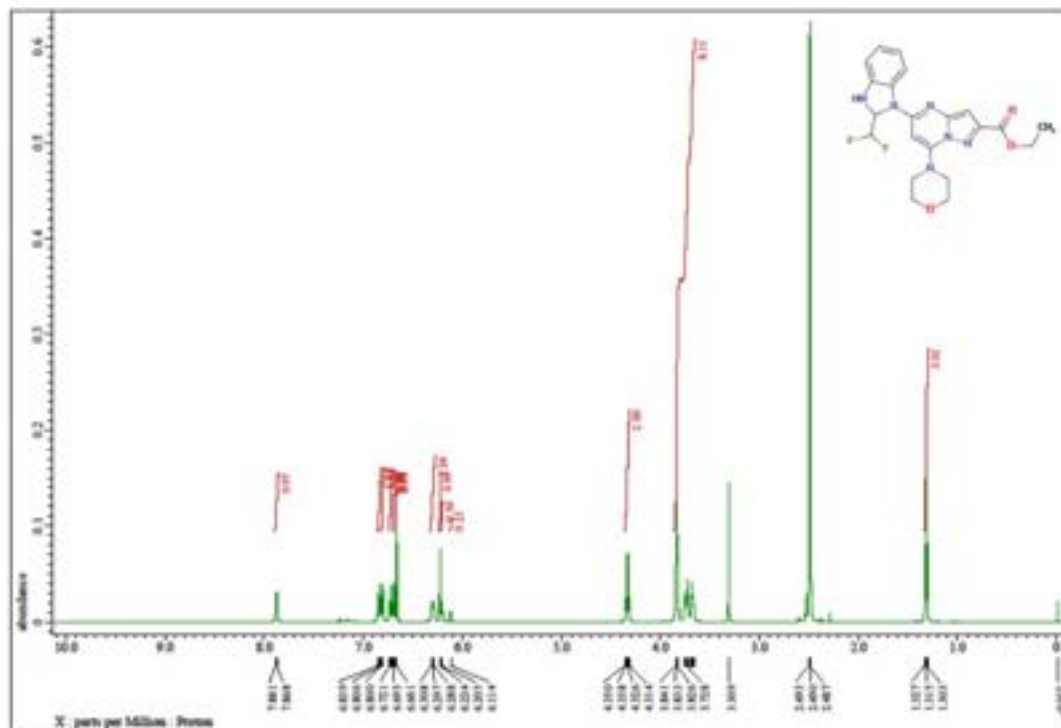
Mass of product (kg)	Time (h)	Reactor volume (m <sup>3</sup> )
0.000753	0.0667	0.00001

## 5. NMR spectrum

ethyl

5-[2-(difluoromethyl)-2,3-dihydro-1H-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-2-carboxylate (1b)

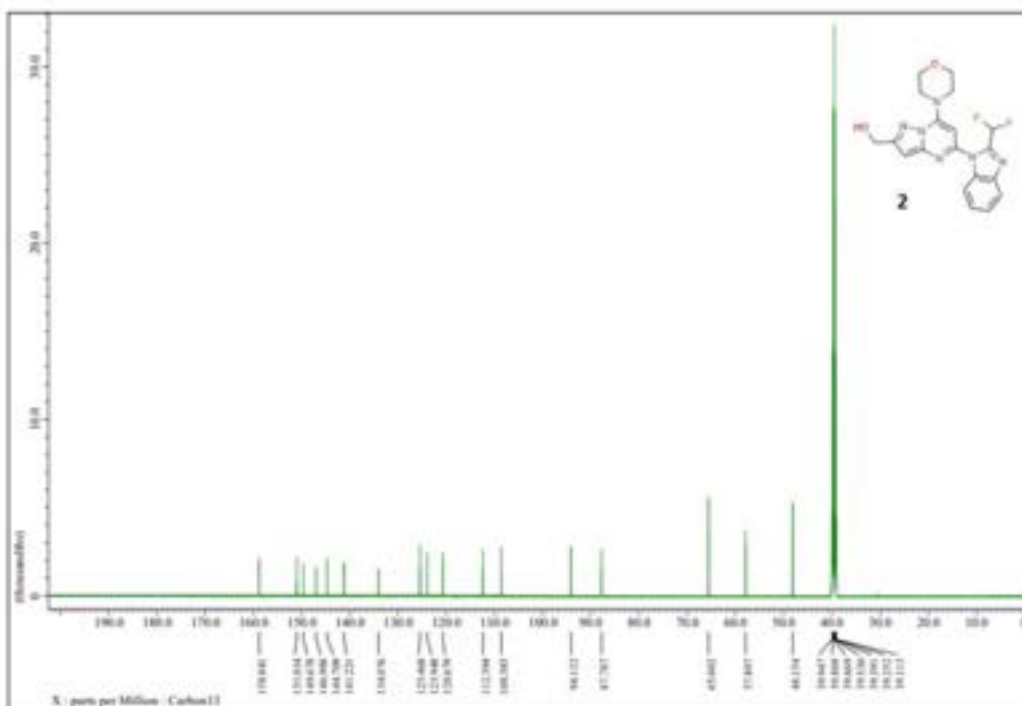
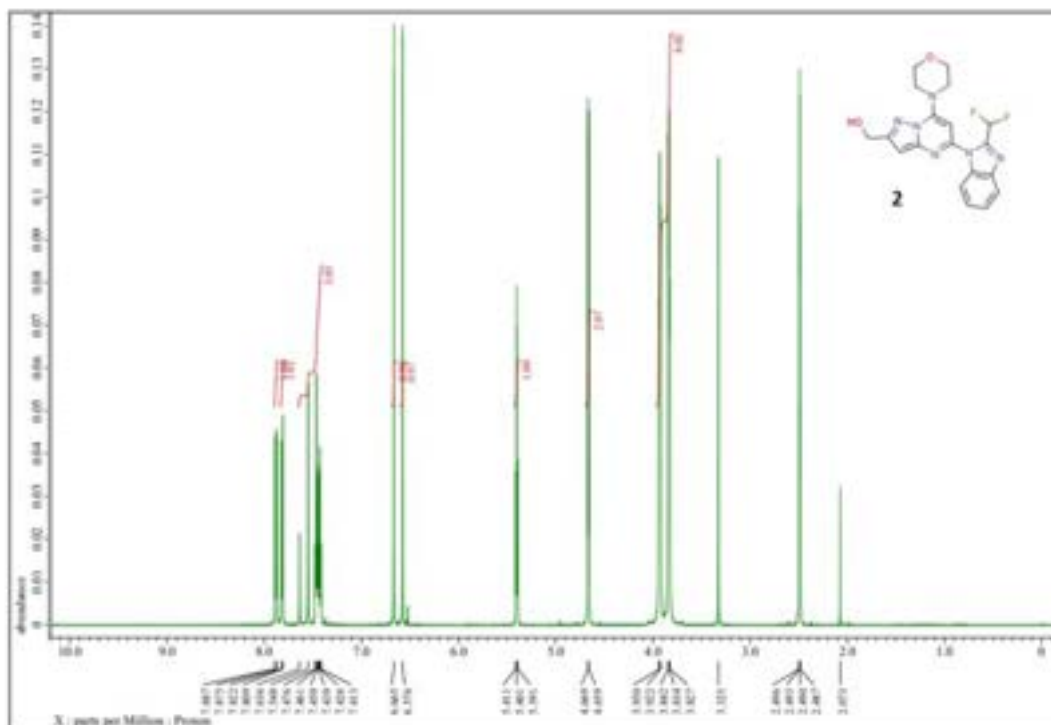
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 7.87 (d, 1H), 6.84 (t, 1H), 6.80 (d, 1H), 6.73-6.71 (t, 1H), 6.69 (d, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.31-6.29 (m, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.30-6.11 (t, 1H), 4.35-4.31 (q, 2H), 3.84-3.66 (m, 8H), 1.33-1.30 (t, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 162.0, 152.9, 150.7, 149.6, 145.5, 142.0, 132.9, 123.1, 118.7, 114.4, 113.0, 109.5, 94.9, 83.2, 73.8, 65.4, 60.7, 48.3, 14.1. HRMS (ESI/MS): *m/z* calculated for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 444.1721 found 444.172.



**[5-[2-(difluoromethyl)-1H-1,3-benzodiazol-1-yl]-7-(morpholin-4-yl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl]methanol (2)**

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: 7.88 (d, 1H), 7.82 (d, 1H), 7.64-7.46 (t, 1H CF<sub>2</sub>H), 7.48-7.41(m,2H), 6.67 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 5.40 (t, 1H), 4.66 (d, 2H), 3.94-3.83 (m, 8H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm: 158.8, 151.0, 149.7, 147.0, 144.7, 141.2, 134.1, 125.5, 123.9, 120.7, 112.4, 108.6, 94.1, 87.8, 65.6, 57.9, 48.2

HRMS (ESI/MS): *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 400.1459 found 400.1456.







## 6. Real photo of the batch and flow equipment



From the left: high-pressure batch reactor (Buchi stainless steel autoclave); Vapourtec easy-Medchem system with cooled tube reactor and gas generator; vapourtec easy-Medchem system with microchip assembly and liquid/liquid separator

## 7. References

- [1] Stypik, M.; Michałek, S.; Orłowska, N.; Zagózda, M.; Dziachan, M.; Banach, M.; Turowski, P.; Gunerka, P.; Zdzalik-Bielecka, D.; Stańczak, A.; Kędzierska, U.; Mulewski, K.; Smuga, D.; Maruszak, W.; Gurba-Bryśkiewicz, L.; Leniak, A.; Pletruś, W.; Ochal, Z.; Mach, M.; Zygmunt, B.; Pieczykolan, J.; Dubiel, K.; Wieczorek, M. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 927.
- [2] D. J. C. Constable, A.D. Curzons, V. L. Cunningham *Green Chem.*, 2002, **4**, 521.
- [3] C. R. McElroy, A. Constantinou, L. C. Jones, L. Summerton and J. H. Clark, *Green Chem.*, 2015, **17**, 3111.
- [4] R. A. Sheldon, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2018, **6**, 32.
- [5] Nystrom, R. F., & Brown, W. G. (1947). Reduction of Organic Compounds by Lithium Aluminum Hydride. I. Aldehydes, Ketones, Esters, Acid Chlorides and Acid Anhydrides. *Journal of the American Chemical Society*, 69(5), 1197–1199. doi:10.1021/ja01197a060

---

**10.5. Publikacja P5**

Michalek S., Powala A., **Gurba-Bryskiewicz L.**, Piorkowska N., Olejkowska P., Yamani A., Ochal Z., Dubiel K., Wieczorek M.;

Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor;

Monatsh Chem, **2023**, 154, 1307–1314, <https://doi.org/10.1007/s00706-023-03121-z>

IF: 1,8; MNiSW: 40



# Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor

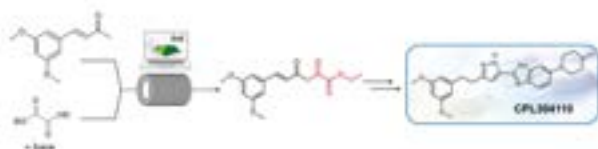
Stanisław Michalek<sup>1,2</sup> · Antoni Powala<sup>2</sup> · Lidia Gurba-Bryśkiewicz<sup>1</sup> · Natalia Piórkowska<sup>1</sup> · Patrycja Olejkowska<sup>1</sup> · Abdellah Yamani<sup>1</sup> · Zbigniew Ochal<sup>2</sup> · Krzysztof Dubiel<sup>1</sup> · Maciej Wieczorek<sup>1</sup>

Received: 7 April 2023 / Accepted: 23 August 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

In our previous study, we described the batch synthesis of CPL304110, an innovative pan-FGFR inhibitor. Herein, we transferred the Claisen condensation reaction, one of the synthesis steps to a continuous flow reactor. A simple solvent switch from ethanol to tetrahydrofuran shortened the original reaction time from 20 h to 10 min. With the use of the design of experiment method and program Statistica<sup>®</sup>, we optimized reaction parameters and increased the reaction yields from 73 to 84% with greatly shortened reaction times (20 h vs. 2 min), improved productivity (74.4 g h<sup>-1</sup>), and increased space-time yield (3720 kg h<sup>-1</sup> m<sup>-3</sup>).

## Graphical abstract



**Keywords** Antitumor agents · CPL304110 · Design of experiment · Enols · FGFR · Nucleophilic substitution

## Introduction

FGFRs (fibroblast growth factor receptors) have become therapeutic targets in cancer treatment over the last decade. FGFR1 to FGFR4 are receptor tyrosine kinases with morphologically congruent cell surfaces. Fibroblast growth factor (FGF) ligands binding interactions with FGFR play an essential role in cell functions such as proliferation, growth, migration, apoptosis, and differentiation [1–6]. Miscellaneous aberrations in the FGF–FGFR axis, such as gene translocations, amplifications, and mutations, are considered to be oncogenic drivers [7–10]. Despite the progress in diagnostics and numerous innovative therapies, the prognoses of

advanced cancer are very poor [11, 12]. Several small molecule FGF/FGFR inhibitors have been approved for clinical use and many are in clinical trials [13, 14]. In our previous study, we reported a new clinical candidate CPL304110 with FGFR1, FGFR2, and FGFR3 inhibition activity IC<sub>50</sub>s of 0.75 nM, 0.50 nM, and 3.05 nM, respectively [15]. Currently, clinical trials are still ongoing to achieve the maximal safety and clinical benefit of CPL304110 (01FGFR2018; NCT04149691) [16]. The synthetic pathway has already been presented, but as the compound reaches the next clinical phases, more and more material will be needed. In this study, we focused on one of the synthesis steps: the Claisen condensation of (3E)-4-(3,5-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-one (**2**) with diethyl oxalate (Scheme 1).

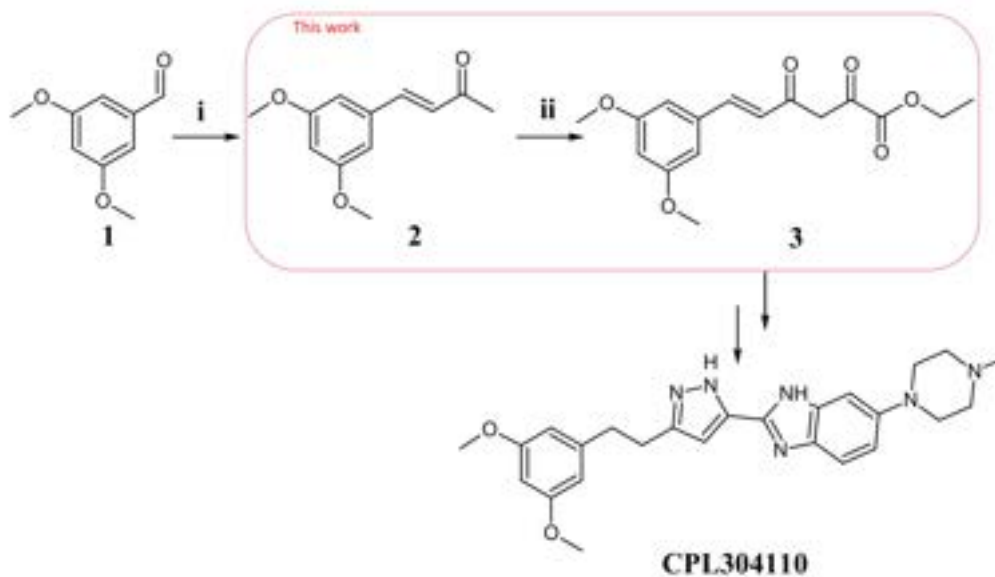
Claisen condensation is a widely known reaction, with numerous examples in the literature either in batch or flow reactors [17–23]. Our goal was to transfer the batch reaction to a continuous flow reactor with the perspective of transferring the whole synthesis to the flow process. This would

✉ Stanisław Michalek  
stanislaw.michalek@celonpharma.com

<sup>1</sup> Celon Pharma S.A., ul. Marymoncka 15,  
05-152 Kazuń Nowy, Poland

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, Warsaw University of Technology,  
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warsaw, Poland

Scheme 1



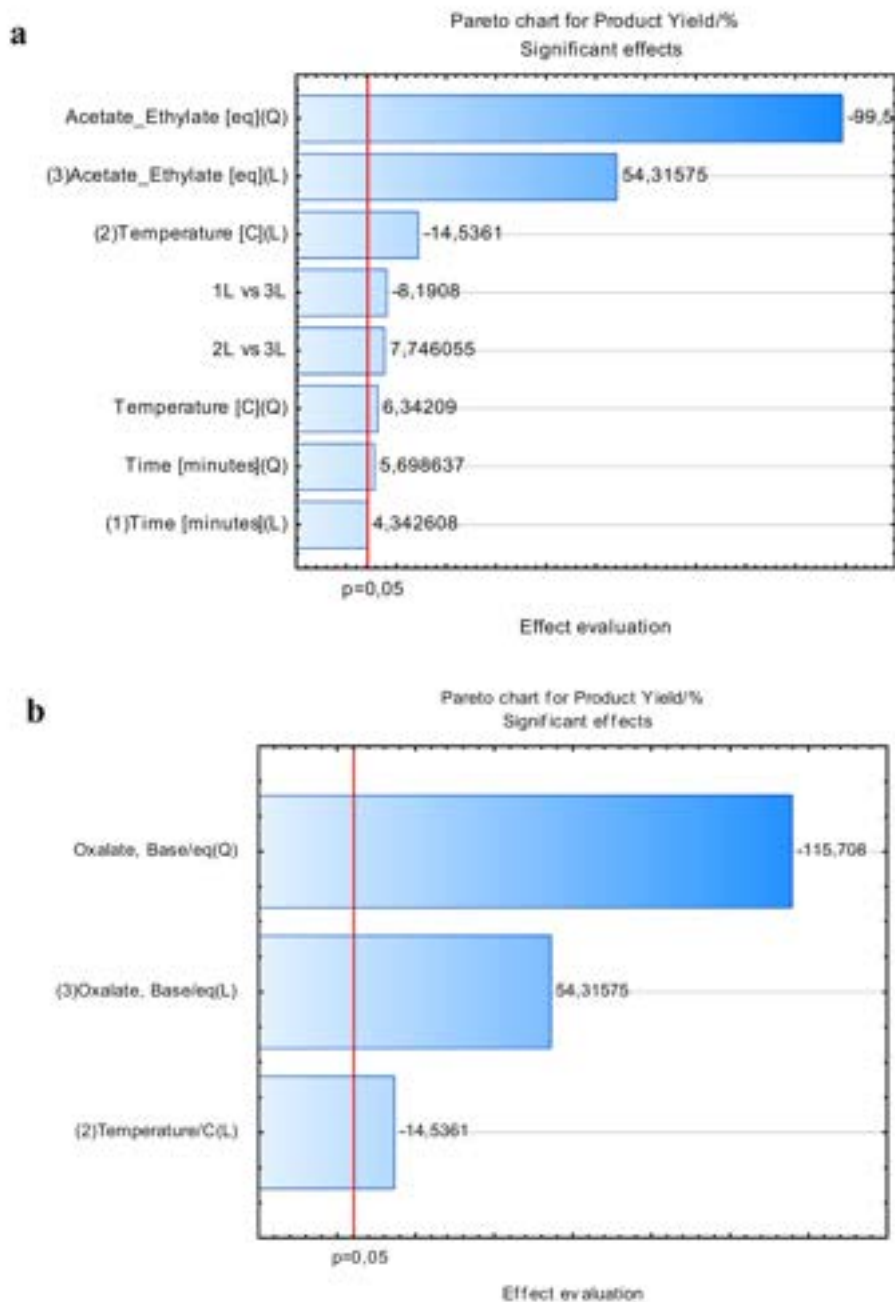
i) acetone, 3.3 M NaOH, RT, 3 h; ii) ethanol, 1.2 eq EtONa, 1.2 eq diethyl oxalate RT, 20 h

**Table 1** DoE response surface methodology plan and results

Entry	Time /min	Temperature/°C	Diethyl oxalate and sodium ethoxide equivalents	Conversion/%	Product yield <sup>a</sup> %
1	2	20	1.0	88.1	83.6
2	2	20	1.4	93.9	90.1
3	2	40	1.0	85.9	81.2
4	2	40	1.4	91.9	88.5
5	8	20	1.0	91.5	86.0
6	8	20	1.4	93.7	88.9
7	8	40	1.0	86.7	82.2
8	8	40	1.4	92.8	88.6
9	2	30	1.2	99.4	96.0
10	8	30	1.2	99.6	96.2
11	5	20	1.2	99.7	96.5
12	5	40	1.2	99.5	95.9
13	5	30	1.0	84.1	79.0
14	5	30	1.4	93.4	88.6
15 (C)	5	30	1.2	99.8	97.0
16 (C)	5	30	1.2	99.7	97.0
17 (C)	5	30	1.2	99.7	97.3

<sup>a</sup>Yield determined by UHPLC

**Fig. 1** **a** Pareto chart for significant effects. **b** Pareto chart for the most significant effects

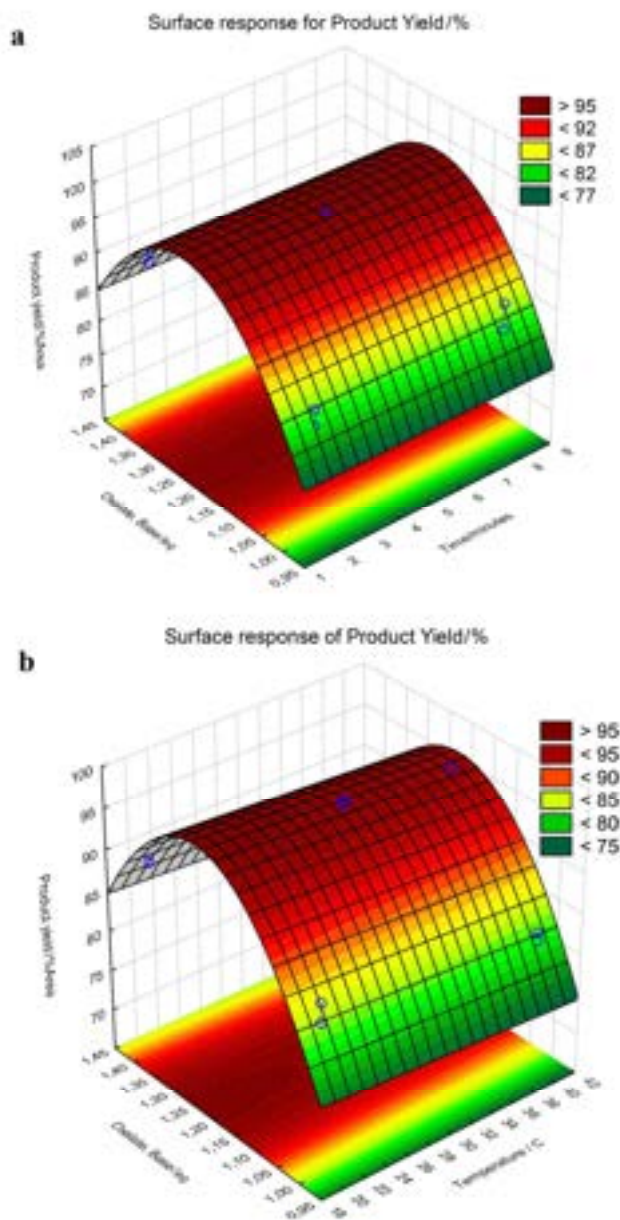


allow us to eliminate the need for isolating byproducts and reduce the amount of waste.

## Results and discussion

In batch synthesis, intermediate **3** was obtained by the reaction of intermediate **2** with ethyl oxalate and sodium ethoxide (EtONa) in ethanol as solvent at room temperature for 20 h. The reaction yield was 73% yield after purification.

Due to the poor solubility of **2** in ethanol ( $1 \text{ g}/40 \text{ cm}^3$ ), we decided to change ethanol to another solvent. Other alcohols were protic, and the solubility of **2** was also poor. Esters and acetonitrile were unsuitable for basic conditions. Hydrocarbons, DCM and chloroform, DMF, and DMSO are seen as problematic or hazardous [24]. Although THF is also viewed as problematic, it was chosen because it is aprotic and has a relatively low boiling point, and the solubility of **2** in it is up to  $1 \text{ g}/2 \text{ cm}^3$ . Unfortunately, sodium ethoxide is insoluble in THF. To tackle this issue, we decided to use ethanol



**Fig. 2** **a** Surface response for product yield/% at reaction temperature = 20 °C. **b** Surface response for product yield/% at reaction time = 2 min

as a co-solvent and 2 M EtONa/EtOH to assure solubility and use as little ethanol as possible. The use of this setup resulted in the formation of **3** in 10 min with an 87% yield after purification.

The Design of Experiment (DoE) study and statistical analysis were performed by using the design of experiment tools of STATISTICA software (v.13.3) [25, 26]. The DoE study was performed using central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). We explored

three variable parameters: reaction temperature, residence time, and the equivalent of diethyl oxalate and sodium ethoxide (Table 1). To reduce the number of experiments, we used the same number of equivalents of diethyl oxalate and sodium ethoxide and regarded them as one parameter.

The CCD model has a good fit ( $R^2 = 0.96$ ). The equivalents of diethyl oxalate and sodium ethoxide have major statistically significant effects (Fig. 1a) on the reaction yields. They have a negative quadratic effect but a positive linear effect. The positive effect may be caused by the increased concentration of oxalate, while the negative effect is probably caused by the increased presence of a protic solvent—ethanol used to keep sodium ethoxide soluble. The temperature has a negative linear effect and a smaller positive quadratic effect. The residence time has a positive effect, both quadratic and linear. However, the combined linear effect of time and the equivalents of oxalate and ethoxide is negative (Fig. 1a). Finally, we considered only the most statistically significant effects to build the model: linear and squared equivalents of diethyl oxalate and sodium ethoxide and a linear term of temperature (Fig. 1b). Noteworthy, a higher amount of ethanol added with ethoxide slows reaction speed which may lower total yield (Fig. 2a, b).

Additionally, the short optimization based on a two-level design has been performed in a full factorial design with three repetitions at the center to verify the influence of diethyl oxalate and EtONa on the product yield separately (Table 2). Temperature and reaction time were constant at 30 °C and 5 min, respectively.

Because of the small data set, the obtained model has not had an ideal fit ( $R^2 = 0.63$ ), but it provides sufficient information about the general dependency between tested variables.

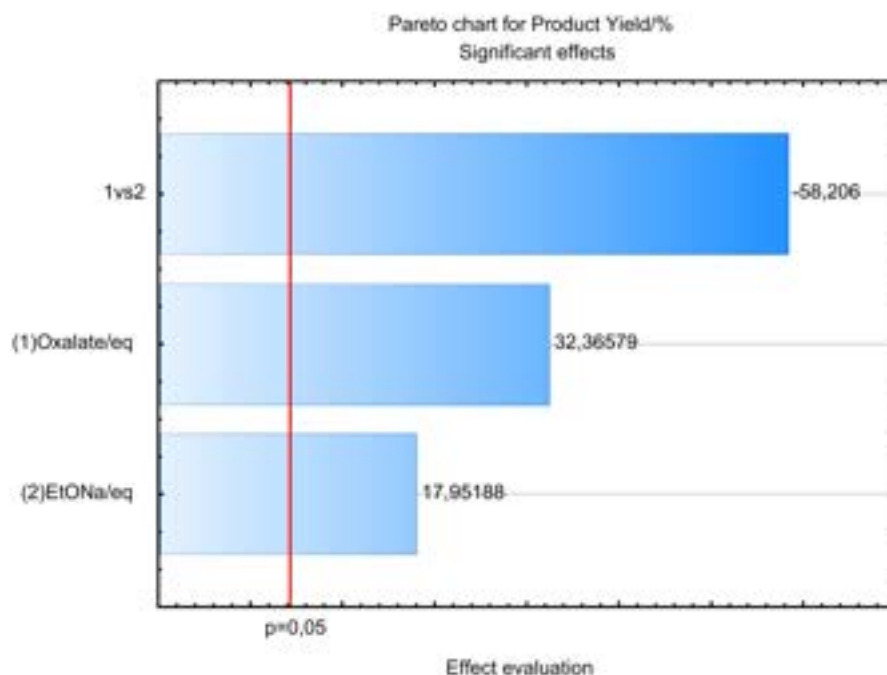
The interaction effect of equivalents of diethyl oxalate and sodium ethoxide has major statistically significant negative effects (Fig. 3) on the reaction yields. Separately, diethyl oxalate equivalent and sodium ethoxide have a positive effect. The optimal, maximum yield is achieved when one or both of the equivalents are above 1.2, but when both equivalents are above 1.3, the yield slightly decreases (Fig. 4).

We calculated optimal reaction parameters using Statistica® software: temperature = 20 °C, diethyl oxalate, and sodium ethoxide equivalents = 1.23. These parameters were used to check how an increased starting concentration of **2** would affect the product yield (Table 3). The starting reagent concentrations had almost no impact on the reaction yield.

The reaction with parameters from Table 2, entry 4, was repeated at a 1 g scale. The reaction yield after purification was almost the same as in the batch (84 vs. 87%, respectively). We speculate that an improved work-up protocol may increase isolated reaction yield and thus should be studied further.

**Table 2** DoE full factorial 2<sup>2</sup> plan and results

Entry	Time/min	Temperature/°C	Diethyl oxalate eq	Sodium ethoxide eq	Conversion/%	Product yield <sup>a</sup> /%
1	5	30	1.0	1.4	98.6	93.5
2	5	30	1.4	1.0	98.9	96.3
3	5	30	1.0	1.0	84.1	79.0
4	5	30	1.4	1.4	93.4	88.6
5 (C)	5	30	1.2	1.2	99.7	97.0
6 (C)	5	30	1.2	1.2	99.7	97.0
7 (C)	5	30	1.2	1.2	99.9	97.3

<sup>a</sup>Yield determined by UHPLC**Fig. 3** Pareto chart for significant effects

## Conclusion

Only with the change of the reaction solvent, we managed to shorten the batch reaction time from 20 h to 10 min and increased yield from 73 to 87%. Successfully, we transferred the reaction from batch to continuous flow reactor without a change in product yield. With the use of DoE, we were able to optimize flow synthesis parameters in a couple of experiments which resulted in reduced reaction time (2 min), almost the same isolated yield (84%), a high space–time yield ( $3720 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ ), and a total product throughput =  $74.4 \text{ g h}^{-1}$ . Our study opens the possibility of

transferring further synthesis steps to continuous flow and combining them into a telescopic process.

## Experimental

Solvents and chemicals were obtained from Sigma-Aldrich and VWR and were used without any further purification unless otherwise noted. The (3*E*)-4-(3,5-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-one (**2**) was synthesized according to the procedure published earlier [15], with a purity of 99%. THF was purchased from VWR and dried by adding 3 Å molecular sieves at least 48 h before the

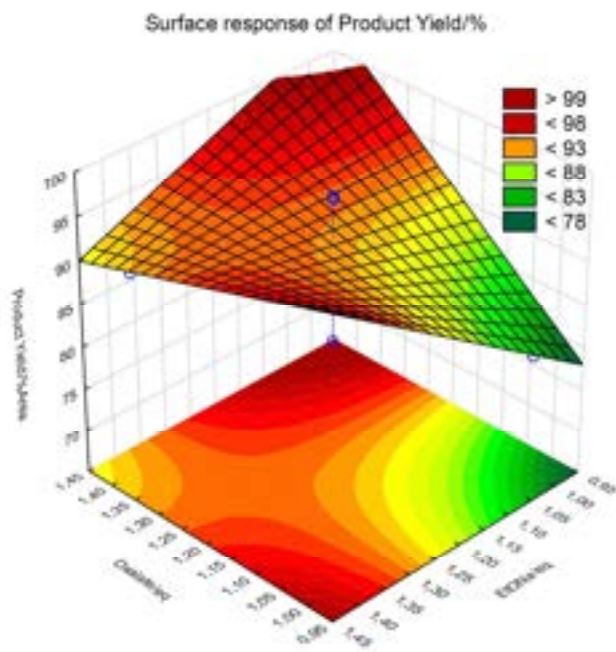


Fig. 4 Surface response for product yield/%

Table 3 Yield of **3** depending on starting substrate concentration

Entry	Substrate dilution/g cm <sup>-3</sup>	Substrate concentration/mol dm <sup>-3</sup>	Yield <sup>a</sup> /%
1	1/40	0.121	96.8
2	1/20	0.242	97.9
3	1/10	0.485	97.8
4	1/5	0.970	96.9

Reaction parameters: reaction time 2 min, temperature 20 °C, diethyl oxalate and sodium ethoxide equivalents = 1.23

<sup>a</sup>Yield determined by UHPLC

reaction. 2 M EtONa/EtOH was prepared by dissolving sodium rod in absolute ethanol and kept under argon for a maximum time of 1 week. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR data were recorded on a JOEL JNMR-ECZS 400 MHz spectrometer with the residual solvent peak as an internal reference (DMSO-*d*<sub>6</sub> = 2.49 ppm). UHPLC analysis was performed on a Thermo Scientific Kinetex<sup>®</sup> C18 column (100 mm; 2.6 μm). Phase: A) H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid; B) ACN + 0.1% formic acid. A 5-point calibration plot was prepared using previously synthesized **2** and **3** in a batch reaction as an internal standard for the calculation of the reaction yields. The MS analysis was acquired with an Agilent QTOF 6545 equipped with electrospray ionization (AJS ESI).

Flow experiments were performed using a Vapourtec R2C + with two tubular reactors (10 cm<sup>3</sup>, id = 1 mm, each). All tubes (id = 1 mm) and mixers were bought from Vapourtec. Pressure in the system was maintained using a back pressure regulator of 8 bar (BPR) (Fig. 5).

### Batch synthesis of ethyl 6-(3,5-dimethoxyphenyl)-2,4-dioxohex-5-enoate (**3**)

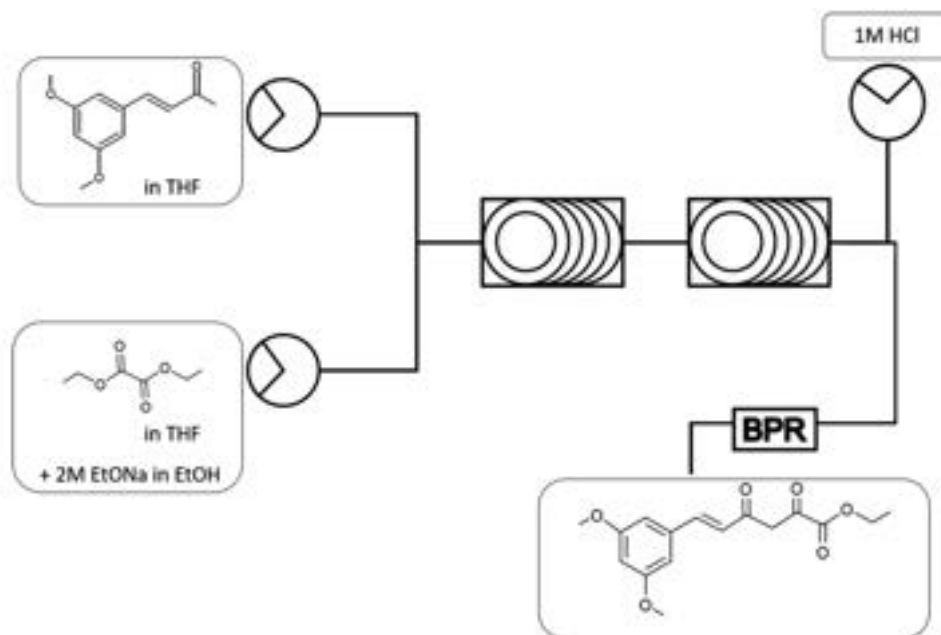
#### Reaction in ethanol

To the solution of 787 mm<sup>3</sup> diethyl oxalate (5.7 mmol, 1.2 eq) in 20 cm<sup>3</sup> dry ethanol under argon, 2.85 cm<sup>3</sup> of 2 M EtONa/EtOH was added (5.7 mmol, 1.2 eq). Therefore, 1.0 g (4.85 mmol) of **2** was dissolved in 20 cm<sup>3</sup> of hot, dry ethanol, cooled to RT, and added to the reaction mixture. The reaction was stirred for 20 h at room temperature and quenched with 1 M HCl. 20 cm<sup>3</sup> of brine was added, and the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 25 cm<sup>3</sup>). Organic phases were combined, washed with brine, and additionally dried with sodium sulfate before being evaporated, resulting in 1.45 g of yellow oil. The crude product was purified by flash chromatography (100% DCM) to give 1.08 g of yellow solid (yield = 73%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 7.69–7.65 (d, 1H), 7.16–7.12 (d, 1H), 6.92 (s, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.30–4.25 (q, 2H), 3.79–3.76 (s, 6H), 1.30–1.27 (t, 3H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 184.4, 174.0, 161.5, 160.7, 142.7, 136.3, 124.1, 106.5, 103.2, 101.0, 62.1, 55.4, 13.9 ppm; HRMS: *m/z*: calculated for [M + H]<sup>+</sup> 307.1176, found 307.1172.

#### Reaction in THF

To the solution of 787 mm<sup>3</sup> diethyl oxalate (5.7 mmol, 1.2 eq) in 20 cm<sup>3</sup> dry THF under argon, 2.85 cm<sup>3</sup> of 2 M EtONa/EtOH (5.7 mmol, 1.2 eq) was added. Therefore, 1.0 g (4.85 mmol, 1 eq) of **2** in 20 cm<sup>3</sup> of dry THF was added. The reaction was stirred for 10 min and quenched with 1 M HCl. 20 cm<sup>3</sup> of brine was added, and the reaction mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 25 cm<sup>3</sup>). Organic phases were combined, washed with brine, and additionally dried with sodium sulfate before being evaporated, resulting in 1.55 g of yellow oil. The crude product was purified by flash chromatography (100% DCM) to give 1.27 g of yellow solid (yield = 87%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 7.70–7.66 (d, 1H), 7.17–7.13 (d, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.31–4.25 (q, 2H), 3.80–3.76 (s, 6H), 1.31–1.27 (t, 3H) ppm.



**Fig. 5** Flow schematic for synthesis of **3**

## Flow synthesis

### General procedure for DoE experiments

Reagent A: 0.5 g of **2** was dissolved in 20 cm<sup>3</sup> dry THF; reagent B: appropriate amounts of diethyl oxalate and 2 M EtONa/EtOH were dissolved in dry THF to gain 20 cm<sup>3</sup> of each solution with the required amounts of equivalents. The solvent bottle was filled with dry THF (for both reagents).

Reagent A and reagent B feeds were mixed in a standard Y-shaped mixer at the same flow speeds, then allowed to react in two 10 cm<sup>3</sup> PFA reactors (id = 1 mm, each) at a set temperature. Just after the last reactor outlet, the reaction mixture was quenched in a Y-shaped mixer with 1 M HCl feed at the same flow speed as each reagent. Samples were collected into vials and analyzed offline by UHPLC.

### Flow synthesis in 1 g scale

Reagent A: 8.4 g of **2** was dissolved in 42 cm<sup>3</sup> of dry THF; reagent B: 6.6 cm<sup>3</sup> of diethyl oxalate (1.23 eq) and 24 cm<sup>3</sup> of 2 M EtONa/EtOH (1.23 eq) were dissolved in 11.4 cm<sup>3</sup> of dry THF. The solvent bottle was filled with dry THF (for both reagents).

For the reaction, 40 cm<sup>3</sup> of each reagent was used. Both reagents were pumped at a 5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> flow rate. Reagent A and reagent B feeds were mixed in a standard Y-shaped mixer at the same flow speeds, then reacted in two 10 cm<sup>3</sup> PFA reactors (id = 1 mm) at the set temperature. Just after the reactor outlet, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl (flow rate: 5 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) in a Y-shaped mixer. The

reaction mixture was collected at a steady state (after 4 min of residence time) for 2 min (which equals 2.0 g, 9.7 mmol of the substrate) into a 100 cm<sup>3</sup> glass bottle and extracted with ethyl acetate (3 × 35 cm<sup>3</sup>). Organic phases were combined, washed with brine, and additionally dried with sodium sulfate before being evaporated, resulting in 1.78 g of dark yellow solid. The crude product was purified by flash chromatography (100% DCM) to give 1.26 g of yellow solid (yield = 84%).

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00706-023-03121-z>.

**Acknowledgements** This research was co-financed by the National Centre for Research and Development "Narodowe Centrum Badań i Rozwoju" and Celon Pharma, SA., project "CELONKO Development of Modern Biomarkers and Development of an Innovative FGFR Kinases Inhibitor", grant number STRATEGMED2/266776/17/NCBR/2015. The authors would like to thank Arkadiusz Leniak and Aleksandra Świdorska (Celon Pharma SA) for their NMR analyses and practical suggestions. S. M. would like to thank Monika Michalek for her help with the graphics.

**Data availability** The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article [and/or] its supplementary materials.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not

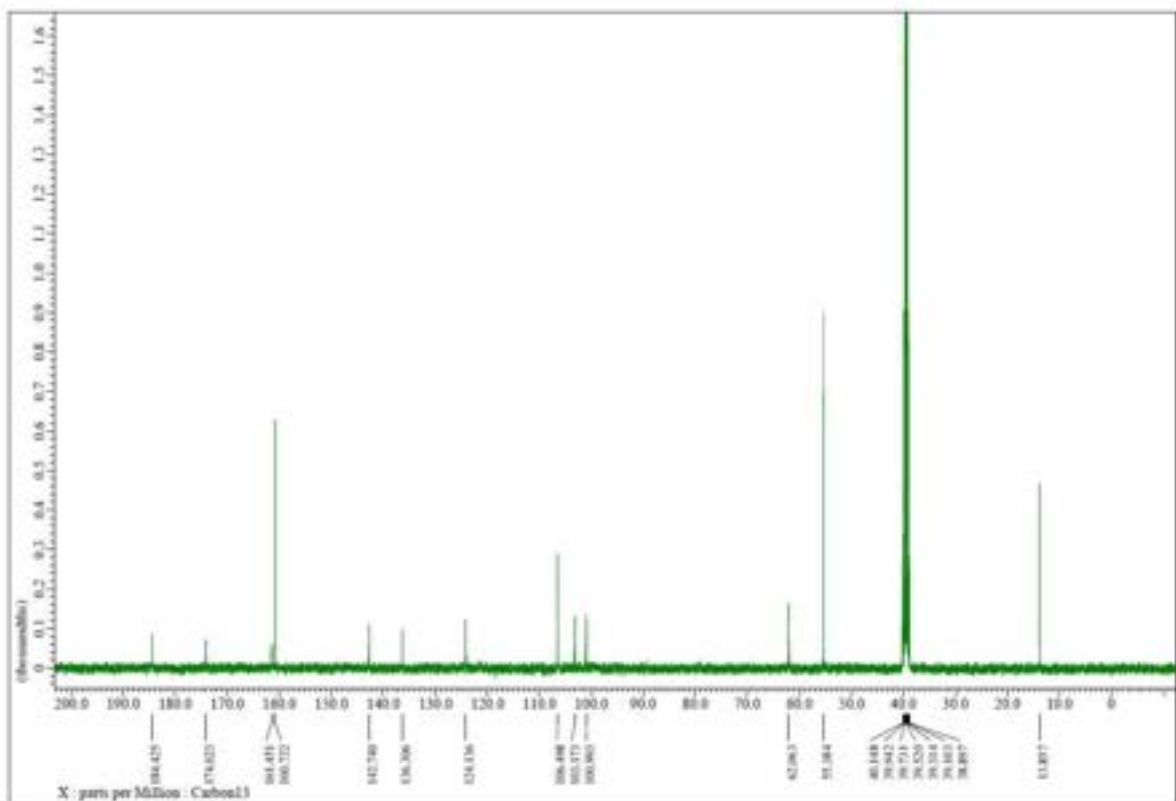
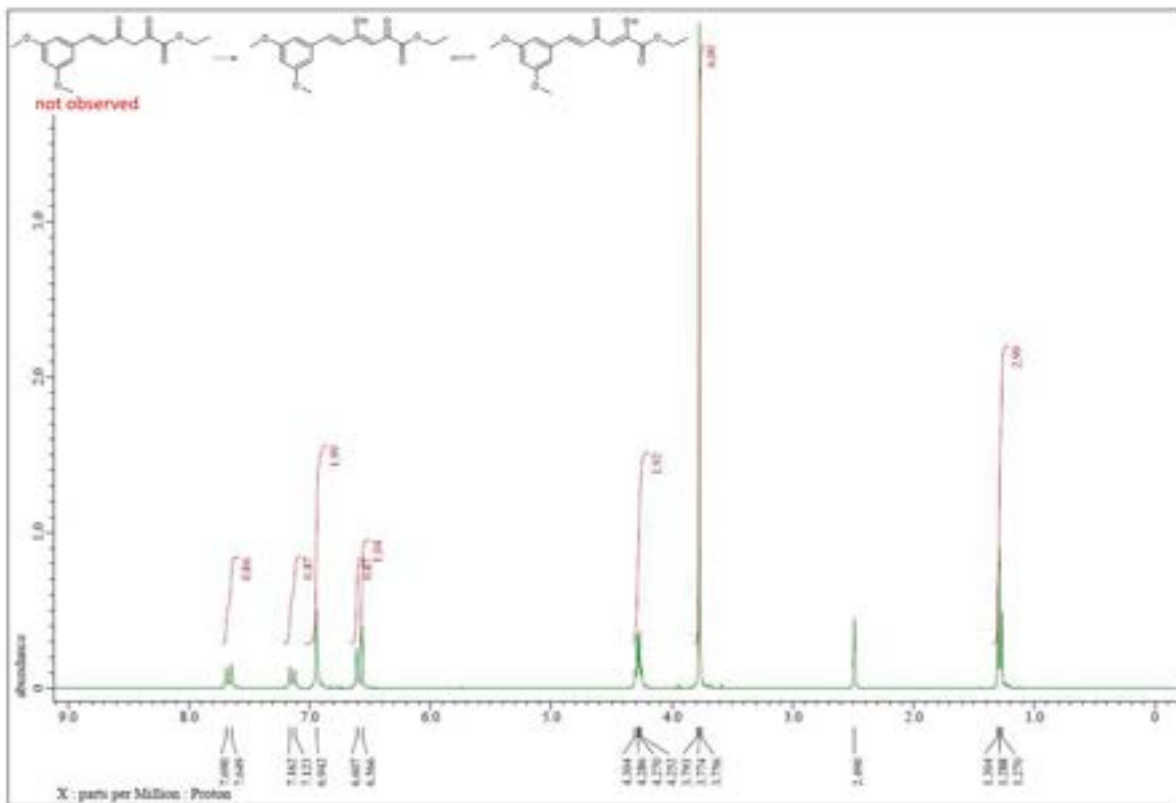
permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

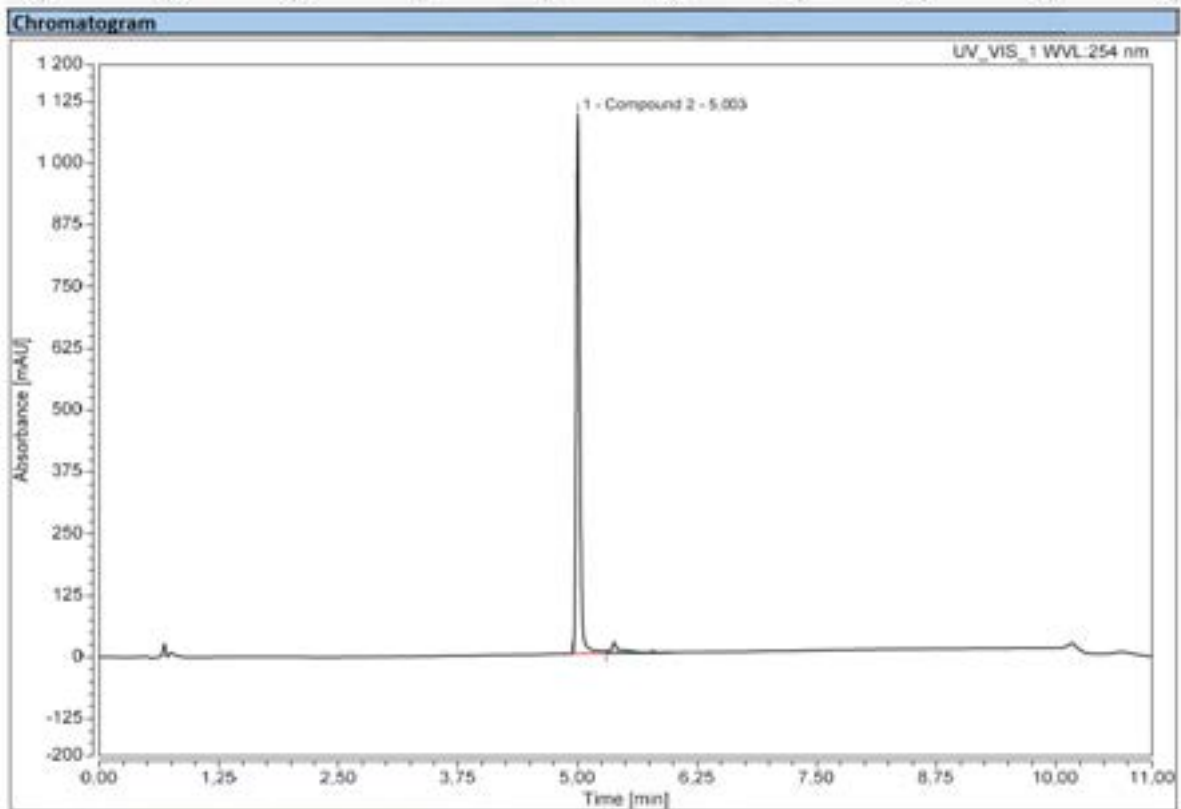
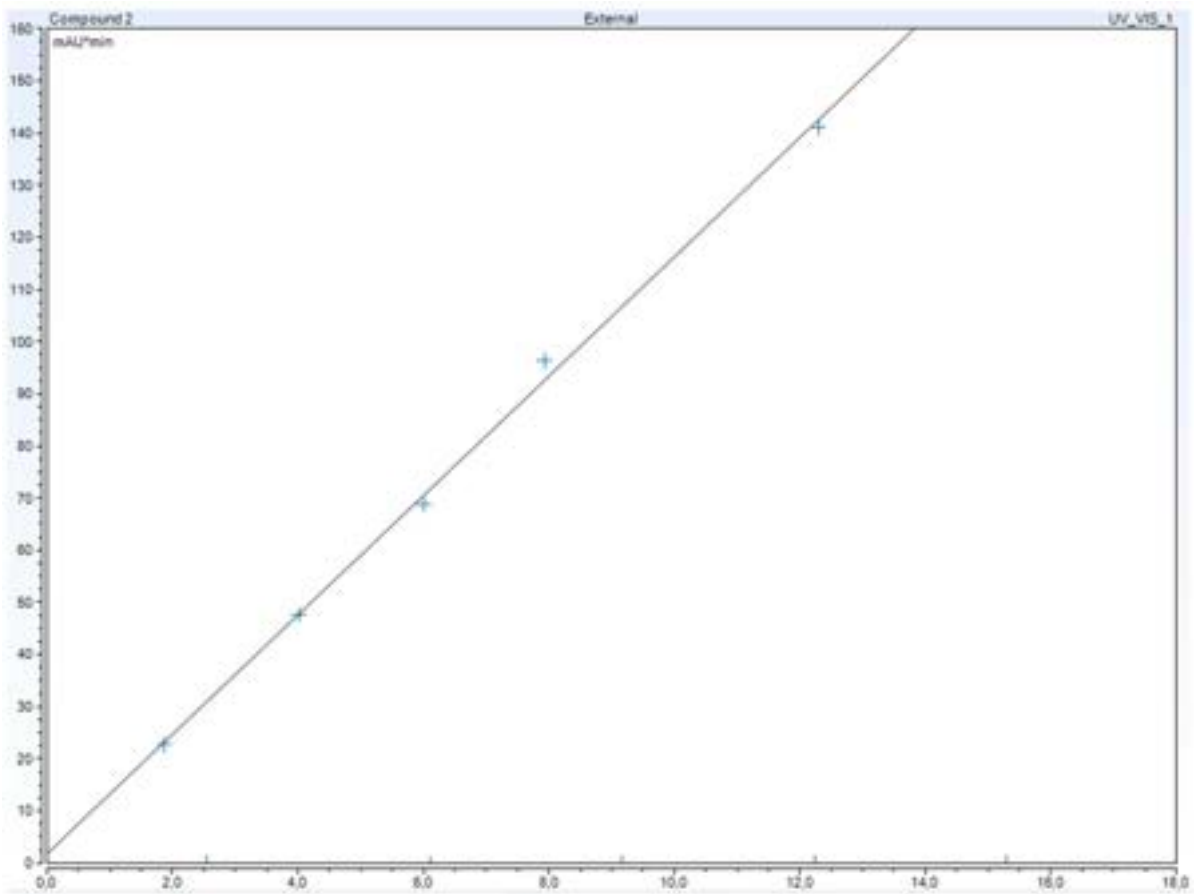
## References

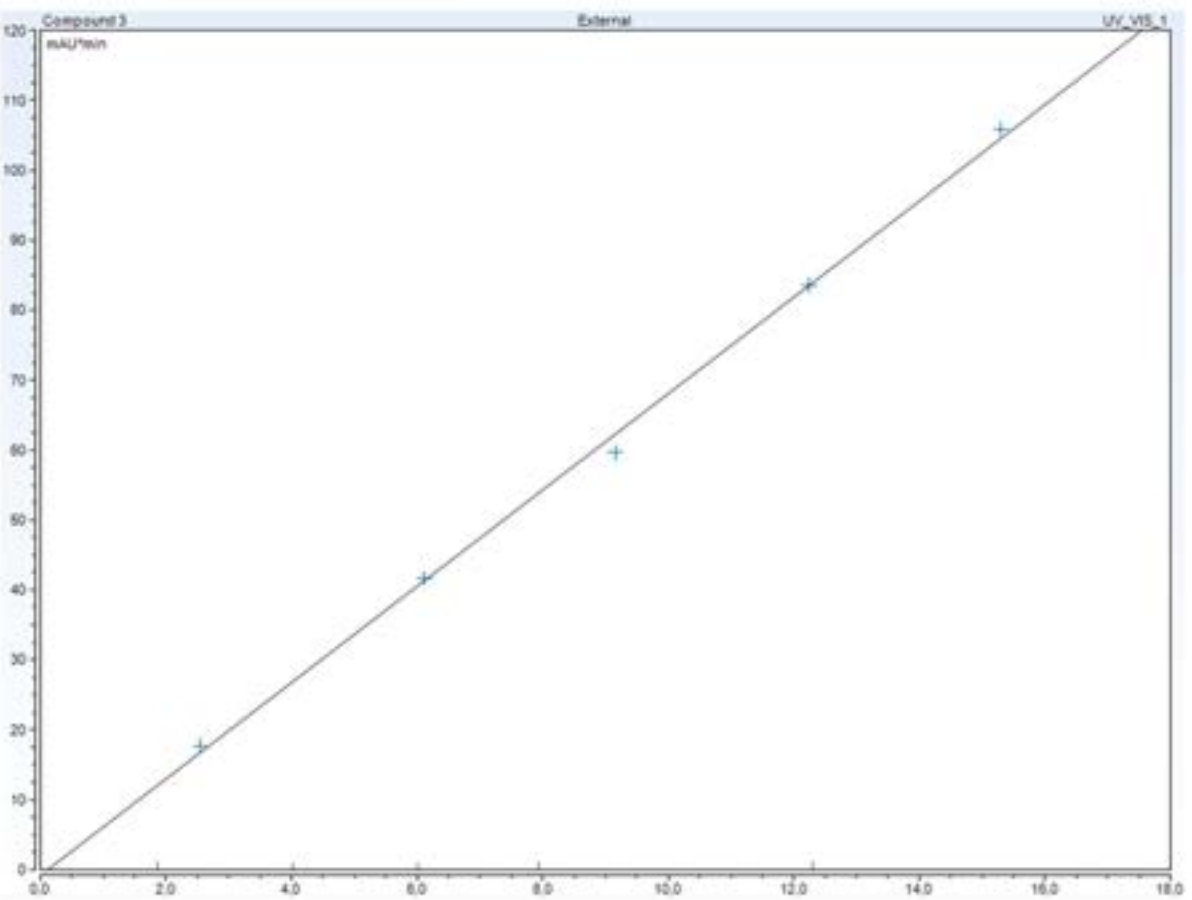
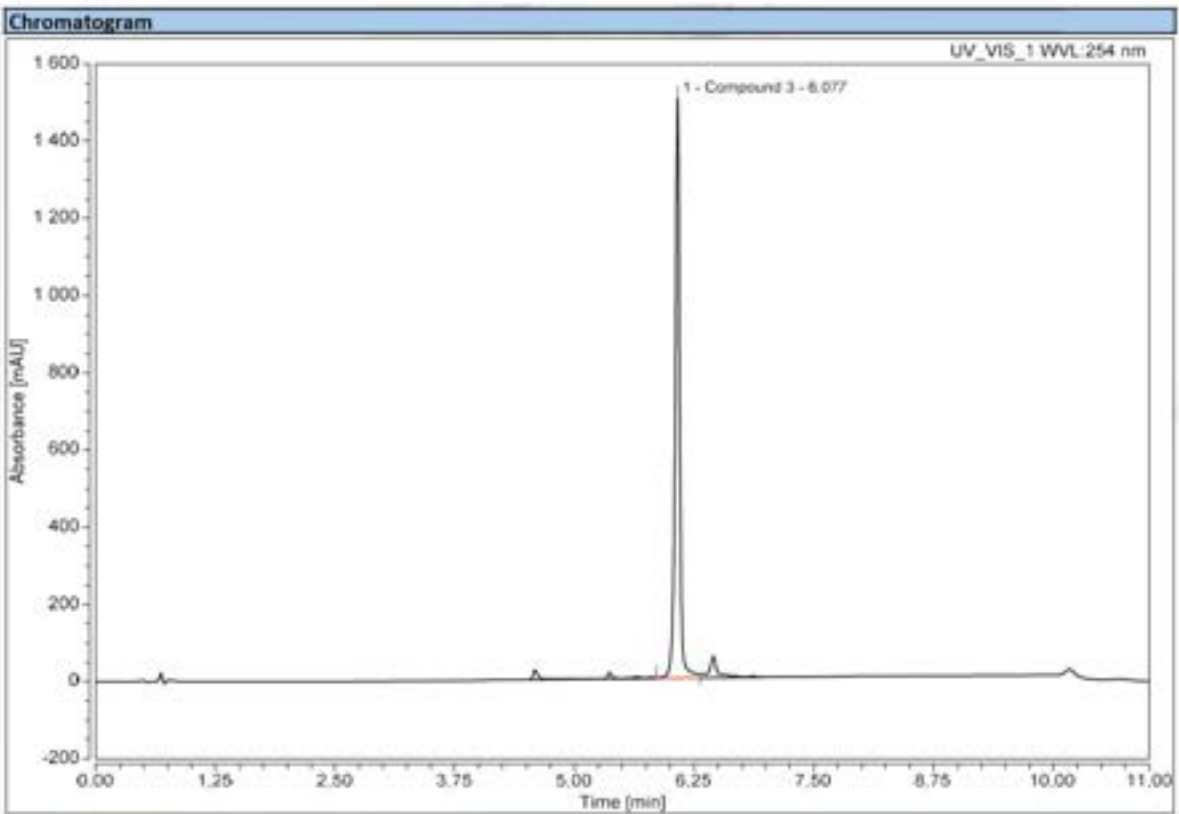
1. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD (2022) *Clin Canc Res* 18:1855
2. Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997) *Cell* 89:693
3. Lieu C, Heymach J, Overman M, Tran H, Kopetz S (2011) *Clin Canc* 17:9230
4. Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, Umemoi H, Mohammadi M, Ornitz DM (2006) *J Biol Chem* 281:15694
5. Turner N, Grose R (2010) *Nat Rev Canc* 10:116
6. Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994) *Cell* 79:1015
7. Knights V, Cook S (2010) *J Pharmacol Ther* 125:105
8. Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC (2013) *Cancer Discov* 3:264
9. Katoh M, Nakagama H (2014) *Med Res Rev* 34:280
10. Grose R, Dickson C (2005) *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179
11. Berns EMJJ, Foekens JA, van Staveren IL, van Putten WLJ, de Koning HYWCM, Portengen H, Klijn JGM (1995) *Gene* 159:11
12. Kim JH, Jeong SY, Jang HJ, Park ST, Kim HS (2021) *Front Oncol* 11:762528
13. Krook MA, Reeser JW, Ernst G, Barker H, Wilberding M, Chen H-Z, Roychowdhury S (2021) *Br J Cancer* 124:880
14. Zheng J, Zhang W, Li L, He Y, Wei Y, Dang Y, Nie S, Guo Z (2022) *Front Chem* 10:860985
15. Yamani A, Zdzalik-Bielecka D, Lipner J, Stańczak A, Piórkowska N, Seweryn-Stańczak P, Olejkowska P, Hucz-Kalitowska J, Magdycz M, Dzwonek K, Dubiel K, Lamparska-Przybysz M, Popiel D, Pieczykołan J, Wieczorek M (2021) *Eur J Med Chem* 210:112990
16. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04149691>. Accessed: 29 Aug 2023
17. Zhi B, Newaz M (1999) Process for Preparing 3-Haloalkyl-1H-Pyrazoles. US Patent 5892053, Apr 06, 1999; (1997) *Chem Abstr* 126:74835
18. O'Shea P, Tillyer RD, Wang X, Clas S-D, Dalton C (2000) Synthesis of 4-[(5-substituted or unsubstituted phenyl)-3-substituted-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamides. US Patent 6150534, Nov 21, 2000; (2000) *Chem Abstr* 133:105034
19. Letendre LJ, McGhee WD, Snoddy C, Klemm G, Gaud HT (2006) Synthesis of diaryl pyrazoles. US Patent 7141678, Nov 28, 2006; (2003) *Chem Abstr* 140:5073
20. Deadman BJ, Browne DL, Baxendale IR, Ley SV (2015) *Chem Eng Technol* 38:1
21. Khademi Z, Heravi MM (2022) *Tetrahedron* 103:132573
22. Scholtz C, Riley DL (2020) *React Chem Eng* 6:138
23. Zhao F, Yang X, Li G, Wang Y, Zhu Z, Ma Y, Cui P (2022) *J Clean Prod* 251:119695
24. Byrne FP, Jin S, Paggiola G, Petchey THM, Clark JH, Farmer T, Hunt AJ, McElroy CR, Sherwood J (2016) *Sustain Chem Process* 4:7
25. TIBCO Software Inc Data Science Textbook, <https://docs.tibco.com/data-science/textbook> Accessed: 4 Apr 2023
26. StatSoft's electronic statistics textbook <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html> Accessed: 4 Apr 2023

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

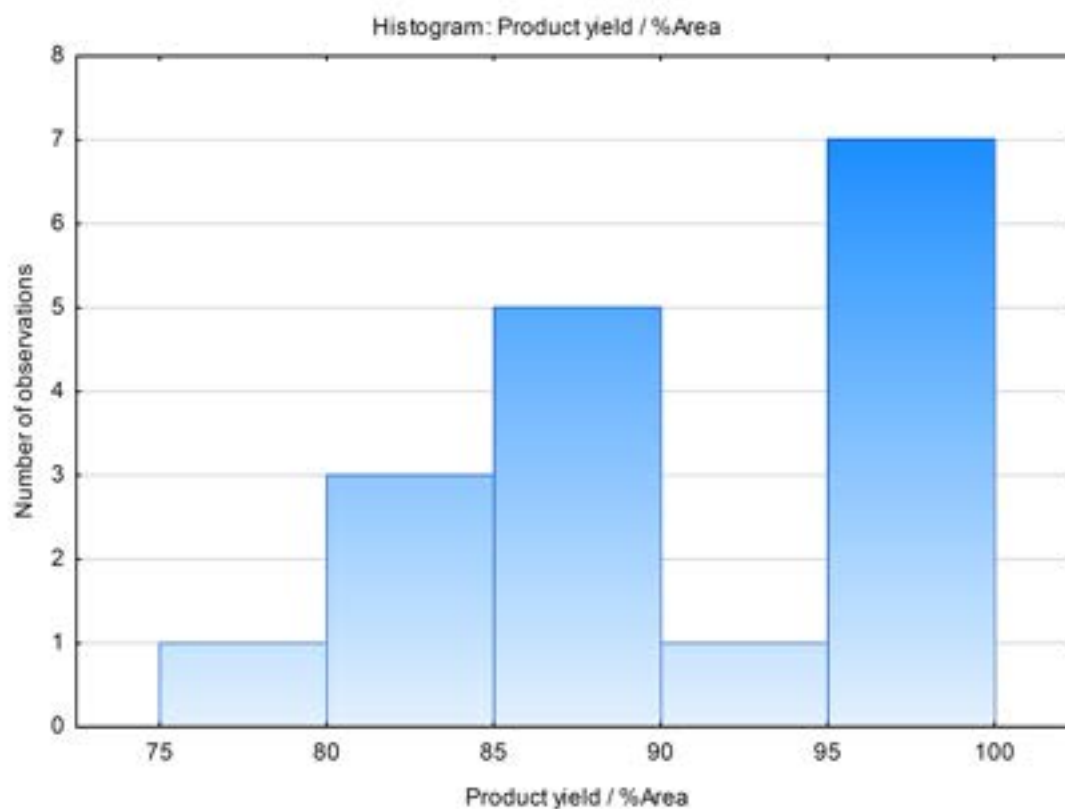


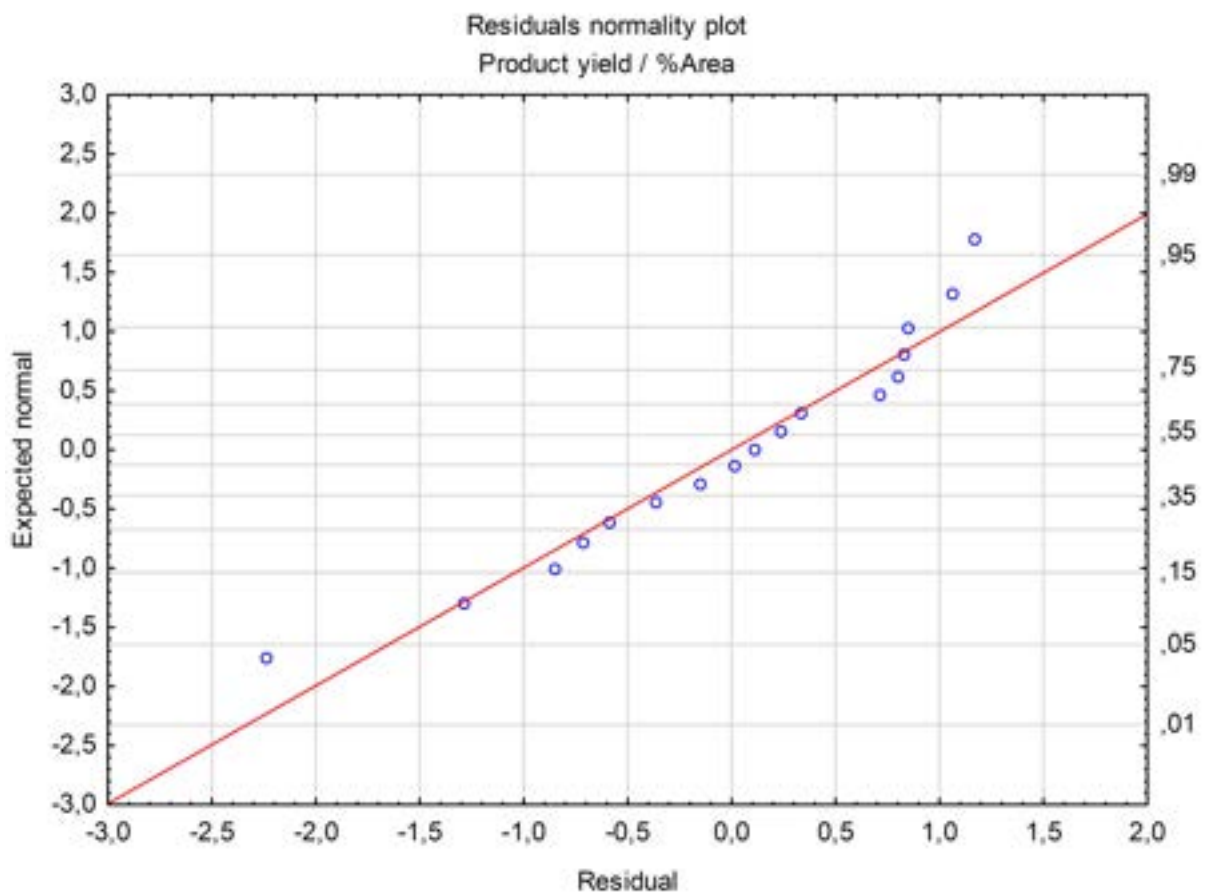
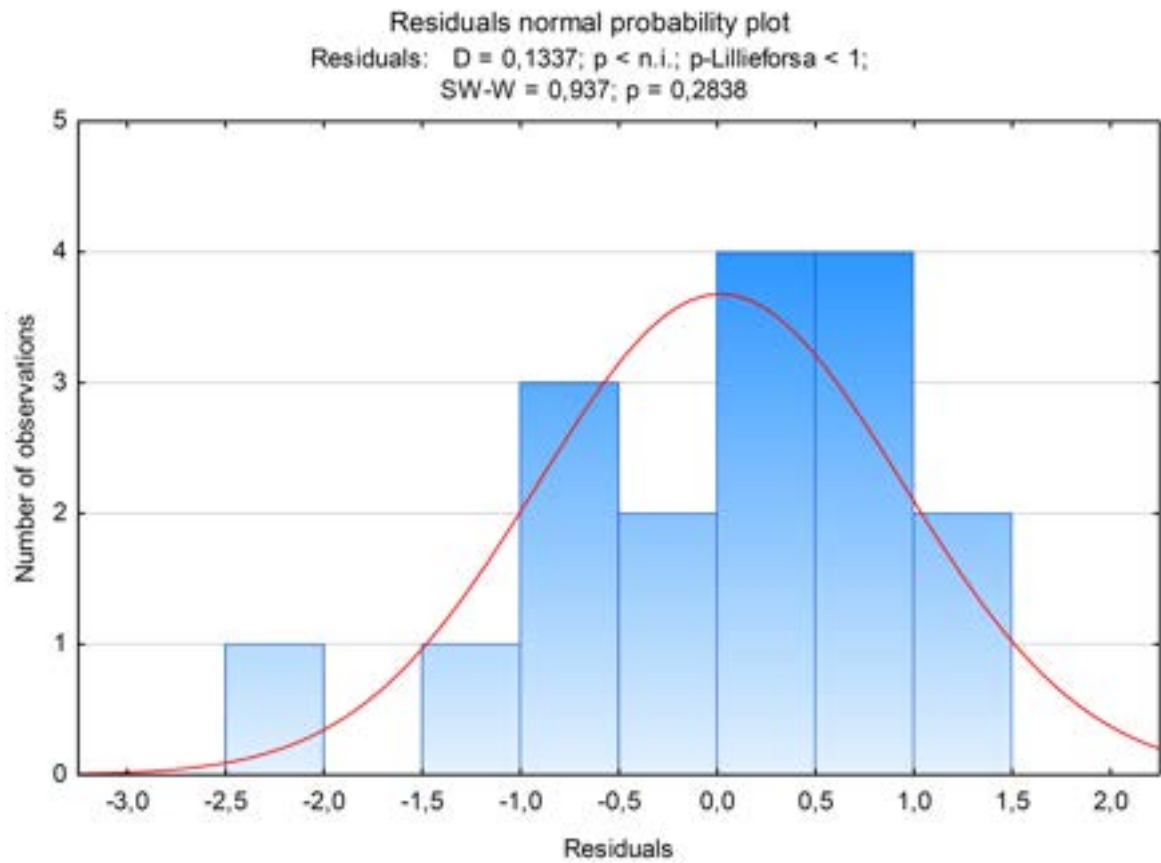
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectrum of ethyl 6-(3,5-dimethoxyphenyl)-2,4-dioxohex-5-enoate (3)



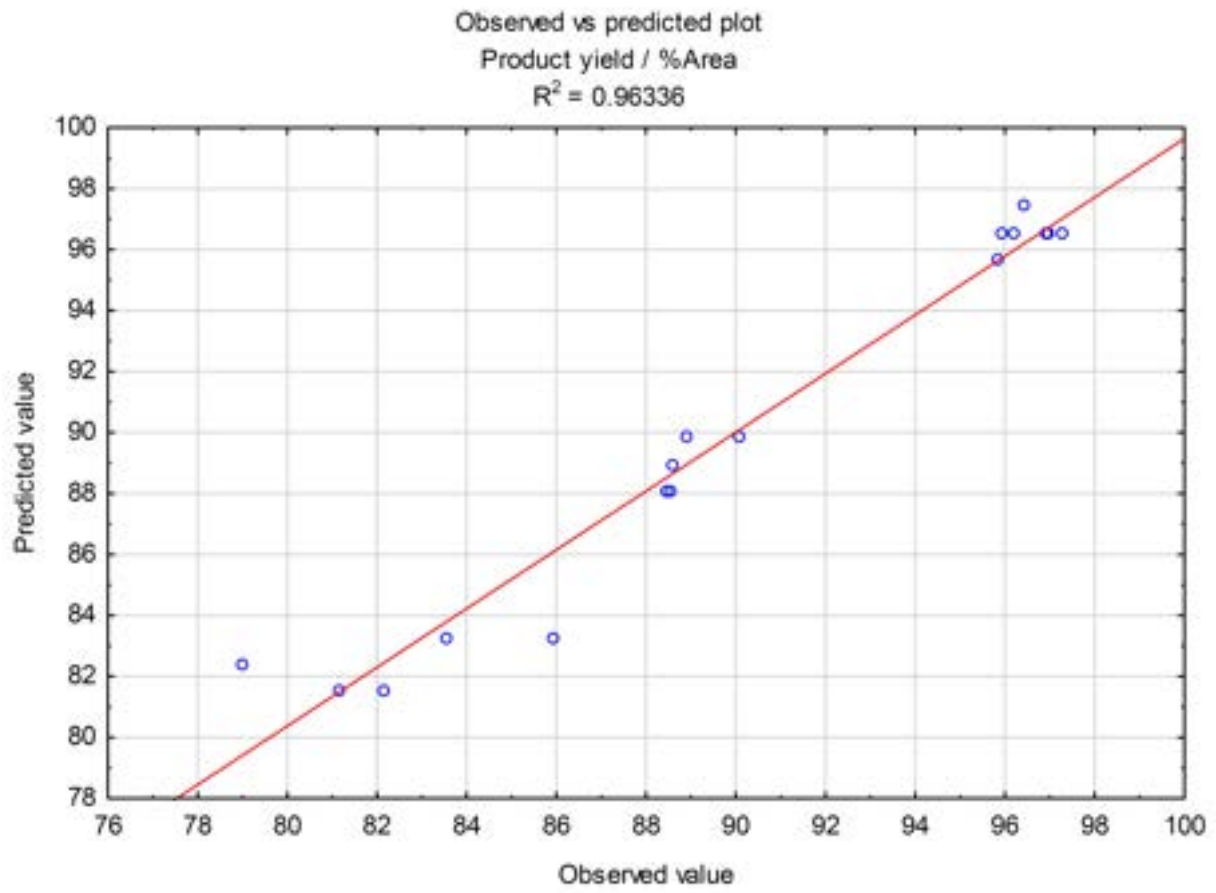


Parameters	Range	
Instrumentation	Ultra-high-performance liquid chromatograph equipped with an UV/DAD detector, autosampler, and column heater	
Column	Phenomenex Kinetex® C18 column (100 mm; 2.6 µm)	
Mobile phases	Phase A: 0.1% formic acid in water Phase B: 0.1% formic acid in ACN	
Diluent	Methanol	
Flow	0.4 mL min <sup>-1</sup>	
Run time	11 min	
Column temperature	25°C	
Autosampler temperature	25°C	
Injection volume	3 µL	
Detection Wavelength	254 nm	
Typical Retention Time	Compound <b>2</b> about 5.00 min, Compound <b>3</b> about 6.08 min	
Rinsing the column	After analysis rinse the column for 10 min using ACN : water (10:90, v/v) solution then during 10 min using ACN; store the column with ACN	
Gradient program		
Time, min	Mobile phase A, %	Mobile phase B, %
0.0	96.0	4.0
0.5	96.0	4.0
6.5	5.0	95.0
8.5	5.0	95.0
9.0	96.0	4.0
11.0	96.0	4.0









## 11. Dodatkowa działalność naukowa

### Pozostałe publikacje wchodzące w skład dorobku naukowego

1. Wójtowicz-Krawiec A.; Sokołowska I.; Smorawińska M.; Chojnacka-Puchta L.; Mikiewicz D.; Łukasiewicz N.; Marciniak-Rusek A.; Wolinowska R.; Bierczyńska-Krzysik A.; Porębska A. J.; Kuthan-Styczeń J.; **Gurba L.**; Borowicz P.; Mazurkiewicz A.; Płucienniczak G. and Płucienniczak A.; Use of Ubp1 protease analog to produce recombinant human growth hormone in Escherichia coli, *Microb Cell Fact*, **2014**, 13, 113, <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0113-4>, (IF 6,496)
2. Zieliński M.; Wójtowicz-Krawiec A.; Mikiewicz D.; Kęsik-Brodacka M.; Cecuda-Adamczewska V.; Marciniak-Rusek A.; Sokołowska I.; Łukasiewicz N.; **Gurba L.**; Odrowąż-Sypniewski M.; Baran P., Płucienniczak G.; Płucienniczak A.; Borowicz P.; Szewczyk B.; Expression of recombinant human bifunctional peptidylglycineamidating monooxygenase in CHO cells and its use for insulin analogue modification, *Protein Expression and Purification* **2016**, 119, 102 – 109, [DOI: 10.1016/j.pep.2015.11.01](https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.11.01), (IF 1,351)
3. Mach M.; Bazydło-Guzenda K.; Buda P.; Matłoka M.; Dzida R.; Stelmach F.; Gałązka K.; Wąsińska-Katwa M.; Smuga D. A.; Hołowińska D.; Dawid U.; **Gurba-Bryśkiewicz L.**; Wiśniewski K.; Dubiel K.; Pieczykolan J.; Wieczorek M.; Discovery and development of CPL207280 as new GPR40/FFA1 agonist, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, 226, [DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113810](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113810), (IF 7,088)
4. Pankiewicz P.; Szybiński M.; Kisielewska K.; Gołębiowski F.; Krzemiński P.; Rutkowska-Włodarczyk I.; Moszczyński-Pętkowski R.; **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Delis M., Mulewski K., Smuga D., Dominowski J., Janusz A., Górka M., Abramski K., Napiórkowska A., Nowotny M., Dubiel K., Kalita K., Wieczorek M., Pieczykolan J. and Matłoka M.: „Do Small Molecules Activate the TrkB Receptor in the Same Manner as BDNF? Limitations of Published TrkB Low Molecular Agonists and Screening for Novel TrkB Orthosteric Agonists”, *Pharmaceuticals* 2021, 14(8):704, [DOI: 10.3390/ph14080704](https://doi.org/10.3390/ph14080704) (IF 5,215)
5. Bukowska-Olech E., Sowińska-Seidler A., Larysz D. F., Gawliński P., Koczyk G., Popiel D., **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Materna-Kiryłuk A., Adamek Z., Szczepankiewicz A., Dominiak P., Glista F., Matuszewska K., Jamsheer A.: “Results from Genetic Studies in Patients Affected with Craniosynostosis: Clinical and Molecular Aspects”, *Front. Mol. Biosci.* 9:8654941, 2022, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.865494> (IF 5,59)

6. Stypik, M.; Zagozda, M.; Michałek, S.; Dymek, B.; Zdżalik-Bielecka, D.; Dziachan, M.; Orłowska, N.; Gunerka, P.; Turowski, P.; Hucz-Kalitowska, J.; Stańczak, A.; Stańczak, P.; Mulewski, K.; Smuga, D.; Stefaniak, F.; **Gurba-Bryśkiewicz, L.**; Leniak, A.; Ochal, Z.; Mach, M.; Dzwonek, K.; Lamparska-Przybysz, M.; Dubiel, K.; Wieczorek, M. Design, Synthesis, and Development of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K $\delta$  Inhibitors: Part I—Indole Derivatives. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 949, <https://doi.org/10.3390/ph15080949> (IF 5,215)
7. Stypik, M.; Michałek, S.; Orłowska, N.; Zagozda, M.; Dziachan, M.; Banach, M.; Turowski, P.; Gunerka, P.; Zdżalik-Bielecka, D.; Stańczak, A.; Kędzierska, U.; Mulewski, K.; Smuga, D.; Maruszak, W.; **Gurba-Bryśkiewicz, L.**; Leniak, A.; Pietruś, W.; Ochal, Z.; Mach, M.; Zygmunt, B.; Pieczykolan, J.; Dubiel, K.; Wieczorek, M.: “Design, Synthesis, and Development of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K $\delta$  Inhibitors: Part II—Benzimidazole Derivatives”. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 927, <https://doi.org/10.3390/ph15080927> (IF 5,215)
8. Pietruś, W.; Stypik, M.; Zagozda, M.; Banach, M.; **Gurba-Bryśkiewicz, L.**; Maruszak, W.; Leniak, A.; Kurczab, R.; Ochal, Z.; Dubiel, K.; et al. Tuning the Biological Activity of PI3K $\delta$  Inhibitor by the Introduction of a Fluorine Atom Using the Computational Workflow. *Molecules* 2023, 28, 3531. <https://doi.org/10.3390/molecules28083531> (IF 4,6)

### Patent

Patent nr 216540. P.380812. Oszczapowicz I., Sikora A., Grzechnik M., Borowicz P., Tobiasz J., Jarecka M., Tejchman B.; **Gurba L.** Kompozycja w postaci żelu, sposób jej otrzymywania i zastosowanie w kosmetyce i/lub dermatologii. 2014. Urząd Patentowy RP

### Udział w konferencjach międzynarodowych

1. Korszla M., Szewczak J., **Gurba L.**, Stadnik D “Quantitative analysis of glycerol in aqueous pharmaceutical preparations by RP-HPLC”, 60th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittcon 08-13 march 2009, Chicago
2. **Gurba L.**, Odrowąż-Sypniewski M., Bierczyńska-Krzysik A., Płucienniczak G., Tejchman-Małecka B., Stadnik D. “Micro-scaled high throughput screening of digestion conditions for insulin analog precursor.” Poster session presented at: 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; 2011 Jun 19-23; Budapest, Hungary
3. Zieliński M., Łukasiewicz N., Marciniak-Rusek A., Sokołowska I., Kęsik-Brodacka M., Cecuda-Adamczewska V., Mikiewicz-Syguła D., Baran P., **Gurba L.**, Płucienniczak

- G., Płucienniczak A. "Recombinant human bifunctional peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) obtained in CHO cells – expression and purification." Poster session presented at: 36th FEBS Congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine; 2011 Jun 25-30; Turyn, Italy
4. Zieliński M., Łukasiewicz N., Marciniak-Rusek A., Sokołowska I., **Gurba L.**, Kurzynoga D., Odrowąż-Sypniewski M., Baran P., Płucienniczak G., Płucienniczak A. "Research over recombinant human bifunctional peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) activity obtained in CHO cells." Poster session presented at: 7th Conference on Recombinant Protein Production, 2013 Mar 06-08; Laupheim, Germany
  5. **Gurba L.**, Odrowąż-Sypniewski M., Łukawska M., Oszczapowicz I. "A Highly efficient peptide mapping of the C-terminus modified proteins." Poster session presented at: 30th International Symposium on Chromatography, 2014 Sep 13-19; Salzburg, Austria
  6. **Gurba L.**, Duda J., Łukawska M., Oszczapowicz I. "UPLC versus HPLC monitoring of protein modifications." Poster session presented at: 30th International Symposium on Chromatography, 2014 Sep 13-19; Salzburg, Austria
  7. **Gurba L.**, Łukawska M., Stadnik D., Odrowąż-Sypniewski M., Szewczak J., Tejchman-Małecka B., Oszczapowicz I. "RP-HPLC analysis of B-chain arginine modified new human insulin analogues." Poster session presented at: 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, PBA 2013; 2013 Jun 29-Jul 04; Bologna; Italy
  8. Łukawska M., **Gurba L.**, Stadnik D., Odrowąż-Sypniewski M., Rusek-Atkinson D., Borowicz P., Oszczapowicz I. "B-chain modification of new human insulin analogues using arginine amide." Poster session presented at: 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, PBA 2013; 2013 Jun 29-Jul 04; Bologna; Italy
  9. **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Dawid U., Smuga D. A., Maruszak W., Delis M., Moroz A., Błocka A., Stypik B., Szymczak K., Mroczkiewicz M., Dubiel K., Wieczorek M., "Implementation of QbD approach to the development of chromatographic method for the determination of complete impurity profile of the CPL409116 innovative substance, dual JAK/ROCK inhibitor", Poster session presented at: ACCORD INTERDISCIPLINARY CONFERENCE ON DRUG SCIENCES "Synergy of interdisciplinary innovations", 05.2022; Warsaw; Poland

10. **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Maruszak W. „Application of DOE approach as a key step to improving of the aldehyde impurity peak shape of the innovative pharmaceutical substance of the PI3K $\delta$  inhibitor by derivatization with hydrazine”, Poster session presented at: ORBIS Summer School 2022, Prague, Czech Republic
11. **Gurba-Bryśkiewicz L.**, Smuga D. A., Tuz D., Pyśniak A., Juszczak E., Mikońska M., Maruszak W., Dubiel K., Wieczorek M. “Application of DoE statistical methods in the QbD approach in the development of innovative active substances and medicinal products”, Poster session presented at: ORBIS Summer School 2023, Poznań, Polska

#### Udział w konferencjach krajowych

1. **Gurba L.**: „Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) w analizie jakościowej i ilościowej ludzkiego rekombinowanego hormonu wzrostu (rhGH).” Poster prezentowany na: VII Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Toruń 2005 - prezentacja ustna
2. **Gurba L.** i in.: „Zastosowanie chromatografii cieczowej i spektrometrii mas do badania produktów kontrolowanej hydrolizy enzymatycznej analogów insuliny ludzkiej”, Poster prezentowany na: III Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii, 23-24 października, Warszawa 2008
3. Korszla M., Szewczak J., **Gurba L.**, Stadnik D., „Oznaczanie glicerolu w preparatach farmaceutycznych z wykorzystaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych, Poster prezentowany na: III Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii, 23-24 października, Warszawa 2008
4. Bierczyńska-Krzysik A., Stadnik D., **Gurba L.**, Baran P., Wójcik L., Płucienniczak G., Tejchman-Małecka B., Borowicz P., „Identyfikacja trisiarczkowej pochodnej jednołańcuchowej LysArg-Insuliny”, Poster prezentowany na: III Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii, 23-24 października, Warszawa 2008
5. **Gurba L.**, Stadnik D., Korszla M., Tejchman-Małecka B., „Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania śladowych ilości chlorowodoru tetracykliny jako pozostałości po procesie produkcyjnym rekombinowanej insuliny ludzkiej”, Poster prezentowany na: IV Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii, 15-16 października, Warszawa 2009 - wyróżnienie za najlepszy plakat uznany przez uczestników konferencji
6. Surmacz-Chwedoruk W., **Gurba L.**, Tejchman-Małecka B., Błazej S., Stadnik D. Badanie procesu rozwijania białek za pomocą SEC oraz DLS na przykładzie insuliny ludzkiej i jej analogów. Poster prezentowany na: VIII Polska Konferencja Chemii

- analitycznej „Analityka dla społeczeństwa XXI wieku”; 2010 Lipiec 05-09; Kraków, Polska
7. Stadnik D., **Gurba L.**, Tejchman-Małecka B. Zastosowanie bioanalizatora mikroprzepływowego do analizy białek terapeutycznych. Komunikat ustny wygłoszony na: VIII Polska Konferencja Chemii analitycznej „Analityka dla społeczeństwa XXI wieku”; 2010 Lipiec 05-09; Kraków, Polska
  8. M. Korszla, J. Stadnik, J. Szewczak, W. Surmacz-Chwedoruk, S. Błażej-Sosnowska, **Gurba L.**, B. Tejchman-Małecka, D. Stadnik: “Determination of identity, structure and purity of recombinant insulin analogs, IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011”, Kraków, 12-15.10.2011
  9. **Gurba L.**, W. Surmacz-Chwedoruk, B. Tejchman-Małecka, D. Stadnik: “Phase Additives on the Retention and Separation of Insulin and its Analogues by Size Exclusion Chromatography”, 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, 9-13.09.2012

#### Granty i projekty badawcze

Lp.	Grant / Projekt badawczy	Rola w projekcie
1	Projekt Celowy nr 6 T09 046 2001 C/5592 Opracowanie technologii izolacji, transformacji i oczyszczania interferonu $\alpha 2a$ , interferonu $\alpha 2b$ , hormonu wzrostu, karboksypeptydazy B, interferonu- $\gamma$ i proteazy UBP	Opracowanie metod analitycznych badania surowców, substancji i produktów leczniczych Opracowanie dokumentacji w formie CTD
2	WND-POIG. 01.01.02-00-007/08-00 Centre of medicinal product biotechnology. Package of innovative biopharmaceuticals for human and animal therapy and prophylactics	Opracowanie metod analitycznych badania surowców, substancji i produktów leczniczych Opracowanie dokumentacji w formie CTD
3	„Inkubator Innowacyjności+” w ramach konkursu Centrum Transferu Technologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, IBAkteria Sp. z o.o., Synergia WUM Sp. z o. o. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania pozostałości jednołańcuchowego prekursora w rekombinowanej insuliny ludzkiej i/lub analogach insuliny ludzkiej”)	Kierownik projektu Zastosowanie narzędzi DoE i metod analizy statystycznej na różnych etapach realizacji projektu
4	Projekt nr POIR.01.01.01-00-0382/16 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma S.A. Selektywny inhibitor kinaz JAK w terapii chorób o podłożu immunologicznym (Selective JAK kinase inhibitor in therapy of immune-related diseases)	Opracowanie metod analitycznych i wykonywanie badań charakteryzujących właściwości fizykochemiczne substancji na różnych etapach realizacji projektu Zastosowanie narzędzi DoE i metod analizy statystycznej na różnych etapach realizacji

		projektu
5	Projekt nr 2021/ABM/05/00005 Agencja Badań Medycznych oraz Celon Pharma S.A. Development of Innovative Therapeutic Solutions using RNA technology (TransformRNA—mRNA Therapeutics generation platform)	Opracowanie metod analitycznych i wykonywanie badań charakteryzujących właściwości fizykochemiczne substancji na różnych etapach realizacji projektu Zastosowanie narzędzi DoE i metod analizy statystycznej na różnych etapach realizacji projektu
6	Project nr POIR.01.02.00-00-0085/18 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A. Rozwój przedkliniczny i kliniczny innowacyjnego inhibitora kinazy PI3 delta jako kandydata w terapii chorób o podłożu zapalnym (KICHAI – Pre-clinical and clinical development of an innovative PI3 delta kinase inhibitor of as a candidate for the treatment of inflammatory disorders)	Specjalista ds. chromatografii i spektrometrii Zastosowanie narzędzi DoE i metod analizy statystycznej na różnych etapach realizacji projektu
7	Project nr STRATEGMED2/266776/17/NCBR/2015 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A. CELONKO – Opracowanie nowoczesnych biomarkerów oraz rozwój innowacyjnego inhibitora kinaz FGFR stosowanego w terapii nowotworów (CELONKO – Development of novel biomarkes and innovative FGFR kinases inhibitor as an anti-cancer therapy)	Opracowanie metod analitycznych i wykonywanie badań charakteryzujących właściwości fizykochemiczne substancji na różnych etapach realizacji projektu Zastosowanie narzędzi DoE i metod analizy statystycznej na różnych etapach realizacji projektu
8	Project nr POIR.01.01.01-00-0887/19 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A. Serotonergiczna terapia przeciwbólowa oparta o agonistę receptora 5-HT7 (STEP7)	Opracowanie metod analitycznych i wykonywanie badań charakteryzujących właściwości fizykochemiczne substancji na różnych etapach realizacji projektu
9	Project nr POIR.01.01.01-00-0334/17 Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Celon Pharma. S.A. Rozwój przedkliniczny i kliniczny innowacyjnego agonisty receptora GPR40 w terapii cukrzycy typu II GATE	Opracowanie metod analitycznych i wykonywanie badań charakteryzujących właściwości fizykochemiczne substancji na różnych etapach realizacji projektu.

## Działalność dydaktyczna

### Wykłady

1. Wykład dla studentów 5 roku Bloku Farmacja Przemysłowa i Biotechnologia Farmaceutyczna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, „Zastosowanie statystycznych metod planowania eksperymentów (DoE, Design of Experiments)

---

w podejściu QdB (Quality by Design) do rozwoju technologii innowacyjnych substancji czynnych i produktów leczniczych”, 11.12.2023.

2. Prezentacja dla studentów z Koła Naukowego w Zakładzie Chemii Organicznej i Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 03.04.2024.

#### **Opieka merytoryczna nad studentami w trakcie praktyk**

1. 04.07.2022 – 03.08.2022 – studentka IV semestru kierunku Chemia Ogólna, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
2. 16.08.2022 – 30.09.2022 – student IV semestru kierunku Technologia Chemiczna, Wydział Chemii, Politechnika Warszawska

#### **Członek Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego**

**Sumaryczny IF: 56,575; MNiSW: 1255; Współczynnik Hirscha H: 4 (Web of Science)**



## 12. Analiza bibliometryczna – Biblioteka WUM



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

BIBLIOTEKA UCZELNIANA

Nr referencyjny  
BIBG/Punktacja/ *58* /2024/KK

Warszawa, 30.01.2024

Sz. Pani  
Lidia Gurba-Bryśkiewicz


ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA CAŁOKSZTAŁTU DOROBKU PUBLIKACYJNEGO  
PANI LIDII GURBA-BRYŚKIEWICZ,  
W POSTĘPOWANIU O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

Lp.	Opis bibliograficzny	Impact Factor	MNiSW
I. Artykuły opublikowane w czasopismach naukowych lub w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych ujętych w aktualnym wykazie MNiSW <sup>1</sup>			
1.	Wojtowicz-Krawiec A, Sokolowska I, Smorawinska M, Chojnacka-Puchta L, Mikiewicz D, Lukaszewicz N, Marciniak-Rusek A, Wolinowska R, Bierczynska-Krzysik A, Porebska AJ, Kuthan-Styczen J, <b>Gurba L</b> , Borowicz P, Mazurkiewicz A, Plucienniczak G, Plucienniczak A. Use of Ubpl protease analog to produce recombinant human growth hormone in Escherichia coli. Microb Cell Fact. 2014;13(1):113 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,221	40
2.	Zieliński M, Wójtowicz-Krawiec A, Mikiewicz D, Kęsik-Brodacka M, Cecuda-Adamczewska V, Marciniak-Rusek A, Sokolowska I, Lukaszewicz N, <b>Gurba L</b> , Odrowąż-Sypniewski M, Baran P, Plucienniczak G, Plucienniczak A, Borowicz P, Szewczyk B. Expression of recombinant human bifunctional peptidylglycine α-amidating monooxygenase in CHO cells and its use for insulin analogue modification. Protein Expr Purif. 2016;119:102-9 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	1,351	15
3.	Mach M, Bazydło-Guzenda K, Buda P, Matłoka M, Dzida R, Stelmach F, Gałązka K, Wąsińska-Kałwa M, Smuga D, Hołowińska D, Dawid U, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Wiśniewski K, Dubiel K, Pieczykolan J, Wiczorek M. Discovery and development of CPL207280 as new GPR40/FFA1 agonist. Eur J Med Chem. 2021;226:113810 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	7,088	140

<sup>1</sup> Wykaz sporządzony zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.). Wykaz stanowi załącznik do komunikatu MNiSW z 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

4.	Pankiewicz P, Szybiński M, Kisielewska K, Gołębiowski F, Krzemiński P, Rutkowska-Włodarczyk I, Moszczyński-Pętkowski R, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Delis M, Mulewski K, Smuga D, Dominowski J, Janusz A, Górka M, Abramski K, Napiórkowska A, Nowotny M, Dubiel K, Kalita K, Wieczorek M, Pieczykolan J, Matłoka M. Do Small Molecules Activate the TrkB Receptor in the Same Manner as BDNF? Limitations of Published TrkB Low Molecular Agonists and Screening for Novel TrkB Orthosteric Agonists. <i>Pharmaceuticals (Basel)</i> . 2021; 14(8):704 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	5,215	100
5.	Bukowska-Oleń E, Sowińska-Seidler A, Larysz D, Gawliński P, Koczyk G, Popiel D, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Materna-Kiryłuk A, Adamek Z, Szczepankiewicz A, Dominiak P, Glista F, Matuszewska K, Jamsheer A. Results from Genetic Studies in Patients Affected with Craniosynostosis: Clinical and Molecular Aspects. <i>Front Mol Biosci</i> . 2022;9:865494 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	5,0	140
6.	Stypik M, Zagózda M, Michalek S, Dymek B, Zdzalik-Bielecka D, Dziachan M, Orłowska N, Gunerka P, Turowski P, Hucz-Kalitowska J, Stańczak A, Stańczak P, Mulewski K, Smuga D, Stefaniak F, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Leniak A, Ochal Z, Mach M, Dzwonek K, Lamparska-Przybyś M, Dubiel K, Wieczorek M. Design, Synthesis, and Development of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K $\delta$ Inhibitors: Part I-Indole Derivatives. <i>Pharmaceuticals (Basel)</i> . 2022;15(8):949 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,6	100
7.	Stypik M, Michalek S, Orłowska N, Zagózda M, Dziachan M, Banach M, Turowski P, Gunerka P, Zdzalik-Bielecka D, Stańczak A, Kędzierska U, Mulewski K, Smuga D, Maruszak W, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Leniak A, Pietruś W, Ochal Z, Mach M, Zygmunt B, Pieczykolan J, Dubiel K, Wieczorek M. Design, Synthesis, and Development of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K $\delta$ Inhibitors: Part II-Benzimidazole Derivatives. <i>Pharmaceuticals (Basel)</i> . 2022;15(8):927 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,6	100
8.	Michalek S, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Maruszak W, Zagózda M, Maj AM, Ochal Z, Dubiel K, Wieczorek M. The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (CPL302415). <i>RSC Adv</i> . 2022;12(52):33605-33611 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	3,9	100
9.	<b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> [aut. koresp.], Dawid U, Smuga DA, Maruszak W, Delis M, Szymczak K, Stypik B, Moroz A, Blocka A, Mroczkiewicz M, Dubiel K, Wieczorek M. Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies. <i>Int J Mol Sci</i> . 2022;23(18):10720 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	5,6	140

10.	Michalek S, Maj AM, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Maruszak W, Zagozda M, Ochal Z, Dubiel K, Wieczorek M. Development and optimization of a continuous flow ester reduction with LiAlH <sub>4</sub> in the synthesis of a key intermediate for a PI3Kδ inhibitor (CPL302415). Reaction Chemistry and Engineering. 2023;8(5):1117-1124 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	3,9	100
11.	Michalek S, Powala A, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Piórkowska N, Olejkowska P, Yamani A, Ochal Z, Dubiel K, Wieczorek M. Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor. Monatshefte für Chemie. 2023;154(11):1307-1314 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	1,8	40
12.	<b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> [aut. koresp.], Maruszak W, Smuga DA, Dubiel K, Wieczorek M. Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery. Biomedicines. 2023;11(10):2752 [Rodzaj publikacji: praca poglądowa]	4,7	100
13.	Pietruś W, Stypik M, Zagozda M, Banach M, <b>Gurba-Bryśkiewicz L</b> , Maruszak W, Leniak A, Kurczab R, Ochal Z, Dubiel K, et al. Tuning the Biological Activity of PI3Kδ Inhibitor by the Introduction of a Fluorine Atom Using the Computational Workflow. Molecules. 2023;28(8):3531 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,6	140
Łącznie:		56,575	1255
II. Artykuły opublikowane przed 1.01.2019 r. w czasopiśmie ujętych w wykazie czasopism MNiSW z dnia 25.01.2017 r., o ile czasopismo uzyskało co najmniej 10 pkt.			
Łącznie:		-	-
III. Pozostałe artykuły			
Łącznie:			
<b>Łącznie (cz. I- III):</b>		<b>56,575</b>	<b>1255</b>
IV. Monografie naukowe/rozdziały w monografiach wydane przez wydawnictwa ujęte w wykazie MEiN <sup>2</sup> lub jednostki organizacyjne podmiotów, których wydawnictwa są ujęte w tym wykazie			
V. Pozostałe monografie lub rozdziały w monografiach			
brak			
VI. Patenty			
14.	Patent nr 216540. P.380812. Oszczapowicz I, Sikora A, Grzechnik M, Borowicz P, Tobiasz J, Jarecka M, Tejchman B, <b>Gurba L</b> . Kompozycja w postaci żelu, sposób jej otrzymywania i zastosowanie w kosmetyce i/lub dermatologii. 2014. Urząd Patentowy RP		

p.o. DYREKTOR  
Biblioteki Uczelnianej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
  
mgr Agnieszka Czarna

<sup>2</sup> Wykaz sporządzony zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. a Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.). Wykaz ogłoszony komunikatem MEiN z dnia 22 lipca 2021 r. w sprawie wykazu wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe.

## 13. Oświadczenia współautorów publikacji

### 13.1. Publikacja P1

Warszawa, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr Urszula Dawid

(imię i nazwisko)

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. “Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w przeprowadzeniu badań, walidację metody, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

dr inż. Damian Smuga  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, wykonanie obliczeń, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 6 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprzewodzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr hab. Wioleta Maruszak  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w przeprowadzeniu badań, walidacja metody, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr inż. Monika Delis  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w wykonaniu badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 3 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazuń Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

Krzysztof Szymczak

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. „Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w syntezie związków wykorzystanych w badaniach.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Elektronicznie podpisany  
przez Krzysztof Tomasz  
Szymczak

Data: 2024.01.27 11:18:17  
+01'00'

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników



Warszawa 5-02-2024  
(miejsowość, data)

Bartosz Stypik  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. “Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w syntezie związków wykorzystanych w badaniach.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidji Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidji Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Stypik Bartosz

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazień Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Moroz

(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w syntezie związków wykorzystanych w badaniach.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako  $< 1$  %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

mgr Aleksandra Błocka  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. “Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w syntezie związków wykorzystanych w badaniach.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako <1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz ... w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Błocka, Aleksandra

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazuń Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr inż. Michał Mroczkiewicz

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w syntezie związków wykorzystanych w badaniach.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 29.01.2024  
(miejscowość, data)

mgr inż. Krzysztof Dubiel  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz współudział w pozyskaniu finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako  $< 1$  %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

dr inż. Maciej Wieczorek  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Implementation of QbD Approach to the Development of Chromatographic Methods for the Determination of Complete Impurity Profile of Substance on the Preclinical and Clinical Step of Drug Discovery Studies"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz pozyskanie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 70 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprzewodzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Maciej Wieczorek  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

**13.2. Publikacja P2**

Kazun Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr hab. Wioleta Maruszak

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w opracowanie koncepcji publikacji oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 92%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


obejmował on: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu artykułów, wykonanie szczegółowej analizy i krytycznej oceny treści artykułów, przygotowanie manuskryptu oraz materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazień Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

dr inż. Damian Smuga  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór i współudział w pozyskaniu dofinansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 92%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

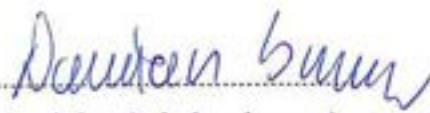
obejmował on: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu artykułów, wykonanie szczegółowej analizy i krytycznej oceny treści artykułów, przygotowanie manuskryptu oraz materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników



Kazun Nowy, 22.01.2024

(miejsowość, data)

mgr inż. Krzysztof Dubiel  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz współudział w pozyskaniu finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 92%,

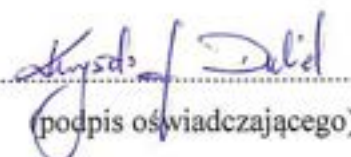
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i wygenerowanie planów eksperymentów DoE, współprowadzenie badań, walidację metody, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, tworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

dr inż. Maciej Wieczorek

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Quality by Design (QbD) and Design of Experiments (DOE) as a Strategy for Tuning Lipid Nanoparticle Formulations for RNA Delivery"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz pozyskanie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 92 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu artykułów, wykonanie szczegółowej analizy i krytycznej oceny treści artykułów, przygotowanie manuskryptu oraz materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

**13.3. Publikacja P3**

Kazun Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

dr inż. Stanisław Michałek

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. “The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze przepływowym, przeprowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze okresowym, interpretację i dyskusję wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

*Stanisław Michałek*

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

dr hab. Wioleta Maruszak  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

wykonanie analiz UHPLC, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %, (imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz (imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024  
(miejsce, data)

dr inż. Marcin Zagozda  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazuń Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr hab. Anna Maria Maj

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie reakcji redukcji z wykorzystaniem katalizatorów rutenowych w ciśnieniowym reaktorze okresowym, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstawanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 22.01.2024  
(miejsowość, data)

dr hab. inż. Zbigniew Ochal, prof. PW  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)”

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazień Nowy, 22.01.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Krzysztof Dubiel

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz współudział w pozyskaniu finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

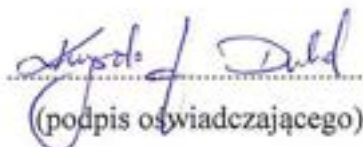
obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników



Kazimierz Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr inż. Maciej Wiczorek  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "The design of experiments (DoE) in optimization of an aerobic flow Pd-catalyzed oxidation of alcohol towards an important aldehyde precursor in the synthesis of phosphatidylinositide 3-kinase inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz pozyskanie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

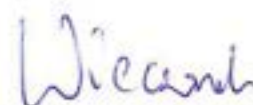
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstaniu publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

**13.4. Publikacja P4**

Kazień Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr inż. Stanisław Michałek  
(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with LiAlH<sub>4</sub> in the synthesis of a key intermediate for a PI3Kδ inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze przepływowym, prowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze okresowym, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %, (imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Stanisław Michałek  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazień Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr hab. Anna Maria Maj  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie reakcji redukcji z wykorzystaniem katalizatorów rutenowych w ciśnieniowym reaktorze okresowym, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejscowość, data)

dr hab. Wioleta Maruszak  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

wykonanie analiz UHPLC, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr inż. Marcin Zagozda  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współopracowanie koncepcji badań, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Marcin Zagozda  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 22.01.2024

(miejsowość, data)

dr hab. inż. Zbigniew Ochal, prof. PW

(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako  $< 1$  %.

Wkład Lidii Gurby – Bryśkiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryśkiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazuń Nowy, 22.01.2024

(miejscowość, data)

mgr inż. Krzysztof Dubiel

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with LiAlH<sub>4</sub> in the synthesis of a key intermediate for a PI3Kδ inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz współudział w pozyskaniu finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako < 1 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

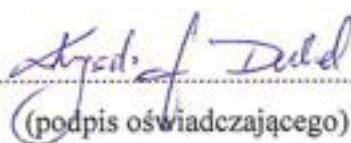
obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w momencie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazuń Nowy, 19.01.2024

(miejsowość, data)

dr inż. Maciej Wieczorek

(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Development and optimization of a continuous flow ester reduction with  $\text{LiAlH}_4$  in the synthesis of a key intermediate for a PI3K $\delta$  inhibitor (CPL302415)"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadzór oraz pozyskanie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako  $< 1$  %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

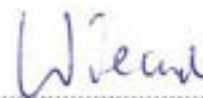
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników



**13.5. Publikacja P5**

Kazimierz Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr inż. Stanisław Michałek  
(imię i nazwisko)

**OŚWIADCZENIE**

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze przepływowym, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Stanisław Michałek  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 27.01.2022  
(miejsowość, data)

inż. Antoni Powała  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współpracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie i optymalizację reakcji w reaktorze przepływowym, interpretację wyników oraz współtworzenie manuskryptu i przygotowanie materiałów uzupełniających.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Antoni Powała  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

 Natalia Piórkowska  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współudział w opracowaniu koncepcji badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

 Patrycja Olejkowska  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współdział w opracowaniu koncepcji badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazimierz Nowy, 19.01.2024  
(miejsowość, data)

dr Abdellah Yamani  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

współudział w opracowaniu koncepcji badań.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Abdellah Yamani  
(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 22.01.2024  
(miejsowość, data)

dr hab. inż. Zbigniew Ochał, prof. PW  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór, współtworzenie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2%.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30%,  
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz  
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Kazun Nowy, 19.01.2024

(miejscowość, data)

dr inż. Maciej Wieczorek  
(imię i nazwisko)

## OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Fast Claisen condensation reaction optimization in a continuous flow reactor"

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór oraz pozyskanie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako  $< 1$  %.

Wkład Lidii Gurby – Bryskiewicz w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji DoE, wygenerowanie planów eksperymentów, analizę statystyczną wyników, interpretację i dyskusję wyników, współtworzenie manuskryptu oraz przygotowanie materiałów uzupełniających.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gurby – Bryskiewicz

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

\*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników