

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE VÝROBY VYBRANÉ LÉČIVÉ SUBSTANCE

THE OPTIMIZATION THE PRODUCTION OF SELECTED MEDICINAL SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Mgr. JAN FRÁNEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2011

ABSTRAKT

Mgr. Jan Fránek 2011: Optimalizace výroby vybrané léčivé substance

Diplomová práce zpracovává optimalizaci výroby fingolimodu pomocí hydrogenace. Při optimalizaci výroby dochází k redukci benzylické hydroxyskupiny a nitroskupiny nitrofungotriolu. Protože dochází k redukci dvou různých skupin bylo nutné rozdělit hydrogenaci na dvě fáze. Původním záměrem bylo optimalizovat výrobu pouze v autoklávu, ale nutnost použití kyselého katalytického prostředí v první fázi vedlo k rozdělení výroby na redukci v reaktoru a následnou katalyzovanou hydrogenaci, již za neutrálních podmínek, v autoklávu. Cesta přípravy účinné látky pomocí autoklávu nebyla dříve podrobněji prozkoumána. Vyhodnocení optimalizace je součástí výsledků. Ve výsledcích jsou také zahrnuty výrobní šarže na pilotní jednotce. Protože výsledky postupu pilotní jednotky nebyly uniformní, v optimalizaci bylo nutné pokračovat i po ukončení výroby na pilotní jednotce. Následný postup upravený dle posledních pokusů byl předán do provozního procesu.

ABSTRACT

Mgr. Jan Fránek 2011: The optimization the production of selected medicinal substances

The diploma thesis dealt with optimization of production of fingolimod by hydrogenation. During the optimization of production, there was reduction of benzylic hydroxygroup and nitrogroup of nitrofungotriol. Reduction of two different groups caused dividing process of hydrogenation into two phases. The original intention was to optimize production only in the autoclave, but the need of using acidic catalytical medium in first phase led to dividing the production into reduction in the reactor and following catalyzed hydrogenation, already in neutral conditions, in the autoclave. The way of preparation of active substance by using an autoclave had not been explored in detail before. Evaluation of optimization is a part of results. There are also production charges on pilot plant included in results. Because the results of procedure of the pilot unit were not uniform, it was necessary to continue in optimization even after finishing the production in pilot plant. Following procedure modified according to the latest experiments was passed to the operating process.

KLÍČOVÁ SLOVA

Optimalizace, hydrogenace, katalyzátor, autokláv

KEYWORDS

Optimization, hydrogenation, catalyst, autoclave

FRÁNEK, J. *Optimalizace výroby vybrané léčivé substance*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 63 s. a 1 s příloh. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

DECLARATION

I declare that the diploma thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the diploma thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....

student's signature

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval paní doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. Za čas, který mi věnovala, a cenné rady, které mi udělovala při zpracování mé diplomové práce.

Současně bych chtěl poděkovat panu Ing. Petru Krajčovičovi za umožnění tvorby diplomové práce na V&PJ.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Roztroušená skleróza	10
3.2 Moderní léčiva roztroušené sklerózy	11
3.2.1 Současná léčba roztroušené sklerózy	12
3.2.2 Nová léčiva	12
3.2.2.1 <i>Cladribin</i>	13
3.2.2.2 <i>Teriflunomide</i>	14
3.2.2.3 <i>Dimethyl fumarát (BG-12)</i>	14
3.2.2.4 <i>Laquinimod</i>	14
3.2.2.5 <i>Fingolimod (FTY 720)</i>	14
3.3 Hydrogenace	17
3.3.1 Rozdělení katalyzátorů	17
3.3.2 Hydrogenační techniky	18
3.4 Analytické metody využité při optimalizaci léčiva	19
3.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC	19
3.4.2 Jednotlivé prvky a součásti kapalinového chromatografu	20
3.4.2.1 <i>Čerpadla mobilní fáze</i>	20
3.4.2.2 <i>Zařízení pro dávkování vzorků</i>	21
3.4.2.3 <i>Chromatografické kolony a jejich náplně</i>	21
3.4.2.4 <i>Detektory</i>	21

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Přístroje, zařízení, software	24
4.1.1 Výroba fingolimodu - vývojová část	24
4.1.2 Výroba fingolimodu - výrobní část	24
4.1.3 Analytická část - Kapalinová chromatografie	25
4.1.4 Analytická část - ostatní	25
4.1.5 Software pro zpracování a prezentaci dat	25
4.2 Použité chemikálie a standardy	26
4.2.1 Rozpouštědla	26
4.2.2 Chemikálie a jiné materiály	26
4.2.3 Technické plyny	27
4.2.4 Použití standardy	27
4.3 Analytické metody (metodika HPLC)	27
4.3.1 Zařízení a metody měření HPLC	27
4.3.2 Podmínky a parametry měření HPLC	28
4.3.3 Postup měření HPLC	29
4.4 Návrh postupů pro výrobu fingolimodu na pilotní jednotce	30
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1 Optimalizace výroby fingolimodu	34
5.1.1 Hydrogenace v autoklávu za přítomnosti p-toluensulfonové kyseliny a cesty typu A	36
5.1.2 Redukce v autoklávu za přítomnosti kyseliny maleinové	38
5.1.3 Hydrogenace M/1104 za přítomnosti kyseliny dusičné	40
5.1.4 Hydrogenace M/1104 za přítomnosti kyseliny chloristé	44

5.1.5 Redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu	46
5.1.6 Optimalizace redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu	49
<i>5.1.6.1 Redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu za použití postupu optimalizace 9</i>	<i>51</i>
5.2 Výroba šarží fingolimodu na pilotní jednotce	53
5.3 Optimalizace na základě výsledků výroby	53
5.4 Zvolený způsob výroby fingolimodu	55
5.4.1 Rozpouštědla zvolená pro výrobu fingolimodu	55
5.4.2 Zvolené pH pro výrobu fingolimodu	55
5.4.3 Otáčky zvolené pro výrobu fingolimodu	56
5.4.4 Teplota zvolená pro výrobu fingolimodu	56
5.4.5 Tlak zvolený pro výrobu fingolimodu	56
5.4.6 Množství katalyzátoru zvolené pro výrobu fingolimodu	56
6. ZÁVĚR	57
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	58
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63
9. PŘÍLOHY	64

1. ÚVOD

Roztroušená skleróza je autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému, při které dochází k demyelinizaci myelinových pochev a tím k omezení nebo ztrátě schopnosti přenosu nervového vzruchu. Její příčina není známa a dosud nebyl nalezen lék, který by byl schopen zcela zastavit postup choroby. Odhaduje se, že roztroušenou sklerózu trpí na světě asi 2 500 000 lidí, v České republice 10 000 - 13 000 nemocných [1].

Léčba roztroušené sklerózy není jednotná. Konzervativní léčba využívá např. kortikosteroidy, glatiramer acetát a další, zatímco alternativní léčba používá moderní léčiva a nové postupy léčby. Mezi moderní léčiva roztroušené sklerózy patří cladribin, teriflunomide, dimethyl fumarát, laquinimod a právě fingolimod [2], jehož výrobu diplomová práce popisuje. Do budoucna skýtá velký potenciál využití monoklonárních látek, antigen specifická léčiva, kombinální léčba nebo léčba pomocí kmenových buněk.

Fingolimod byl uveden na trh na počátku roku 2011 ve formě hydrochloridu jako součást léčiva Gilenya. Podává se ve formě tablet, perorálně jednou denně. Protože funguje na principu inhibice uvolňování T-lymfocytů z uzlin, je jedním z nežádoucích účinků léků imunodeficiencie. Dalšími pak jsou poruchy jater či bradyarytmie. I přes tyto závažné nežádoucí účinky vykazuje léčba velmi uspokojivé výsledky.

2. CÍL PRÁCE

Cílem optimalizace bylo zefektivnění výroby fingolimodu, tedy jeho výroby v největší možné čistotě a za nejvyššího výtěžku. Zároveň bylo nutné dodržet postup, který nebyl nijak patentově chráněn.

Samotná výroba fingolimodu je vícestupňová. Prochází přes několik mezistupňů až do finální podoby hydrochloridu fingolimodu (FGD.hcl), který vzniká z fingolimodu (FGD) [3]. Právě optimalizace výrobního stupně fingolimod za využití hydrogenace byla cílem práce.

K efektivní výrobě fingolimodu vedly tyto kroky:

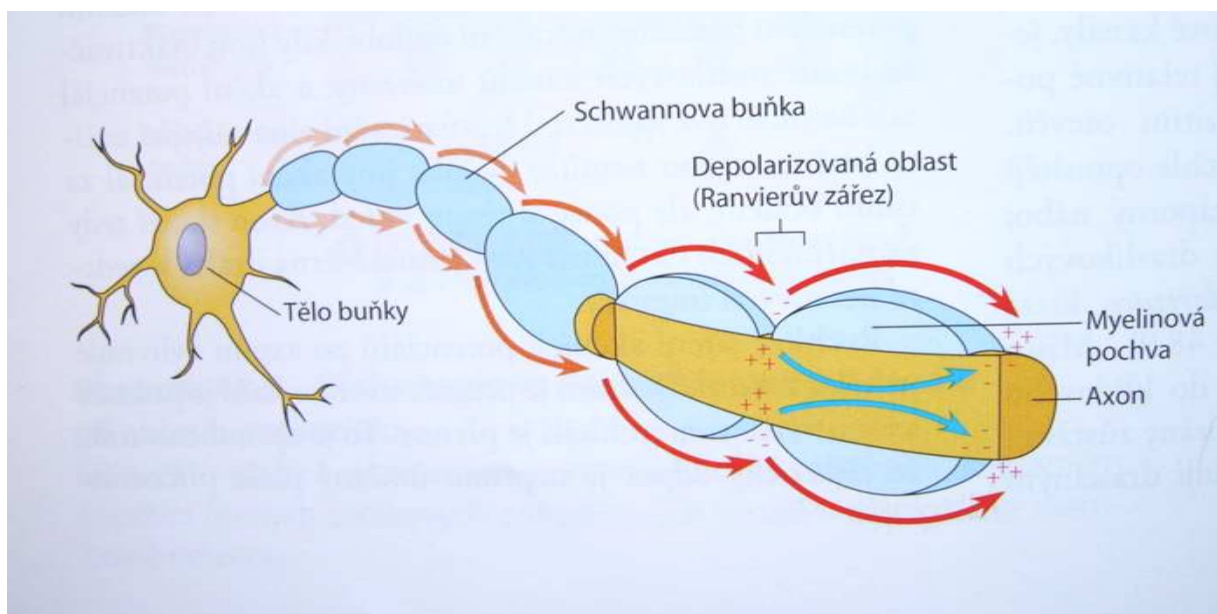
- experimenty vedoucí k vzniku fingolimodu přes různé mezistupně a výběr nejlepší cesty vzniku účinné látky
- testování způsobu hydrogenace za použití různých kyselin
- volba vhodných zařízení pro hydrogenaci
- rozdělení hydrogenace do dvou fází a dvou zařízení, reaktoru a autoklávu
- optimalizace vybraného způsobu výroby fingolimodu, redukcí nitrofingodiolu za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu
- výroba šarží fingolimodu na pilotní jednotce a opětovná optimalizace na základě výsledků výroby
- zkoumání vlivu různých parametrů zařízení (teplota, tlak, pH....) vedoucí k maximalizaci výtěžku a minimalizaci nečistot

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (*sclerosis multiplex*) je autoimunitní onemocnění, při kterém imunitní systém člověka napadá centrální nervovou soustavu. Dochází k demyelinizaci myelinové pochvy nervových buněk. Základní buňkou nervové soustavy je neuron (Obr. 1) [4]. Jeho nervová vlákna (axony) jsou obalena myelinem, tukovou substancí produkovanou oligodendrocyty, která vlákna vyživuje a chrání. Další funkce myelinu spočívá v urychlení přenosu vzruchu a k omezení přenosu vzruchu na jiné než definované místo. Proto je myelinová pochva bezpodmínečně nutná ke správnému fungování centrální nervové soustavy. Poškozením nebo ztrátou myelinové pochvy může dojít k zániku axonu. To znamená, že dochází ke zhoršení nebo úplnému zastavení přenosu nervového vzruchu [5,6].

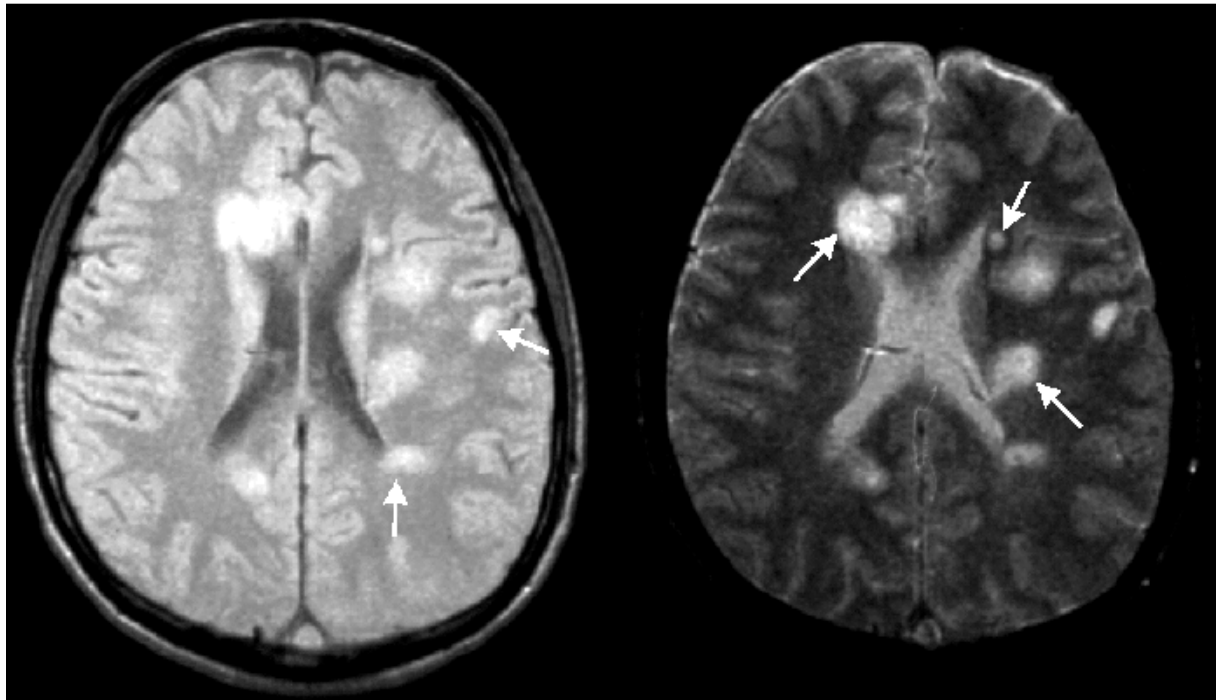
Onemocnění probíhá ve střídavých obdobích označovaných jako relaps. Během tohoto období dochází ke střídání ataků (začátek zánětu) a remisí (návrat k původnímu fungování) [7]. Průběh nemoci je progresivní, u jednotlivých případů značně odlišný. Symptomy jsou změna citlivosti, svalové křeče, pohybové obtíže, zrakové problémy, problémy s řečí, chronické bolesti...[8]. Podle průběhu roztroušené sklerózy ji dělíme na benigní, které provází malé množství ataků s minimálními následky, a maligní, provázející těžké záchvaty a rychlé zhoršení invalidity.



Obr. 1 Neuron, přenos vzruchu.

Ačkoliv jsou patologické projevy roztroušené sklerózy odlišné podle typu onemocnění, typické jsou vždy léze a záněty. Léze jsou jizvy (sklerózy, plaky), tedy místa, kde došlo ke ztrátě nebo ztenčení myelinové pochvy. Dosahují velikosti od jednoho milimetru až po několik centimetrů (Obr. 2). Tím může dojít až k přerušení axonů a ztrátě vedení signálu. Na počátku nemoci oligodendrocyty produkují myelin k obnově pochev, remyelinizace však

není schopná udržet tempo s demyelinizací způsobené roztroušenou sklerózou a dochází k obklopení axonu lézemi s následnou ztrátou signálu [9].



Obr. 2 Znázornění lézí při vyšetření mozkové aktivity pomocí nukleární magnetické rezonance.

Zánět je u RS způsoben T-lymfocyty. Ty prostupují přes hematoencefalitickou bariéru, která za normálních podmínek brání vstupu lymfocytů do nervové soustavy. Ovšem spuštěná infekce snižuje integritu membrány a umožňuje vstup lymfocytů. Ty za patologických okolností považují myelinovou pochvu za cizorodou a napadají ji. To vyvolává další zánětlivý proces a stimulaci dalších T-lymfocytů, cytokininů a protilátek, což demyelinizaci jen urychluje. Možná je i aktivace makrofágů a B-lymfocytů [10,11].

Etiologie onemocnění není jasná. Předpokládá se, že důvody jsou komplexní, s podílem genetických, infekčních a imunologických faktorů [12].

3.2 Moderní léčiva roztroušené sklerózy

V dnešní době není léčba roztroušené sklerózy jednotná. Účinnost léčby není stoprocentní a dlouhodobá pravidelná aplikace stejného léčiva často snižuje efekt léčby. Nová léčiva často nespĺňují očekávání pro své nežádoucí vedlejší účinky jako je toxicita a únava z léčby [13]. V posledních letech dochází k velkým pokrokům ve výzkumu nemoci a její léčbě.

3.2.1 Současná léčba roztroušené sklerózy

Samotnou léčbu roztroušené sklerózy rozlišujeme podle potlačování patogenetických dějů na léčbu ovlivňující imunitní systém a léčbu potlačující symptomy [14]. První typ léčby se ještě dělí podle způsobu ovlivnění imunitního systému na imunomodulační, která mění obsah imunitní odpovědi, a imunosupresivní, která omezuje nebo zabraňuje činnosti imunitního systému [15].

Léčba akutních ataků spočívá v jednorázovém podání vysokých dávek kortikosteroidů. Při nedostatečné odezvě s přetrváváním klinických symptomů déle než 3 týdny lze podat dávku cyklofosfamidů.

Při dlouhodobé léčbě se užívají preparáty DMD (Disease Modifying Drugs) – injekční aplikace interferonu beta a glatiramer acetátu [16]. K dalším preparátům patří imunoglobuliny. Klasická imunosuprese spočívá v podávání azathioprinu, eventuálně lze užít methotrexát, cyklosporin A nebo jiná cytostatika. Při léčbě sekundární chronické progresy, která je obtížně terapeuticky ovlivnitelná, lze někdy dosáhnout stabilizace imunosupresivní léčbou a vzácně je možné stav ovlivnit opakovaným podáváním sériemi intravenózních steroidů.

3.2.2 Nová léčiva

Výzkum léčiv na roztroušenou sklerózu se ubírá mnoha směry. Cílem výzkumu je nalézt léčivo s regeneračním a neuroprotektivním potenciálem. Nová léčiva prochází jednotlivými fázemi výzkumu (Příloha 1) [17]. Zkouší se antigen specifická léčiva, kombinační léčba nebo léčba pomocí kmenových buněk.

Mnoho se očekává od monoklonálních látek, což jsou imunoglobuliny získané z klonální populace jedné plazmatické buňky, mající definované vlastnosti a vážící se specificky na svůj substrát [18]. Skupina monoklonálních protilátek užívá myší, chimérické nebo humanizované protilátky proti různým molekulám a složkám imunitního systému. U nehumanizovaných preparátů se často vyskytuje problém s tvorbou protilátek, čímž dochází k selhání efektu. Velkou nevýhodou jsou vedlejší účinky léčby. Jedinou monoklonální látkou k léčbě roztroušené sklerózy, která je uvedena na trh je natalizumab. Mezi látky procházející II. a III. fází klinických studií patří alemtuzumab, daclimzumab, anti CD20-Rituximab [19]. Tyto látky podle dosavadních výsledků skrývají do budoucna velký potenciál [20, 21, 22].

Mezi nejmodernější léčiva, u kterých právě končí III. fáze klinického testování nutných pro možné uvedení léčiva na trh, patří pět tabletových preparátů: cladribin, teriflunomide, dimethyl fumarát, laquinimod a fingolimod [23]. Tato léčiva vykazující minimálně obdobnou účinnost jako starší léčiva a jsou v současné době ve vývoji nebo ve schvalovací fázi ústavů kontroly léčiv (cladribin, fingolimod) (Tab. 1). Nové generace léčiv nejsou pouze imunosupresivní, ale jsou ve větší míře imunomodulační. Jejich podávání je orální, což usnadňuje dávkování a aplikaci.

Tab. 1 Porovnání nových perorálních preparátů na léčbu roztroušené sklerózy (ARR - roční účinnost v množství reminentních relapsů, MRI - měření funkční aktivity mozku pomocí magnetické resonance)

	Cladribin	Teriflunomide	BG-12 dimethyl fumarát	Laquinimod	FTY 720 Fingolimod
Dávkování	1 x denně	1 x denně, pulz 5 dnů po sobě, 2-4x ročně	1 x denně	3 x denně	1 x denně
Mechanismus účinku	cytostatikum, imunosupresor	antimetabolit, imunosupresor	imuno-modulace	imuno-modulace	inhibice uvolňování T-lymfocytů z uzlin
Efekt	55% snížení ARR	33% snížení ARR, redukce MRI o 61%	32% snížení ARR, redukce MRI o 30-33%	33% snížení ARR, redukce MRI o 60%	60% snížení ARR, redukce MRI o 67-70%
Vedlejší účinky	leukopenie, cefalea, infekce	jaterní selhání, infekce, teratogenita	při kumulaci poškození ledvin, zrudnutí kůže, pálení	anemie, vznik trombózy, teratogenita	primoinfekce, srdeční aritmie, snížení plicních funkcí, kožní malignity

3.2.2.1 Cladribin

Cladribin patří mezi schválená cytostatika [24]. Při léčbě roztroušené sklerózy se využívá jako antimetabolit. Při užívání cladribimu dochází ke tvorbě rezistence vůči adenosideamináze. Rezistence vede ke kumulaci deoxyribonukleotidů a tím k inhibici syntézy DNA a RNA. Dochází tak k apoptóze buněk lymfocytů s minimální toxicitou vůči ostatním tkáním [25]. Roční účinnost v množství reminentních relapsů ARR proti placebo byla kolem 55%. Účinnost byla potvrzena i na měření funkční aktivity mozku MRI [26]. Nejčastějším vedlejším účinkem je lymfopenie (snížený počet lymfocytů v krvi), dána vlivem účinku léku, bolesti hlavy a nazofaryngitidy (záněty nosohltanu). Lék je teratogenní, má negativní účinky na embryo [27].

3.2.2.2 Teriflunomide

Také teriflunomide patří mezi cytostatika. Funguje jako inhibitor dihydroorotát dehydrogenázy (enzym pro syntézu pirimidinů) [28]. Blokadí tvorby pirimidinu tak dochází k inhibici syntézy DNA a RNA a klesá produkce imunoglobulinů. Efekt léku byl prokázán ve studiích II. fáze 61% redukcí MRI a 33% ARR. Pro ověření výsledků ARR pokračují studie III. fáze. Jako vedlejší účinky se projevují infekce, nazofaryngitida (zánět nosohltanu), alopecie (vypadávání vlasů), nauzea (nevolnost), elevace jaterních enzymů ... Závažnější je výskyt polyneuropatie (poškození periferních nervů), pankreatitidy (zánět slinivky) a projevující se teratogenní účinek [29]. Vliv na plodnost a teratogenní účinek výrazně ovlivňuje skupinu možných pacientů [30].

3.2.2.3 Dimethyl fumarát (BG-12)

Syntetickým imunomodulátorem je dimethyl fumarát (BG-12) používán v dermatologii od roku 1994 [31]. Ovlivňuje T-lymfocyty a podporuje produkci protizánětlivých cytokyninů. Dokáže aktivovat buněčnou obranu proti toxinům a stresu. Díky těmto vlastnostem se uvažuje o neuroprotektivním efektu a možnostech využití při léčbě roztroušené sklerózy. Ve studiích II. klinické fáze byl prokázán 32% pokles ARR oproti placebo a snížení počtu a velikosti ložisek o 30-33% měřených pomocí MRI. Potíže se vyskytovaly hlavně u původně tekuté formy přípravku. Tabletové formy jsou pokryty acidorezistentním střevním křídovým papírem, který brání kontaktu se sliznicí a léčivo ji tak nepoškozuje. I přes toto opatření jsou však nevhodné pro pacienty s žaludečními vředy. Další nevhodnou skupinou jsou kardiaci. Při kumulaci léčiva může dojít k poškození ledvin. Typické příznaky jsou pak zrudnutí kůže, pálení a pocení, bolesti hlavy a zubů [32].

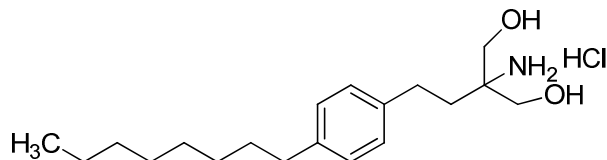
3.2.2.4 Laquinimod

Laquinimod má imunomodulační vlastnosti. Neovlivňuje životnost ani proliferaci, ale zvyšuje sekreci cytokinu (signální protein) IL 4 a IL 10 a snižuje produkci IL 17. Tímto srovnává poměry s protizánětlivými a prozánětlivými cytokiny. Ve studiích II. fáze byl prokázán 33% pokles ARR a 60% redukce MRI. III. fáze studií probíhá. Vedlejší účinky jsou anemie (chudokrevnost), nespavost a možnost vzniku trombóz. Látka je teratogenní. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří pak nazofaryngitida, bolesti zad a hlavy [33].

3.2.2.5 Fingolimod (FTY 720)

Fingolimod (FTY 720) (Obr. 3) je strukturální analog myriocinu, látky odvozené od askomycety *Isaria sinclaria* [34]. Chemický název je 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]-propan-1,3-diol. Princip účinku fingolimodu FTY 720

spočívá ve zpomalení uvolňování lymfocytů z lymfatických uzlin a tím snížení počtu agresivních buněk. Autoagresivní lymfocyty pronikají hematoencefalickou bariérou do nervového systému a ničí myelinové pochvy axonů. Porušení pochvy pak způsobuje snížení až ztrátu schopnosti přenosu vzruchu.



Obr. 3 Fingolimod hydrochlorid [35]

Lymfocyty jsou regulovány pomocí sfingosin 1-fosfátu (S1P), který reguluje normální tok pomocí aktivace a diferenciacie buněk v lymfatických uzlinách. S1P jsou ovlivňovány pěti G-proteiny a pomocí svých receptorů (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 a S1P5) působí na mnoha místech v těle. Kromě lymfocytů se vyskytují v centrální nervové soustavě, endotermálních buňkách, na převodním systému srdce, cévách a hladké svalovině bronchů. U pacienta s roztroušenou sklerózou dochází ke vzniku autoagresivních lymfocytů, které napadají myelinové pochvy nervového systému za předpokladu, že se jedná o infekci [36].

Fingolimod FTY720 je po požití fosforylován pomocí sfingosin kinázy [37] na biologicky aktivní FTY 720-fosfát [38], který je analogický sfingosin 1-fosfátu S1P. Aktivovaný fingolimod obsazuje 4 z 5 sfingosin 1-fosfátových receptorů S1P1, S1P3, S1P4 a S1P5 [39], pomocí kterých vyvolává odlišnou odpověď v cílových buňkách. Tím omezuje vstup lymfocytů přes hematoencefalickou bariéru a brání v centrální nervové soustavě k jejich recyklaci, která by vedla k zánětu [40]. Díky útlumení zánětu může docházet k následné strukturální obnově parenchymu nervové soustavy.

Fingolimod a jeho imunosupresivní efekt objevil japonský výzkumný tým univerzity v Kjótu. Po chemické úpravě byl patentován společnostmi Yoshitomi a Novartis [41]. Původně měl být jako léčivo užívané po transplantaci ledvin. III. fáze klinických studií ale ukázala, že jeho vlastnosti nejsou lepší než původní posttransplantační léčba [42]. Zájem o toto léčivo vzrostl po roce 2002, kdy bylo publikováno velké množství studií o funkčnosti fingolimodu při autoimunitních onemocněních [43].

Novější údaje ukázaly účinnost fingolimodu u demyelinizační polyneuropatie [44]. Souběžně probíhající II. fáze klinických studií pak naznačila účinnost léčiva proti relabující reminentní roztroušené skleróze RRRS [45, 46]. Ve II. klinické fázi TRANSFORMS, byla prokázána redukce MRI aktivity o 83% proti placebo. ARR ve studii pokleslo o 61% oproti komparátoru IFN - [beta] 1a (Tab. 2).

Tab. 2 Studie TRANSFORMS (Trial Assessing Injectable Interferon versus FTY 720 Fingolimod Oral in RRMS) II. fáze klinické studie, měření po 12 měsících [47]

Měření po 12 měsících	Fingolimod [1,25 mg] jednou denně	Fingolimod [0,50 mg] jednou denně	IFN - [beta] 1a [0,03 mg] jednou týdně
ARR	0,2	0,16	0,33
Pokles relapsů oproti placebu	80%	83%	69%
Pokles relapsů oproti komparátoru	39%	52%	100%
MRI snížení aktivity chroby	30%	31%	45%

Pozitivní výsledky II. klinické TRANSFORMS fáze umožnili spuštění III. klinické fáze FREEDOMS [48]. Výsledky studie prokázaly během jednoho roku na 1033 pacientech významné rozdíly účinné látky oproti placebu (Tab. 3). Recidiva relapsů byla snížena až o 74% u denní dávky 1,25 mg fingolimodu. Velké procento pacientů pak zůstalo bez relapsů po celé roční období. U MRI došlo k obdobnému poklesu vzniku lézí. Z dosavadních výsledků je zajímavý 30% pokles mozkové aktivity zjištěný již ve II. klinické fázi TRANSFORMS, který byl ověřen III. klinickou fází. Ve fázi FREEDOMS byla mimo jiné zjišťována účinnost látky při podávání 5mg dávky. Vyšší dávkování spíše zvyšovalo nežádoucí účinky než samotný účinek léku. Proto byl výzkum této skupiny přerušen a byla nasazena pouze velikost 1,25 mg. V dalších fázích, které v současnosti probíhají, je zjišťováno, zda se jedná o účinek způsobený poklesem zánětlivé aktivity, nebo se jedná o interakci mezi léčivem a sfingosin-1-fosfátem na nervových buňkách, jak naznačují výzkumy na zvířatech [49].

Tab. 3 Studie FREEDOMS (Fingolimod Research Evaluating Effect of Daily Oral Therapy in MS) III. fáze klinické studie, měření po 24 měsících [48]

Měření po 24 měsících	Fingolimod [1,25 mg] jednou denně	Fingolimod [0,50 mg] jednou denně	Placebo
ARR	0,16	0,18	0,40
Pokles relapsů oproti placebu	74%	70%	45%
MRI snížení aktivity chroby	70%	67%	0%

Lék bývá obvykle snášen dobře. Nejčastější nežádoucí vedlejší účinky jsou: nazofaryngitida, bolesti hlavy, únava, chřipka, lymphopenie způsobená potlačením výtoku lymfocytů z lymfatických uzlin, průjem, zvracení, bolesti zad a zvýšení hladiny jaterních enzymů [50]. Mezi závažnější problémy patří rozvoj bradykardie (zpomalení srdeční frekvence) až atrioventikulární blokády, které je nutné během prvního podání monitorovat. Dále existuje po vysazení léčby reverzibilní riziko makulárního edému. Další závažné problémy souvisejí s umístěním sfingosin-1-fosfát receptorů v jiných než sledovaných tkáních. Může dojít k hypertrofii bronchiálního svalstva, vazokonstrikci cév, primoinfekci a výskytu melanomů, který je potenciálně vyšší u jakéhokoliv imunomodulačního léčiva [51]. Užívání během těhotenství může vést k poškození plodu, proto se doporučuje ukončení dávkování 3 měsíce před plánováním gravidity.

III. klinická fáze FREEDOMS tak prokázala léčivé účinky fingolimodu při léčbě roztroušené sklerózy a umožnila jeho schválení FDA 21.9. 2010 [52]. V lednu roku 2011 byl fingolimod schválený EMA pod názvem Gilenya a byl doporučen ke schválení v EU [53]. Nyní je patentováno několik způsobů výroby fingolimodu. Tato diplomová práce se zabývá jedním z nich za použití hydrogenace [54].

Díky klinickým fázím výzkumu se objevily další možnosti využití fingolimodu a to při léčbě leukémie [55] a léčbě chronických virových infekcí [56].

3.3 Hydrogenace

Jedna z možností přípravy fingolimodu je hydrogenace. Právě ta byla použita při optimalizaci stupně výroby, kterým se diplomová práce zabývá.

Hydrogenace je jednou z nejpoužívanějších redukčních metod v organické chemii. Je založena na působení elementárního vodíku se sloučeninou [57]. Jedná se o exotermní reakci, při které se uvolňuje reakční teplo vzniklé zánikem dvojných vazeb. Rychlost hydrogenace je relativně pomalá. Je tomu proto, že k aktivaci molekul se musí přerušit intramolekulární vazby. K přerušení vazeb v homogenní fázi je nutná vysoká energie. Proto se využívají katalyzátory, které tuto aktivační energii snižují [58]. Podle typu katalyzátoru a pro dosažení vysoké konverze se hydrogenace provádí při různých teplotách a tlacích.

Podle toho v jaké fázi se katalyzátor vůči reaktantu vyskytuje, rozdělujeme hydrogenace na heterogenní a homogenní [59]. Průmyslově se převážně realizují reakce heterogenně katalyzované, stejně jako při výrobě fingolimodu. Jako katalyzátory se při heterogenní hydrogenaci používají tři skupiny látek [60].

3.3.1 Rozdělení katalyzátorů

Kovy, kde jejich hydrogenační aktivita roste v pořadí $Fe < Cu < Co = Ni < Pt < Pd$.

Oxidy kovů - ZnO , Cr_2O_3 , MoO_3 , WO_3 - jejich aktivita je mnohem nižší než u katalyzátorů kovových a přijatelných rychlostí se docílí teprve při vysokých teplotách. Při kterých by kovové katalyzátory ztrácely svoji aktivitu.

Sulfidy – WS_2 , MoS_2 , NiS - jejichž hydrogenační aktivita je mnohem nižší než u kovových katalyzátorů.

Většina hydrogenačních katalyzátorů je schopna po chemisorpci molekul vodíku katalyzátory disociovat a připravit velmi reaktivní atomy vodíku. Průmyslové katalyzátory se používají většinou ve formě, kdy aktivní složka je nanášena na inertním nosiči (Al_2O_3 , aktivní uhlí, křemelina, zeolity). Nejpoužívanějším typem kovového katalyzátoru je pro homogenní kapalnou fázi Raney-nikl. Pro práci v kapalně fázi se používají katalyzátory práškové, pro

plynnou fází pak katalyzátory ve formě granulí nebo tablet. Samotné použití jednotlivých katalyzátorů je striktně individuální.

Aktivovat vodík mohou v podstatě všechny přechodné kovy, nejvhodnější jsou ale kovy 8. až 10. skupiny periodické soustavy a měď. Ty naplní své ne plně obsazené orbitály elektrony od adsorbovaných molekul. Vzácné kovy obvykle platina a palladium v metalické nebo oxidované formě, které jsou vysoce aktivní, nepotřebují vysoké teploty a tlak. Protože jsou drahé, jsou často nesený na nosiči. Aromáty a alifatické ketony nejsou palladiem redukovány, zatímco platinou ano. Podstatný rozdíl mezi palladiem a platinou je v selektivitě. Parciální a selektivní hydrogenace se spíše uskutečňují na palladiu. Platina je příliš reaktivní a často vede k hydrogenačnímu štěpení.

V případě výroby fingolimodu jsme používali právě první typ katalyzátoru s palladiem na nosiči s aktivním uhlím (viz kapitola 4.4).

Tuto nevýhodu nemá rhenium. To je schopno při teplotách pod 100°C za normálního tlaku redukovat aromatické kruhy a proto se používá k hydrogenaci derivátů pyridinu, chinolinu, pyrolu a furanu. Aldehydy a ketony se hydrogenují na rutheniu. Také aromatické aminy a alkoholy se mohou převést na odpovídající cyklohexanderiváty, bez vzniku vedlejších produktů, za katalýzy rutheniem. Předností ruthenia je také necitelnost vůči sloučeninám síry, která ostatní katalyzátory pasivuje.

Podobně jako platina, také nikl má své široké použití. Ve srovnání s platinou ale musíme použít podstatně vyšší teploty a tlak. Nikl je vhodný pro hydrogenaci acetyleny, alkenů, aromátů, nitrosloúčenin, nitrilů a karbonylových sloučenin. Kobalt má nižší hydrogenační aktivitu než nikl. Kobalt je nejvhodnější pro hydrogenaci nitrilů, protože na rozdíl od niklu se tvoří podstatně méně vedlejších produktů. Železo používáme při syntéze amoniaku. Měď se používá hlavně k hydrogenaci aromatických nitrosloúčenin na aromatické aminy. Díky své nepatrné hydrogenační aktivitě můžeme kontrolovat velmi silnou exotermní reakci $\text{ArNO}_2 \rightarrow \text{ArNH}_2$, takže nedojde k výbuchu. Také nízkotlaká syntéza methanolu používá katalyzátor na bázi mědi.

Vedle výše uvedených metalických katalyzátorů existují také oxidační hydrogenační katalyzátory (chromit mědi, zinku). Hydrogenace definované dvojně vazby v přítomnosti sloučeniny síry se provádí na oxidech Ni, Co, Mo, Al. Tyto oxidy získávají svoji plnou hydrogenační schopnost teprve po nasíření.

3.3.2 Hydrogenační techniky

Při použití techniky je požadovaná maximální konverze a maximální selektivita. Tyto podmínky jsou ovlivněny vedle katalyzátoru teplotou, tlakem, parciálním tlakem vodíku, rozpouštědlem a transportními jevy. Protože se jedná obvykle o silně exotermní reakce, musí být umožněna snadná tepelná výměna. Proto se také často pracuje za nízkého parciálního tlaku vodíku, ať už ve fázi plynné nebo kapalné. Vysokého tlaku je možné použít ve speciálně

upraveném zařízení jako je autokláv. Transportní jevy se ovlivňují povrchem katalyzátoru. V principu lze provést hydrogenaci v kapalně nebo plynné fázi.

Hydrogenace v plynné fázi je málo uskutečňovaná z důvodů potřeby velkého množství energie na zplynění organických substancí. Kromě toho tyto substance často nejsou stabilní a rozkládají se.

Hydrogenace v kapalně fázi se používají pro malotonažní výroby meziproduktů. Do míchaného vsádkového reaktoru se předloží rozpouštědlo, potom katalyzátor ($< 0,1$ mm) v množství 1 - 5% na váhu hydrogenovaného substrátu a následně se vnese substrát. Vodík se zavádí pod míchadlo tryskami. Teplo se odvádí pomocí výměníků. Po skončení reakce se produkt zbaví katalyzátoru například pomocí dekantace a filtrace. Kontinuální způsoby jsou pro velkotonažní výroby. Uskutečňují se buď v suspenzi nebo na pevném loži, kde je katalyzátor umístěn ve formě tabletek, kroužků, přes které je kapalina a vodík kontinuálně přetlácen. Obvykle se jedná o kaskádu tří průtokových míchaných reaktorů [61].

3.4 Analytické metody využité při optimalizaci léčiva

Při výrobě ve farmaceutickém průmyslu patří kapalinová chromatografie - HPLC mezi běžně používané metody. Také při optimalizaci výroby léčiva fingolimodu byla tato metoda použita. Touto metodou probíhala kontrolní měření zjišťující složení sledovaných vzorků.

3.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

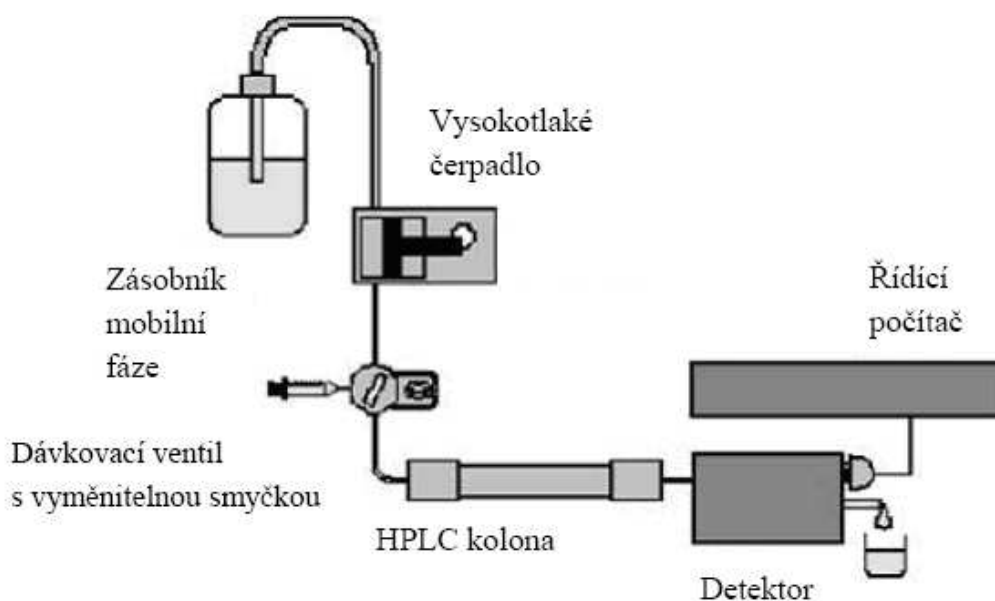
Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních metod, která je založena na separaci složek podle interakce se stacionární a mobilní fází. Je to metoda umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Jsou využity různé mechanismy separace, jako jsou adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontové výměně, molekulově síťovém efektu nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. V případě kolonové chromatografie je k dělení látek použita chromatografická kolona tj. skleněná, ocelová nebo plastová trubice [62].

Díky postupnému rozvoji byly vyvinuty nové vysoce efektivní chromatografické materiály, které umožnily provádět chromatografii za zvýšeného a vysokého tlaku. Vyvinul se typ chromatografie, který se označuje jako HPLC (high performance liquid chromatography), tedy vysokoúčinná nebo též vysokotlaká kapalinová chromatografie. HPLC ovšem neznamenala ve vývoji chromatografie pouze zvýšení výkonnosti metody, ale vznikl typ chromatografie na kvalitativně vyšší úrovni než chromatografie nízkotlaká. Přitom principy separace zůstávají stejné jako u chromatografie nízkotlaké. V kapalinové chromatografii má značný význam také chromatografie na obrácených fázích (*Reversed-Phase Liquid Chromatography* – RPLC), která vyjadřuje, že mobilní fáze je polárnější (např. acetonitril nebo methanol a voda) a stacionární fáze je méně polární (alkylyvázané na silikagel). V

počátcích chromatografie bylo toto uspořádání opačné, mobilní fáze nepolární, stacionární fáze polární. Byl to tzv. systém s normálními fázemi. Dnes je tento systém používán v omezené míře [63]. Retenční časy analytů jsou ovlivněny rozpustností v různě polárních fázích [64].

3.4.2 Jednotlivé prvky a součásti kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zajišťují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, detekci, registraci signálu a vyhodnocování chromatografického záznamu [65]. Je možné doplnit zařízení dalšími prvky např.: termostátové kolonové skříně, ochranné filtry a předkolony, odplyňovače a složky umožňující probublávání heliem atd. Dále je pak možné víceúčelové systémy různě přestavovat, aby co nejvhodněji splňovaly požadovaný účel. Lze kombinovat různé typy detektorů, kolon čerpadel a dalších přídatných zařízení (Obr. 4).



Obr. 4 Schéma kapalinového chromatografu

3.4.2.1 Čerpadla mobilní fáze

Čerpadla patří mezi nejkritičtější zařízení kapalinové chromatografie kvůli zajištění kontinuálního a bezpulzního toku mobilní fáze celým systémem [66]. Z důvodu používání agresivních mobilních fází (pufry, slabé kyseliny a zásady, organická rozpouštědla) je nutné, aby byla konstruována z materiálů odolných vůči korozi. Plynulé dávkování mobilní fáze probíhá při tlaku 30-50 MPa v rozmezích průtoku 0,1-10 ml/min při práci s analytickými kolonami u mikrokolon 0,005 ml/min a pro preparativní chromatografii jsou průtoky 50-100 ml/min. Další podmínky, které musí čerpadla splňovat, jsou kolísání průtoku s odchylkou

menší než 0,5-1% a nejmenší možný vnitřní objem čerpadla kvůli rychlé výměně mobilní fáze. Vzhledem k těmto požadavkům se v současné době používají čerpadla s konstantním průtokem využívající mechanického pohonu pístu v komoře, kde zdrojem hnací síly jsou elektromotory. Podle objemu pístní komory lze tato čerpadla dělit na velkoobjemová a pístová.

Plyn z mobilní fáze je odstraňován v ultrazvukové lázni, nebo pomocí dokonalejšího kontinuálního odplyňování pomocí probublávání vysoce čistým heliem přímo v zásobnících mobilní fáze. V poslední době jsou dostupné i odplyňovače z porézního plastického materiálu umístěné v evakuovaném prostoru.

3.4.2.2 Zařízení pro dávkování vzorků

Dávkování vzorku může být provedeno pomocí různých dávkovacích systémů; nejčastěji jsou používány dávkovací kohout (čtyřcestný nebo šesticestý) nebo autosampler. Základními požadavky jsou vysoká přesnost, správnost a reprodukovatelnost nástřiků.

3.4.2.3 Chromatografické kolony a jejich náplně

Chromatografické kolony jsou zhotoveny převážně z rovných trubic s hladkým vnitřním povrchem. Odolávají tlakům až do 60 MPa. Moderní analytické a preparativní kolony mohou být ve formě vložek z plastických hmot, plněných různými náplněmi. Rozměry kolon závisí na účelu použití a na velikosti částic náplně.

Jako náplně se v dnešní době používají porézní částičky o velikosti zrna 3-10 μm sférického nebo nepravidelného tvaru. Nebo neporézní náplně pro iontovou chromatografii. V systémech s obrácenými fázemi se používá oktadecylsilikagel a oktylsilikagel. Při vyšším pH než 8,5 dochází k částečnému rozpouštění silikagelu, což snižuje životnost kolon. Proto pro práci při vyšším pH byly navrženy náplně na bázi organických gelů. V systémech s normálními fázemi je nejčastěji používaným polárním absorbentem silikagel. Dále se pak používá oxid hlinitý.

3.4.2.4 Detektory

Při detekci separovaných látek se využívají jejich obecné nebo specifické vlastnosti, které je umožní selektivně stanovit. Detektory ve spojení s HPLC by měly mít vysokou citlivost, vysokou selektivitu, nízký šum základní linie, rychlou odezvu, široký lineární rozsah, nízký mrtvý objem, možnost použití gradientu a měly by poskytovat informace o struktuře daných analytů.

Fotometrické detektory pracují na bázi UV/VIS oblasti. Můžeme je rozdělit na:

a) Detektory pracující s jednou vlnovou délkou (253,7 nm), které používají jako zdroje nízkotlakou rtuťovou výbojku opatřenou interferenčním filtrem. U kratších vlnových délek se pak používá zinková nebo kadmiová výbojka. Uspořádání je dvoupaprskové se srovnávací a měrnou celou. Měří se rozdíl absorbance.

b) Druhým typem jsou obdobně pracující detektory, u kterých je možné nastavovat vlnovou délku pomocí vyměnitelných interferenčních filtrů.

c) Polychromatickým zdrojem záření, monochromátorem a průtočnými mikroketami jsou vybaveny další detektory. Tyto detektory umožňují volit libovolnou vlnovou délku od 190 do 600 nm.

d) Spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení chromatografické separace jsou většinou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiod. Spektrofotometrický detektor ve spojení s HPLC, patří k nejpoužívanějším postupům v analýze léčiv. Je relativně jednoduchý, spolehlivý a lze jím detekovat velký počet látek, kompatibilně s gradientovou elucí. Základním požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce nastavené na detektoru. Detektor pracuje v ultrafialové a viditelné oblasti. Může mít pevnou vlnovou délku (254 nm). U složitějších detektorů je možné nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejší detektor může proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek pomocí diodového pole (*Diode Array Detector* - DAD). Jeho detekční limit je až $10^{-10} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, citlivost a selektivita je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu [67].

Princip metody **flurimetrických a fosforimetrických** detektorů je založen na tom, že látky s určitými funkčními skupinami (luminofory) v cele detektoru absorbují budící ultrafialové záření a jeho pohlcená energie se zčásti vyzáří ve formě luminiscenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce) než má záření excitační. Intenzita emitovaného záření je pak měřena fotonásobičem.

Třetí nejčastěji používané detektory, které slouží k detekci látek schopných elektrochemické detekce, jsou **elektrochemické detektory**. Ampérometrické (polarografické) detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné (oxidovatelné) látky průtokovou celou s elektrodami. Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou. Dále se používají tuhé elektrody jako uhlíková, platinová a měděná. Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou.

Refraktometrické detektory měří odezvu úměrnou rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (mobilní fáze) v referenční cele. Detektory jsou velice závislé na teplotě a jako nespecifické detektory jsou méně citlivé.

Vodivostní detektory měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami (platinovými), na něž je vkládáno střídavé napětí, aby nedocházelo k polarizaci. Tyto detektory jsou vhodné pro detekci iontových látek.

Reakční detektory využívají vhodné reakce analyzovaných látek s reakčním činidlem. V průtočném mikroreaktoru probíhá kontinuálně reakce, která musí být dostatečně rychlá. Reakčními produkty jsou deriváty do jejichž molekul jsou zavedeny funkční skupiny, které absorbují záření v UV oblasti (fluoreskují). Jsou schopny redukčně oxidačních reakcí nebo dávají látkám iontový charakter. Výstup z mikroreaktoru je pak připojen k některému z uvedených detektorů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje, zařízení, software

4.1.1 Výroba fingolimodu - vývojová část

- ❖ Váhy Acculab ATILON; Sartorius group, Německo
- ❖ Skleněný duplikovaný reaktor o objemu 3L, HWS Labortechnik Mainz, Německo
- ❖ Autokláv o objemu 5L/ 90 bar; VSK Pardubice, ČR
- ❖ Filtr čočkový nerezový 0,5L; Sartorius GmbH, Německo
- ❖ Skleněný duplikovaný reaktor o objemu 5L; HWS Labortechnik Mainz, Německo
- ❖ Skleněný filtr s deskou DZ 170N; HWS Labortechnik Mainz, Německo
- ❖ Vakuová sušárna JP Selecta Heated vacuum desiccator “Vacuo-Temp”, Španělsko
- ❖ Běžné laboratorní vybavení chemické laboratoře

4.1.2 Výroba fingolimodu - výrobní část

- ❖ Váhy – Precia Molen I 100-S, I 200-B; Precia CZ, ČR
- ❖ Skleněný duplikovaný reaktor 25L včetně sestavy: chladič, jímka, membránové čerpadlo, CIP systém; SkloChem Spol, ČR
- ❖ Autokláv nerezový o objemu 20L/50 bar, MU odvodušnění; VPS Chlumec s.r.o., ČR
- ❖ Filtr čočkový duplikovaný, nerez, 10L; VSK Pardubice, ČR
- ❖ Pojistný mobilní filtr, housing; Sartorius GmbH, Německo
- ❖ Finální skleněný duplikovaný reaktor 25L včetně sestavy: chladič, jímka, membránové čerpadlo, CIP systém; SkloChem Spol, ČR
- ❖ Míchaná jímka 10L; s filtrem na kapaliny (Pall), SkloChem Spol, ČR
- ❖ Filtr mobilní 30L; VSK Pardubice, ČR
- ❖ Odsávací jímka 50L; SkloChem Spol, ČR

4.1.3 Analytická část - Kapalinová chromatografie

- ❖ Kapalinový chromatograf, Shimadzu HPLC, Prominence LC 20A
 - Čerpadlo LC - 20 AD Prominence: dvoupístové, zdvihový objem cca 10 µl, rozsah tlaku 10 - 400 bar, materiál v kontaktu s mobilní fází Hastalloy, teflon, PEEK, Kalrez, KelF
 - Detektor SPD - 20A Prominence: deuteriová lampa o rozsahu 190 - 700 nm, vstup a výstup z cely: SUS316 kapilára 0.8mm/ 0.25 mm ID
 - Vakuový degasser DGU-20A₃: napájení 24 V
 - Kolonový termostat CTO-20AC Prominence: rozsah teplot - laboratorní teplota minus 10 °C až 85 °C
 - Autosampler SIL-20A Prominence: velikost nástřiku 0.1 - 100 µl (standardně), možno do 2000 µl, přesnost nastavení po 0.1 µl, do 2000 µl po 1 µl
- ❖ Filtry Cronus syringe filters, PTFE, 13 mm, 0,45 µm
- ❖ Filtry LUT Syringe filters LUT, PTFE, 13mm, 0,22µm
- ❖ Běžné laboratorní vybavení analytické laboratoře
- ❖ Kolona Phenomenex Gemini, NX 3u C18 110A, 150 x 4,60 mm, 3 µm

4.1.4 Analytická část - ostatní

- ❖ Mikroskop Helago B-600; HELAGO-CZ s.r.o. ČR
- ❖ Analyzátor vlhkosti HG53; Mettler Toledo, Španělsko
- ❖ pH metr InoLab WTW series; Nameko, ČR

4.1.5 Software pro zpracování a prezentaci dat

- ❖ Microsoft® Office Word 2007, Microsoft Corporation, USA
- ❖ Microsoft® Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA
- ❖ Adobe® Photoshop® CS2 9.0, Adobe, USA
- ❖ LC solution, Shimadzu USA

- ❖ DeltaV, Emerson ČR
- ❖ Software Optikam Vision (OPTIKAM PRO 3, OPTIKAM PRO 5)

4.2 Použité chemikálie a standardy

4.2.1 Rozpouštědla

- ❖ Ethylacetát; CHEM Logistic s.r.o Pardubice, ČR
- ❖ Metanol; Brenntag CR, ČR
- ❖ Metanol Chromasolv, obsah 99,9% pro HPLC; Sigma-Aldrich, Německo
- ❖ Toluén; Brenntag CR, ČR

4.2.2 Chemikálie a jiné materiály

- ❖ 2-propanol; INCHEMA s.r.o., Praha, ČR
- ❖ Acetonitril; PENTA, Chrudim, Česká Republika
- ❖ Hydrogen uhličitán sodný; Sigma-Aldrich
- ❖ Chlorid sodný; INCHEMA s.r.o., Praha, ČR
- ❖ Chlorovodík v 2-propanolu 28%; Propuštěno Synthron Blansko, ČR
- ❖ Katalyzátor 10% Pd/C Type 39 Paste (56% H₂O)113076; Aldrich, AlfaAesar, Evonik, Degussa, Johnson Matthey
- ❖ Kyselina dusičná; Synthesia, a.s. Pardubice, ČR
- ❖ Kyselina chloristá; Sigma-Aldrich
- ❖ Kyselina chlorovodíková; Sigma-Aldrich
- ❖ Kyselina maleinová; Sigma-Aldrich
- ❖ Kyselina mravenčí; Sigma-Aldrich
- ❖ Kyselina paratoluensulfonová; Sigma-Aldrich
- ❖ Kyselina sírová; Synthesia, a.s. Pardubice, ČR

- ❖ Kyselina trihydrogenfosforečná; Synthesia, a.s. Pardubice, ČR
- ❖ M/1104 Nitrofungotriol; Propuštěno Synthon Blansko, ČR
- ❖ Methoxid sodný v methanolu; Sigma-Aldrich
- ❖ Uhličitan sodný; Sigma-Aldrich

4.2.3 Technické plyny

- ❖ Dusík 4,6; Linde technoplyn a.s., ČR
- ❖ Vodík 6,0; Linde technoplyn a.s., ČR

4.2.4 Použití standardy

- ❖ Primary reference material – Fingolimod hydrochloride M.Wt. 343,93; Reeval date 11-2015 Synthon

4.3 Analytické metody (metodika HPLC)

4.3.1 Zařízení a metody měření HPLC

Analýza standardů fingolimodu a vzorků fingolimodu byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Obr. 5). Analýza byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini, NX 3u C18 110A, 150 x 4,60 mm, 3 μm pomocí kapalinového chromatografu.



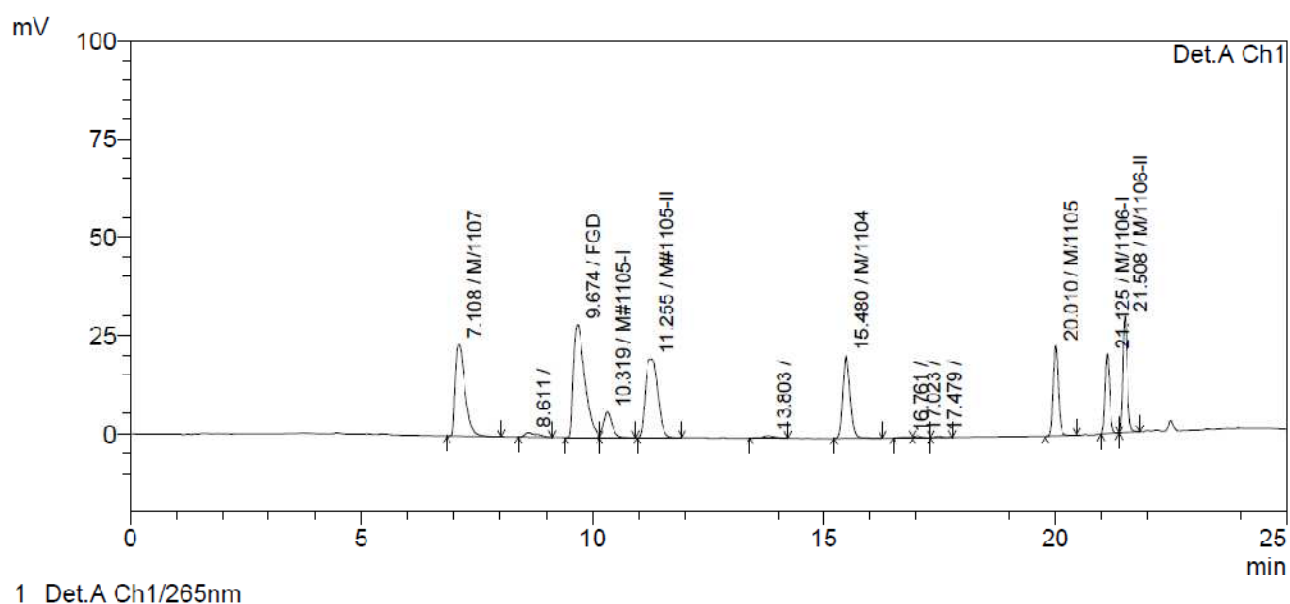
Obr. 5 Kapalinový chromatograf Shimadzu HPLC, Prominence LC 20A

4.3.2 Podmínky a parametry měření HPLC

- ❖ mobilní fáze: methanol
- ❖ před kolona: SecurityGuard Cartridge C18, 4x3.0 mm (Phenomenex)
- ❖ nástřik: 10 μ l
- ❖ průtok MF: 100 μ l/min
- ❖ teplota kolony: 30 °C
- ❖ vlnová délka: 265 nm
- ❖ délka analýzy: 25 min
- ❖ izokraticky: methanol

4.3.3 Postup měření HPLC

Během probíhající hydrogenace byly odebírány kontrolní vzorky, které umožnily sledovat průběh konverze výchozích látek na produkt během hydrogenace. Vzorky byly vyhodnoceny na základě předem nastříknutého standardu (Obr. 6). Dle retenčních časů byly označeny a integrovány sledované veličiny. Podle rozlohy jednotlivých píků byl v procentech stanoven interní obsah sledovaných veličin. Pomocí vyhodnocení pak byla řízena délka hydrogenace. Podrobné průběhy konverze včetně grafů jsou uvedeny ve výsledcích každého pokusu.



PeakTable

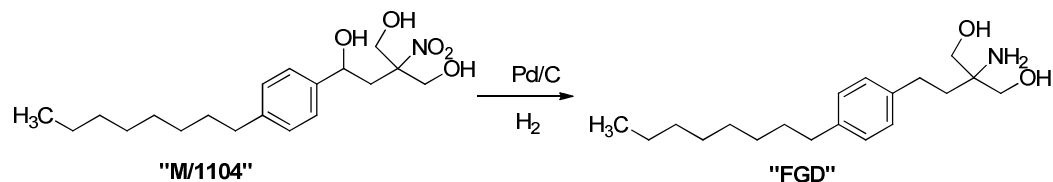
Detector A Ch1 265nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	M/1107	7.108	334664	16.223
2		8.611	18863	0.914
3	FGD	9.674	492048	23.853
4	M#1105-I	10.319	79318	3.845
5	M#1105-II	11.255	371588	18.013
6		13.803	8743	0.424
7	M/1104	15.480	236754	11.477
8		16.761	2182	0.106
9		17.023	3830	0.186
10		17.479	2504	0.121
11	M/1105	20.010	170313	8.256
12	M/1106-I	21.125	139907	6.782
13	M/1106-II	21.508	202129	9.799
Total			2062841	100.000

Obr. 6 Standard pro měření fingolimodu metodou HPLC

4.4 Návrh postupů pro výrobu fingolimodu na pilotní jednotce

Výzkum generického fingolimodu, který měl být vyvinut a vyroben na pilotní jednotce, byl prováděn na výzkumném pracovišti R&D. Princip syntézy fingolimodu byl založen na hydrogenaci nitrofinetriolu (M/1104) vodíkem v přítomnosti katalyzátoru palladia, kyseliny a rozpouštědla (Obr. 7). Hydrogenace měla probíhat při optimalizaci ve vývoji v 5L a ve výrobě ve 20 L autoklávu (Obr. 8, 9).



Obr. 7 Zjednodušené schéma syntézy FGD.

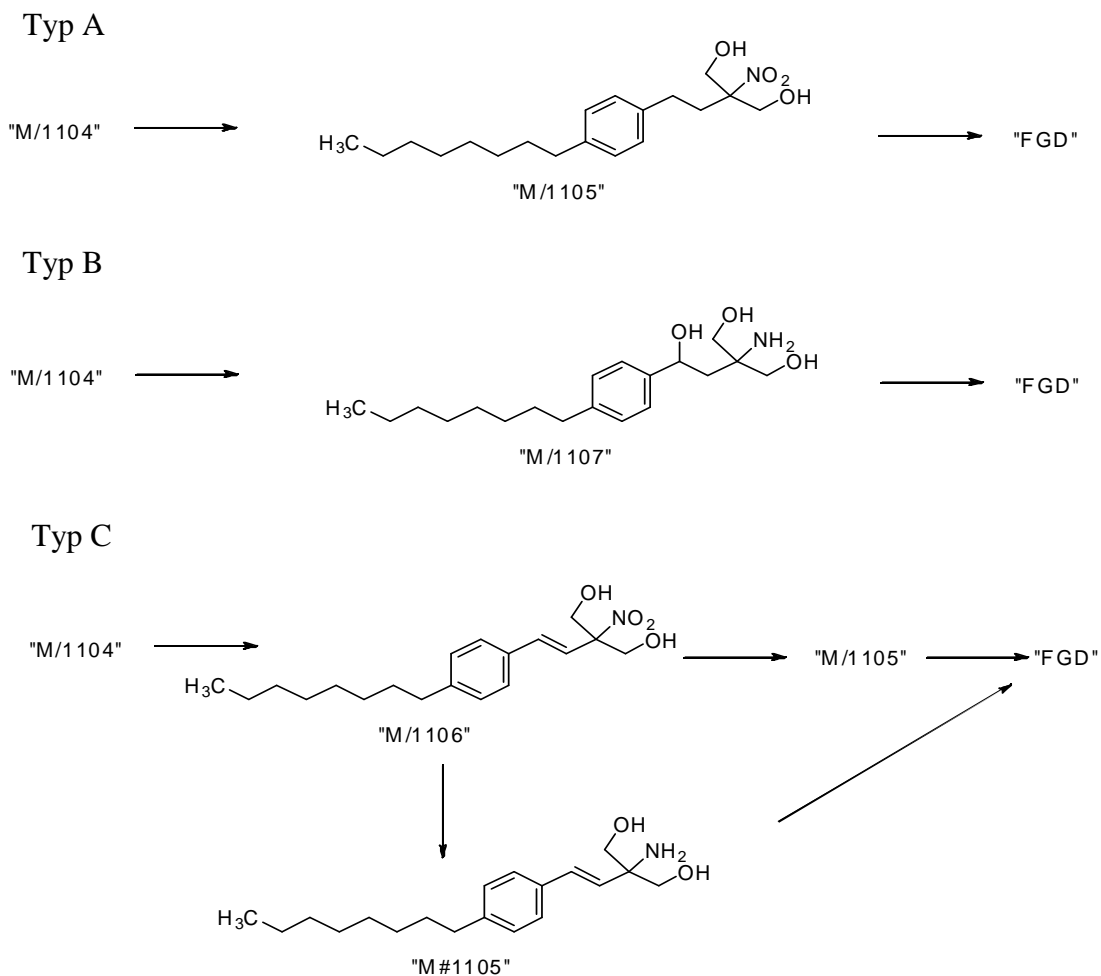


Obr. 8 Autokláv o objemu 5L, ve kterém probíhala optimalizace fingolimodu



Obr. 9 Autokláv o objemu 20L, ve kterém probíhala výroba fingolimodu

Po předání technologie k vývoji bylo určeno několik parametrů a podmínek přípravy. Ty byly definovány výběrem jedné ze tří možných typů cest (Obr. 10).



Obr. 10 Zjednodušené reakční mechanismy vytypovaných cest ověřených ve výzkumu

Každá cesta pak měla dále upřesněné podmínky pro průběh reakce (Tab. 4). Upřesněno bylo použité rozpouštědlo a kyselina.

Tab. 4 Podrobně sledované cesty výzkumem

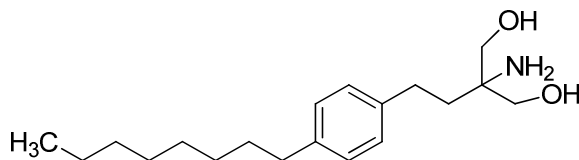
	Mezistupeň	Rozpouštědlo	Kyselina
Typ A	M/1105	methanol	PTSA
			kyselina chlorovodíková
Typ B	M/1107	methanol	kyselina mravenčí
			kyselina octová
			kyselina maleinová
			kyselina chlorovodíková
			kyselina trihydrogenfosforečná
Typ C	M/1106	toluen	PTSA
	M#1105		kyselina sírová

Dále byl vývojem vybrán pro své vlastnosti a cenu katalyzátor 10% Pd/C Type 39 Paste (56% H₂O) 113076 Johnson Matthey [68]. Množství katalyzátoru bylo určeno jako 0,05 až 0,08 molární na množství na jeden mol nitrofinogtriolu M/1104.

Dle těchto podkladů dodaných výzkumem byl vytvořen postup pro vývoj a optimalizaci výroby.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Výroba generického léčiva fingolimod byla vícestupňová. Výchozí látkou pro výrobu výsledného produktu - aktivní látky hydrochlorid fingolimodu (FGD. hcl) byl nitrofingotriol (M/1104). Z nitrofingotriolu byl v prvním stupni připraven fingolimod (FGD). Po následné rekrystalizaci fingolimodu (FGD) vznikl produkt hydrochlorid fingolimodu (FGD. hcl). Právě příprava fingolimodu (FGD) z nitrofingotriolu (M/1104) je stupněm výroby, který byl cílem optimalizace výroby a kterému se věnuje diplomová práce (Obr. 11).



Obr. 11 Fingolimod [69].

Fingolimod (FGD) byl připravován hydrogenací benzylické hydroxyskupiny a nitroskupiny nitrofingotriolu (M/1104). Hydrogenace byla prováděna při kyselé katalýze za přítomnosti různých kyselin: kyseliny p-toluensulfonové, kyseliny maleinové, kyseliny dusičné, kyseliny chloristé a za přítomnosti syčeného chlorovodíku v isopropanolu.

Během vývoje metody výroby byly sledovány různé podmínky a nastavení, které by byly pro výsledný výtěžek a čistotu nejvhodnější. Mezi tyto podmínky patřila: teplota, tlak, otáčky, pH, množství katalyzátoru, vliv rozpouštědla a čistota zařízení.

Za účelem snadné manipulace a nízkých ztrát výtěžku bylo usilováno provést hydrogenaci v jednom zařízení, a to v autoklávu. Pro nemožnost provedení bylo ovšem nutné hydrogenaci rozdělit na dvě fáze, přičemž jedna probíhala v reaktoru a druhá v autoklávu.

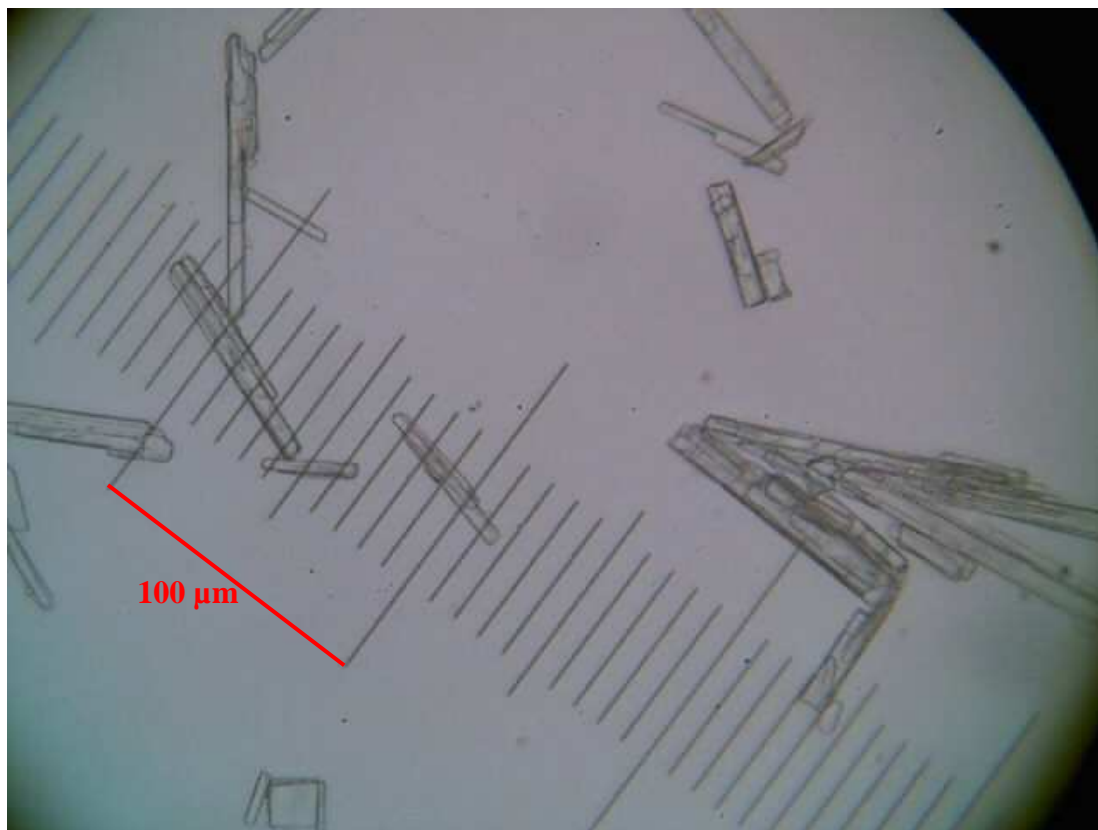
5.1 Optimalizace výroby fingolimodu

Cílem optimalizace byla výroba fingolimodu v požadované čistotě $\geq 98,00\%$ a v maximálním možném výtěžku. Při předávání technologie k optimalizaci výroby bylo vyzkoušeno několik postupů přípravy fingolimodu (Kapitola 4.4 Návrh postupů pro výrobu fingolimodu na pilotní jednotce). Jako nejvhodnější pak byla výzkumem R&D uvedena kyselé katalýza za přítomnosti minerálních kyselin. Zcela nejlepších výsledků pak bylo dosaženo za přítomnosti kyseliny sírové a trihydrogenfosforečné. Tyto postupy byly bohužel neuskutečnitelné, kvůli možnosti vzniku genotoxických nečistot, jejichž hodnoty znečištění jsou u léčiv nepřijatelné. U ostatních testovaných kyselin byl průběh reakce pomalejší a byl zde i nižší stupeň konverze. Samotný systém byl pak citlivý na aktivitu použitého katalyzátoru.

Vzhledem k tomu, že docházelo k hydrogenaci dvou funkčních skupin (benzylické hydroxy skupiny a nitroskupiny), byl postup hydrogenace složitější. Dle různě definovaných podmínek bylo možné získat různé meziprodukty (Obr. 10). Jako nejvýhodnější byla výzkumem určena cesta typu A, která byla následně ve vývoji vyzkoušena (viz kapitola 4.4). Z výsledků optimalizace (viz kapitola 5.1.1) vyplývá, že výroba touto cestou není efektivní. Proto byly testovány další metody postupu za použití různých kyselin, podmínek a jiných průběhů reakcí než cestou typu A. Ty jsou podrobně popsány v následujících kapitolách.



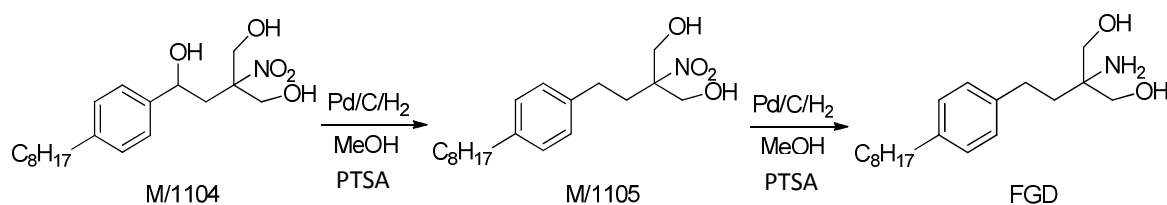
Obr. 12 Krystaly fingolimodu



Obr. 13 Jehlicovité krystaly fingolimodu mikroskopicky zvětšeny 192 x 133

5.1.1 Hydrogenace v autoklávu za přítomnosti p-toluensulfonové kyseliny a cesty typu A

Pokus byl připravován dle technologie výzkumu pomocí cesty typu A v kyselém prostředí kyseliny p-toluensulfonové přes meziproduct nitrofungodiol (M/1105) na fingolimod (FGD) (Obr. 14). Použití kyseliny chlorovodíkové, která byla ve výzkumu také zkoušena v rámci cesty typu A, nebylo podle technologie možné a to kvůli jejím korozivním vlastnostem a možnosti poškození autoklávu. Použití jiného zařízení nebylo kvůli vysokému tlaku možné.



Obr. 14 Schéma hydrogenace pomocí cesty typu A v přítomnosti PTSA

Optimalizace byla zkoušena v autoklávu o objemu 5L, který se svojí konstrukcí a vlastnostmi co nejvíce podobá 20L autoklávu používanému při výrobě. Z pokusů provedených ve výzkumu R&D bylo známo, že nečistoty nejvíce vznikají při hydrogenaci v autoklávu. Proto bylo záměrem optimalizovat podmínky průběhu reakce. Kvůli hydrogenaci

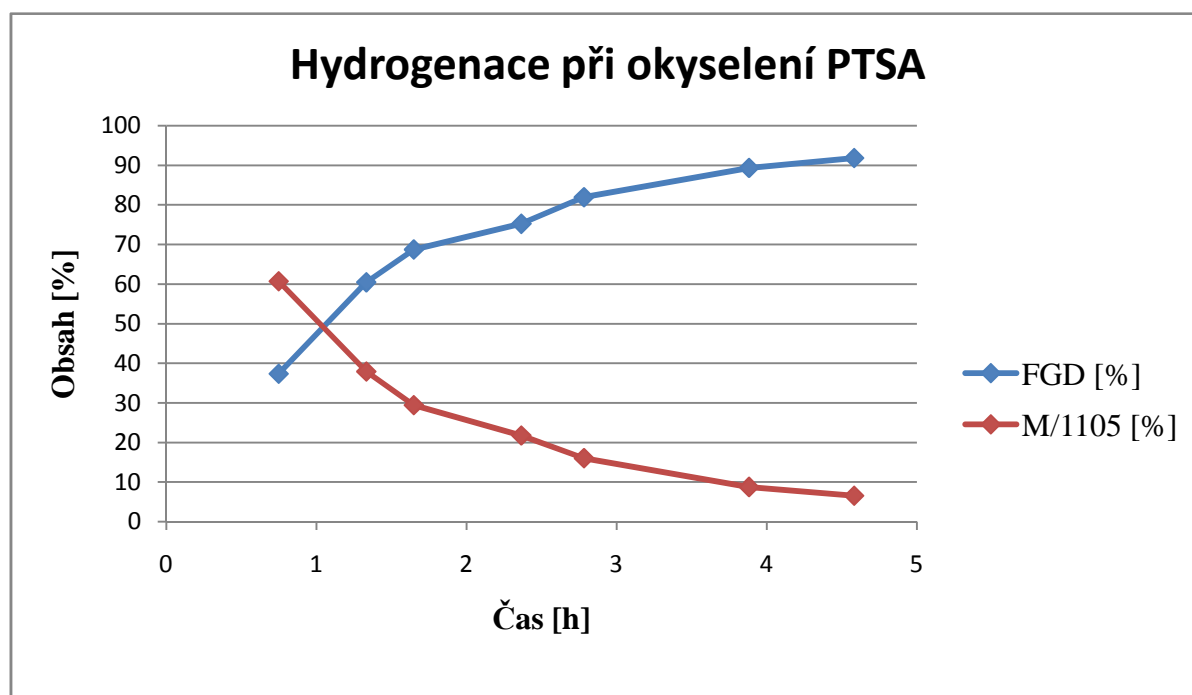
za vysokého tlaku vodíku a vysokému riziku vzniku nečistot se jednalo o fázi kritickou. Proto byl na optimalizaci v autoklávu kladen velký důraz.

Při redukci s p-toluensulfonovou kyselinou bylo nasazeno: 140 g M/1104, 68,9 g PTSA, 20 g katalyzátoru Pd/C (to je 0,05 molární množství katalyzátoru vůči M/1104) a 3000 ml MeOH. Podmínky nastavení autoklávu byly: p= 4000 kPa, T= 70 °C, otáčky = 650 rpm. Za těchto podmínek byla spuštěna reakce.

Průběh reakce byl monitorován díky odebrání vzorků během hydrogenace. Ty pak byly vyhodnoceny pomocí HPLC a zaneseny do tabulky 5 a grafu 1. Rychlá konverze M/1104 na meziprodukt M/1105 umožnila sledovat pomocí HPLC pouze konverzi M/1105 na produkt FGD.

Tab. 5 Výsledky rychlosti konverze hydrogenace M/1105 na produkt FGD

Čas [h]	0,75	1,33	1,65	2,37	2,78	3,88	4,58
FGD [%]	37,3	60,4	68,7	75,2	81,9	89,3	91,8
M/1105 [%]	60,7	37,9	29,4	21,7	16,0	8,7	6,5



Graf 1 Znázornění množství M/1105 a FGD v průběhu hydrogenace

Hydrogenace byla ukončena po necelých pěti hodinách, kdy množství M/1105 pokleslo pod hranici 7%, která byla původním záměrem.

Po ukončení hydrogenace byla provedena filtrace reakční směsi na filtru s křemelinou. Získaný roztok byl zahuštěn do sucha. Dále bylo 123,74 g (FGD+PTSA) rozpuštěno v 939 ml demi vody (pH 5). Směs byla ohřáta na 60 °C a míchána. Poté bylo přidáno 136 g nasyceného roztoku uhličitánu sodného na pH 7. Následovaly tři extrakce pomocí 3 x 600 ml ethylacetátu,

kdy spodní vodná fáze byla opětovně extrahována. Po ukončení extrakcí byly organické fáze smíchány a vypírány třikrát nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Dále byl roztok vysoušen pomocí přesyceného roztoku solanky a to ve dvou praních. Organické fáze po praní se solí byla zahuštěna oddestilováním na 2/3 množství. Následovala krystalizace, izolace a sušení produktu.

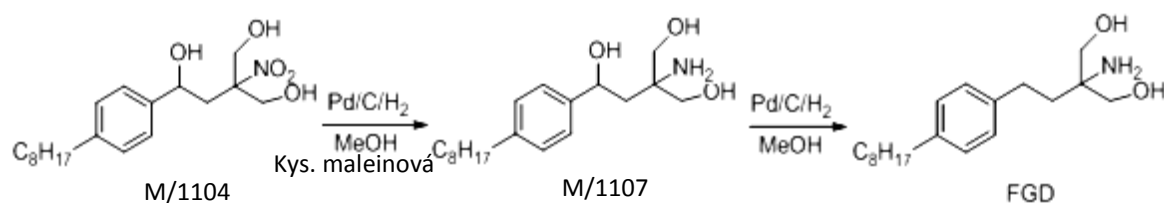
Po adjustaci suchého krystalu, byl stanoven výtěžek fingolimodu na 71,8%. Tento výtěžek by byl přípustný, kdyby odpovídal i předepsané čistotně, která pro výstup FGD byla $\geq 98,00\%$. Náš vzorek ovšem po změření na síranový popel obsahoval na 9,34% nečistot. Celková čistota byla jen 82,42%. Zasolení bylo možné odstranit promytím vodou a následnou rekrystalizací za ztráty 15% FGD [70]. Po takto zvoleném čištění se nám podařilo čistotně dosáhnout jen 92,1% čistoty. Celkový výtěžek pokusu po přečištění byl 56,2% a pohyboval se na samotné hraně výtěžnosti.

Dalším problémem pak byla analytická část. Kvůli použití PTSA a možnosti vzniku sulfoesterů, které vykazují podobně jako zmiňované kyseliny genotoxicitu, bylo nutné zavést dodatečné měření pomocí LC/MS a ověření pomocí NMR. Tyto metody měření by dokázaly, že se sulfoestery v produktu nevyskytují. Vývoj a validace měření by však byly časově a finančně náročné a mohly by ohrozit celý projekt [71]. Pro tyto důvody a výše uvedené problémy se hydrogenace v autoklávu za přítomnosti p-toluensulfonové kyseliny a cesty typu A nevybrala k optimalizaci výroby.

Z uvedených důvodů byly pak uskutečněny další pokusy. Při nich kyseliny, u kterých vznikají genotoxické nečistoty, nebyly již dále používány.

5.1.2 Redukce v autoklávu za přítomnosti kyseliny maleinové

Podle výsledků výzkumu byl vybrán postup pomocí cesty typu B za redukce s kyselinou maleinovou (Obr. 15). U cesty B byl meziproduktem fingolimol (M/1107).



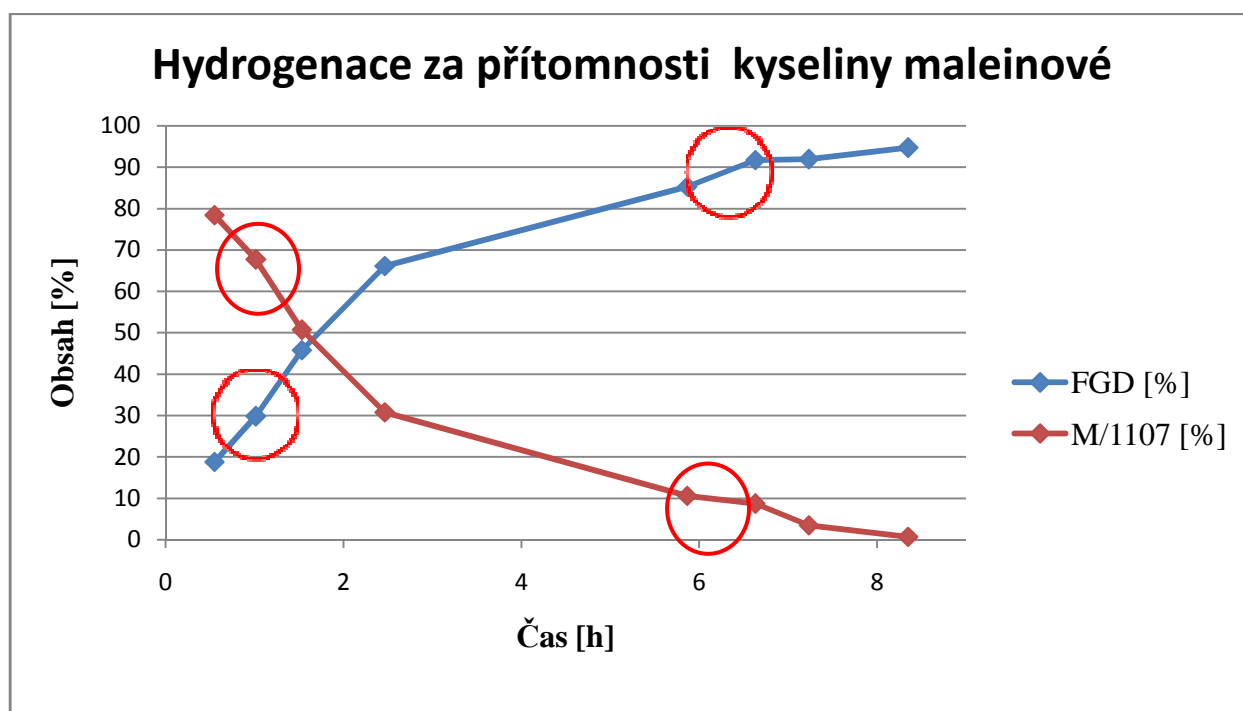
Obr. 15 Schéma hydrogenace pomocí cesty typu B za přítomnosti kyseliny maleinové

Původní násada byla shodná až na kyselinu jako u předešlého postupu. Kyseliny maleinové bylo u druhého pokusu použito 128 g. Podmínky pro nastavení autoklávu byly: p= 4000 kPa, T= 100 °C, otáčky = 1200 rpm. Průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC (Tab. 6). Z důvodu malé regrese bylo po jedné hodině hydrogenace přidáno 20 g palladium/C. Množství katalyzátoru tak bylo navýšeno na dvojnásobné. Konverze M/1107 na FGD byla urychlena, ale ani toto množství nestačilo k úplné hydrogenaci M/1107 na FGD. Proto byl

katalyzátor po výsledcích pátého odběru navýšen na trojnásobné množství 60 g. S tímto množstvím katalyzátoru pak byla hydrogenace ukončena po téměř osmi a půl hodinách. Obě doplnění katalyzátoru jsou znatelné i ve výsledcích (Grafu 2).

Tab. 6 Výsledky rychlosti konverze hydrogenace M/1107 na FGD u cesty typu B

Čas [h]	0,55	1,02	1,53	2,47	5,87	6,63	7,23	8,35
FGD [%]	18,8	29,8	45,8	66,1	85,3	91,7	91,9	94,7
M/1107 [%]	78,4	67,7	50,7	30,8	10,6	8,7	3,5	0,7



Graf 2 Znárodnění rychlosti konverze M/1107 na FGD s označením změny rychlosti vlivem přidání katalyzátoru

Po ukončení hydrogenace byla provedena separace katalyzátoru na filtru s křemelinou. Filtrát byl zahuštěn na 1/3 objemu. Ke směsi bylo přidáno 150 g Na_2CO_3 a 1164 g DEMI vody (pH 7,5) a mícháno při teplotě 40°C. Vznikla bílá suspenze, která byla nejprve pomocí ethylacetátu rozpuštěna a při teplotě 60 °C extrahována pomocí 3 x 600 ml ethylacetátu jako u předešlého pokusu. Dále byla směs vypírána pomocí hydrogenuhličitanu sodného a vysoušena solankou. Následovalo zahuštění, krystalizace, izolace a sušení stejně jako v předchozím pokusu

Výtěžek reakce byl 71,4% o čistotě suchého krystalu 97,71%. Negativní stránkou pokusu byly pro výrobu extrémní podmínky a nutnost trojnásobného navýšení katalyzátoru. Ten celkově prodražoval daný postup a to tak, že cena za katalyzátor by byla přibližně rovna ceně vyrobeného produktu. Získané výsledky tak vedly k nutnosti provedení dalších pokusů, ve kterých byl za obdobných podmínek vyzkoušen jako rozpouštědlo toluen a ethylacetát a

drobně měněny podmínky. Výsledky těchto pokusů byly nevyhovující. Docházelo buď k nedoreagování směsi a to ani po několikahodinovém průběhu, nebo k vysokým ztrátám výtěžku.

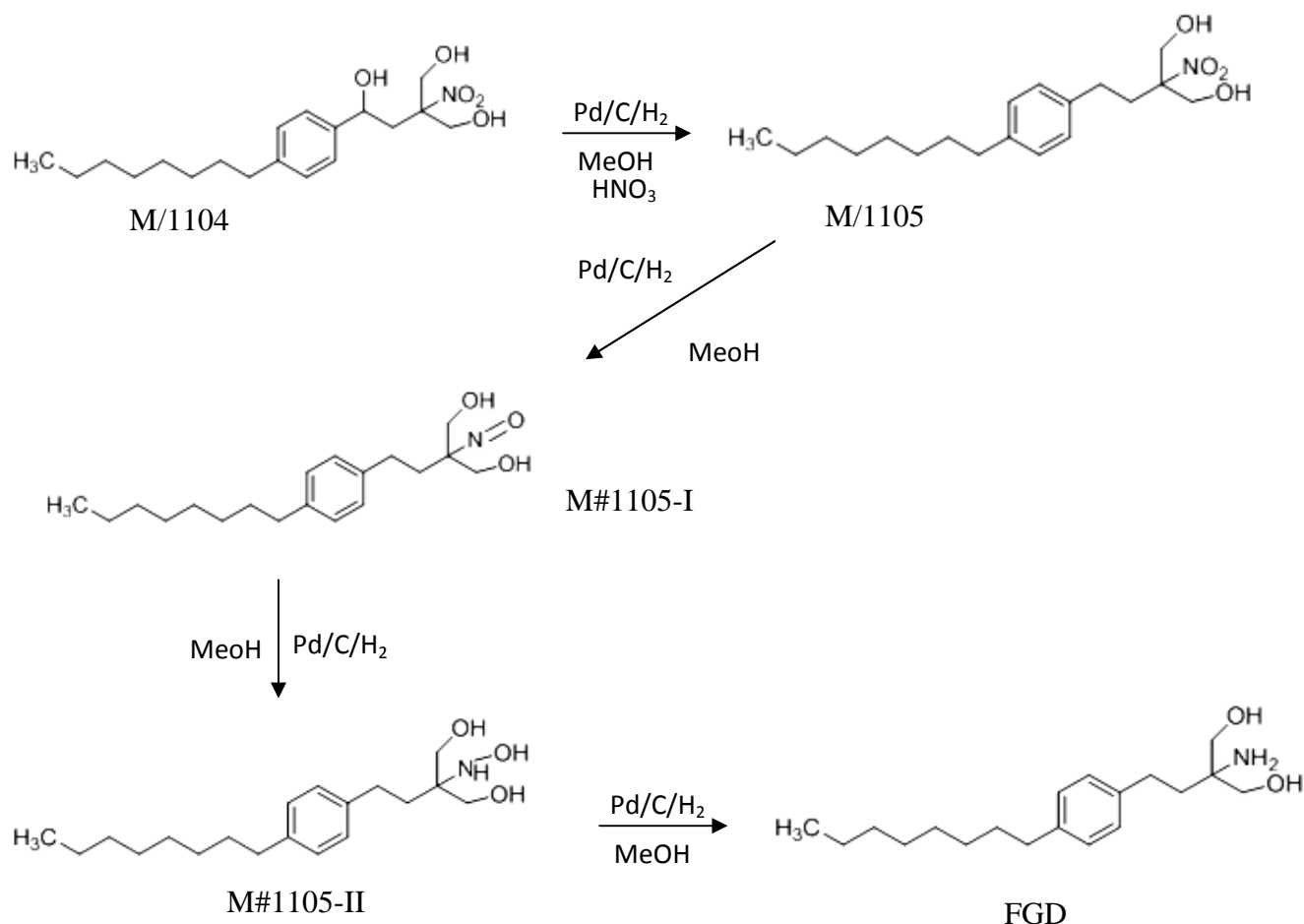
Po výsledcích nespĺňujících požadavky byla navržena cesta nová vycházející z cesty typu A. U této cesty byla hydrogenace rozdělena na dvě fáze.

Při nových postupech, uvedených v dalších kapitolách, byly použity zcela jiné minerální kyseliny než u předešlých pokusů. Pro zavedení nových kyselin bylo nutné provést ověření jejich působení na části aparatury. Jako vyhovující se jevila kyselina dusičná a chloristá.

5.1.3 Hydrogenace M/1104 za přítomnosti kyseliny dusičné

Během postupu byla benzylická hydroxyskupina za laboratorní teploty a mírného přetlaku vodíku pomocí minerálních kyselin dehydratována. Volné místo pak bylo redukováno vodíkem za vzniku příslušného mezistupně M/1105. Tato fáze pak byla označena jako první fáze hydrogenace. Jako druhá fáze hydrogenace byla označena fáze, během které docházelo k redukci nitroskupiny. Ta probíhala katalyticky v neutrálním prostředí za vyššího tlaku vodíku $p = 4000 \text{ kPa}$ a $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$. Během druhé fáze pak z M/1105 vznikl produkt FGD.

Při tomto postupu byly pomocí HPLC prvně detekovány intermediární nitrosoderiváty M#1105-I a M#1105-II, které vznikaly z M/1105 (Obr. 16). Princip přeměny fingolimodu byl vytvořen na základě literárních údajů [72]. Domněnka, že se jednalo právě o nitrosoderiváty, které následně přecházely v produkt FGD, potvrzovala měření HPLC uskutečněné po filtraci katalyzátoru.

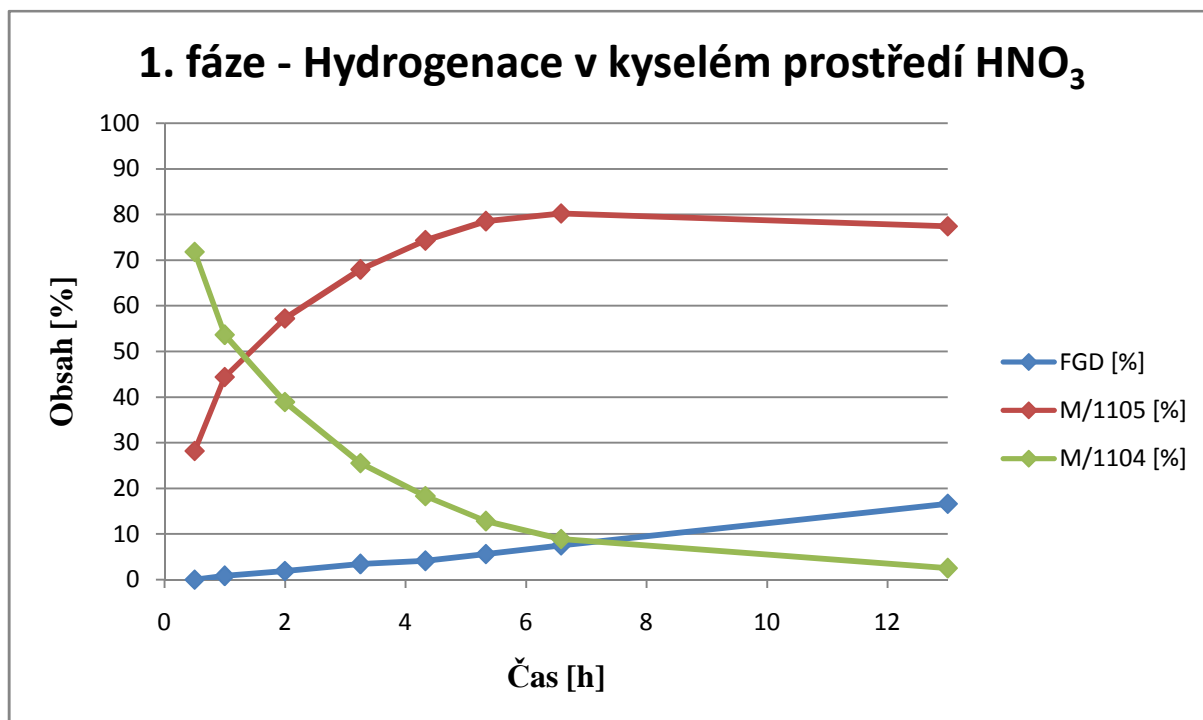


Obr. 16 Předpokládané schéma průběhu reakce přes intermediární nitrosoderiváty M#1105-I a M#1105-II vzniklé z M/1105.

Nově navržený postup byl vyzkoušen s kyselinou dusičnou. Do autoklávu bylo nasazeno 140 g M/1104, 3000 ml MeOH, 20 g palladium/C a 17g 69% kyseliny dusičné. První fáze hydrogenace byla nastavena podle předloženého postupu na $p = 110$ kPa, $T = 25$ °C, otáčky = 900 rpm. Během redukce docházelo k postupnému zvyšování pH z 1 na pH 3,5, které brzdilo celý průběh reakce. Proto probíhalo po každém odebrání vzorku okyselení na pH 1 až 2. Do ukončení hydrogenace tak bylo přidáno dalších 17 g kyseliny. Rychlost 1. fáze hydrogenace byla velmi malá. Ukončena byla na základě výsledků HPLC až po 13 hodinách (Tab. 7), (Graf 3). Ukončení reakce naznačovalo i zvyšování množství FGD, který vznikl z M/1105.

Tab. 7 Výsledky 1. fáze hydrogenace znázorňující rychlost konverze M/1104 na M/1105 s postupnou tvorbou FGD

Čas [h]	0,50	1,00	2,00	3,25	4,33	5,33	6,58	13
FGD [%]	0,0	0,8	1,9	3,4	4,1	5,6	7,5	16,6
M/1105 [%]	28,2	44,4	57,2	67,9	74,3	78,5	80,2	77,4
M/1104 [%]	71,8	53,6	38,9	25,5	18,3	12,8	8,9	2,5

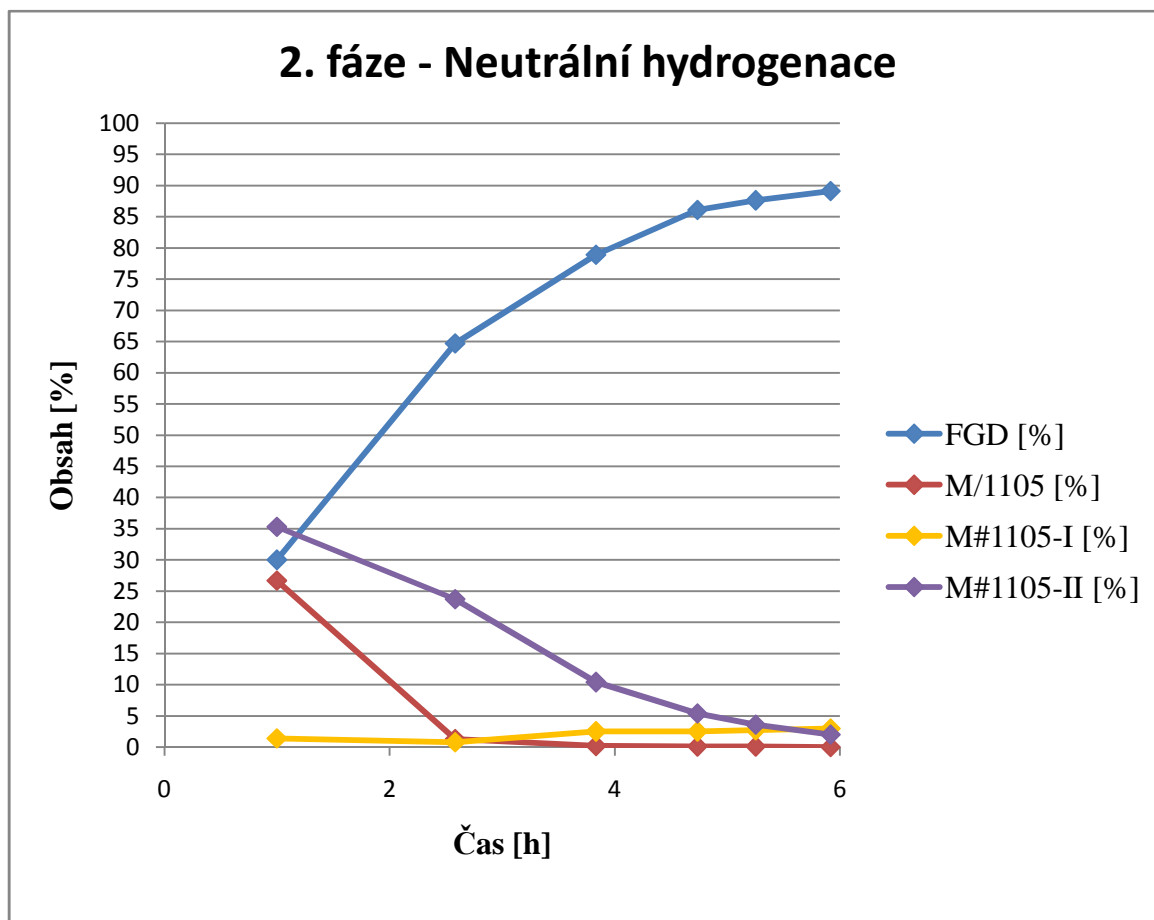


Graf 3 Průběh konverze M/1104 na M/1105 za pozvolného vzniku FGD v kyselém prostředí kyseliny dusičné

Po ukončení 1. fáze byla směs zneutralizována methoxidem sodným a byly nastaveny nové parametry: $p = 3500 \text{ kPa}$, $T = 40 \text{ °C}$ a otáčky = 1100 rpm. Po natlakování a vyhřátí autoklávu bylo pokračováno ve 2. fázi hydrogenace. I tato fáze byla průběžně monitorována pomocí HPLC. Výsledky odebíraných vzorků jsou uvedeny v tabulce 8 a v grafu 4. Z výsledků je možné sledovat intermediární nitrosoderiváty M#1105-I a M#1105-II, které vznikají z M/1105 za postupného vzniku FGD. Dále se pak objevuje neznámá nečistota v retenčním čase 16. až 17. minuty a nečistota M/1107.

Tab. 8 Průběh 2. fáze hydrogenace

Čas [h]	1,00	2,58	3,83	4,73	5,25	5,92
FGD [%]	30,0	64,7	78,9	86,1	87,6	89,1
M/1105 [%]	26,7	1,3	0,2	0,1	0,1	0,0
M#1105-I [%]	1,4	0,8	2,5	2,5	2,7	3,0
M#1105-II [%]	35,3	23,7	10,4	5,4	3,6	2,0
Nečistota RT 16-17 [%]	1,7	2,0	1,7	1,2	1,1	1,3
M/1107 [%]	0,5	1,1	1,5	1,7	1,7	1,8



Graf 4 Průběh 2. fáze hydrogenace, konverze M/1105 na M#1105-I a M#1105-II a vznik FGD

Po ukončení hydrogenace byl odfiltrován katalyzátor, směs zahuštěna a rozpuštěna v ethylacetátu. Následně byla nastavena krystalizace. Po krystalizaci byl produkt izolován a sušen.

Čistota produktu byla 99,30%. Čistota vzorku ukázala, že krystalizace z ethylacetátu vyčistila krystal FGD od nečistot M/1107 a nečistoty v retenčním čase 16. až 17. minuty pod detekovatelnou hodnotu. Hmotnostní výtěžek tohoto pokusu byl 55%. Nízká výtěžnost byla způsobena vynecháním zahuštění roztoku před krystalizací. Protože ethylacetát fingolimod slabě rozpouští, zůstalo rozpuštěno v matečných loužích 11% produktu. Ten byl izolován zpět po zahuštění a rekrystalizaci louhů.

Pokus poukázal na možnosti další optimalizace. Jediný problém tohoto pokusu byla 1. fáze hydrogenace, její rychlost a nutnost okyselení. Proto bylo od použití kyseliny dusičné při výrobě upuštěno.

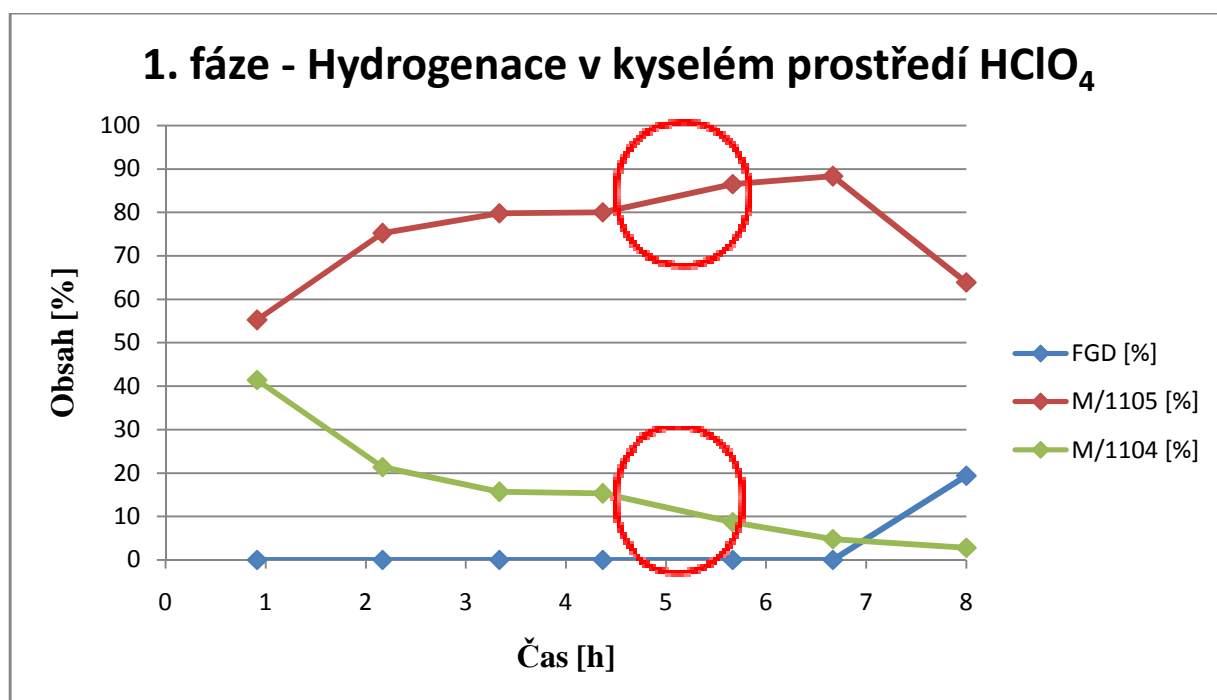
5.1.4 Hydrogenace M/1104 za přítomnosti kyseliny chloristé

Problematická 1. fáze hydrogenace pokusu s kyselinou dusičnou vedla k ověření reakce s kyselinou chloristou. Násada byla obdobná jako u pokusu s kyselinou dusičnou (viz. kapitola 5.1.3). Došlo ke změně kyseliny, které bylo nasazeno 8,13 g a přidáním katalyzátoru na 30 g oproti předešlým 20 g. Během 1. fáze hydrogenace bylo nutné kvůli poklesu pH přidat 1 g kyseliny chloristé.

Dehydrogenace benzylické hydroxyskupiny pomocí kyseliny chloristé probíhala rychleji než u okyselení kyselinou dusičnou, jak bylo patrné z výsledků HPLC (Tab. 9). Podobně jako u předchozího pokusu bylo ale nutné po čtyř o půl hodinách od začátku hydrogenace směs okyselit na pH 1. Toto okyselení je pak vidět i v grafu (Graf 5), kde došlo ke zrychlení konverze. Fingolimod byl na chromatogramu znatelný po celou dobu hydrogenace, ale jeho velikost byla pod detekovatelnou hodnotou 0,05%. Až v závěru 1. fáze je vznik FGD markantní. Hydrogenace byla ukončena po osmi hodinách.

Tab. 9 Obsah směsi v průběhu 1. fáze hydrogenace za přítomnosti kyseliny chloristé

Čas [h]	0,92	2,17	3,33	4,37	5,67	6,67	8,00
FGD [%]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,4
M/1105 [%]	55,2	75,2	79,8	80,0	86,5	88,3	63,9
M/1104 [%]	41,4	21,4	15,7	15,3	8,7	4,8	2,8

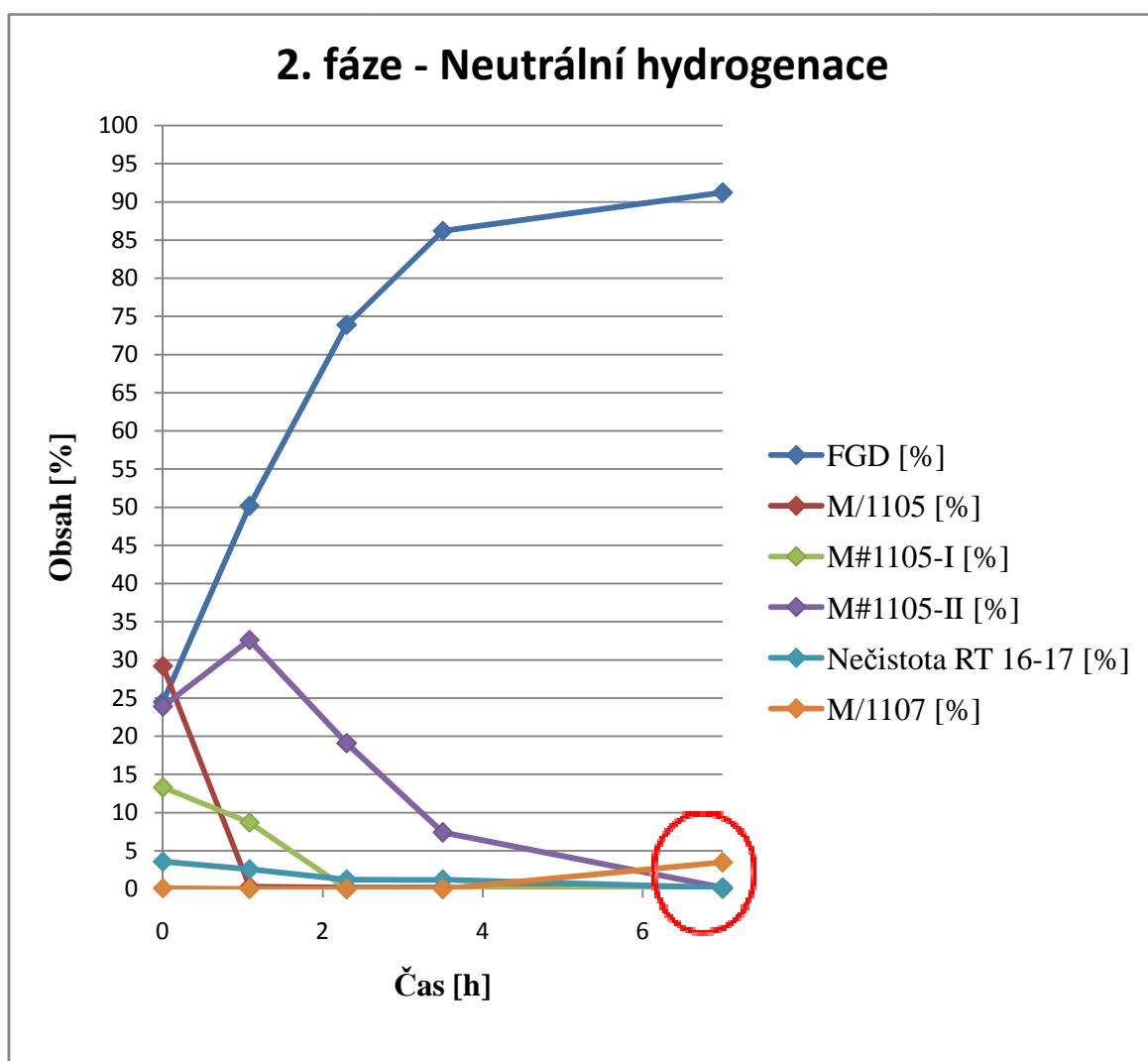


Graf 5 Průběh konverze M/1104 kyselém prostředí kyseliny chloristé

Po neutralizaci směsi methoxidem sodným byly nastaveny podmínky 2. fáze hydrogenace nitro skupiny: $p = 3500 \text{ kPa}$, $T = 40 \text{ °C}$ a otáček = 1100 rpm. Během 2. fáze hydrogenace bylo možné sledovat nitrosoderiváty M#1105-I a M#1105-II, ve které po hodině přešel veškerý meziproduct M/1105. Nitrosoderiváty pak postupně přecházely v produkt FGD (Tab. 10), (Graf 6).

Tab. 10 Průběh 2. fáze hydrogenace za neutrálního prostředí.

Čas [h]	0,00	1,08	2,30	3,50	7,00
FGD [%]	24,5	50,2	73,9	86,2	91,2
M/1105 [%]	29,2	0,3	0,2	0,2	0,2
M#1105-I [%]	13,3	8,7	0,0	0,0	0,0
M#1105-II [%]	23,9	32,6	19,1	7,4	0,2
Nečistota RT 16-17 [%]	3,6	2,6	1,2	1,2	0,2
M/1107 [%]	0,1	0,0	0,0	0,0	3,5



Graf 6 Průběh 2. fáze hydrogenace po neutralizaci kyseliny chloristé s nárůstem nečistoty M/1107 po doregování intermediátů

Po sedmi hodinách byla hydrogenace ukončena. Katalyzátor byl odfiltrován, směs zahuštěna na 1/3 objemu a krystalována. Produkt byl poté separován na filtru a sušen.

Výtěžek produktu byl 57% o čistotě krystalu 95,98%. Největší nečistotou byla M/1107 o obsahu 1,34%, vzniklá na konci hydrogenace. Nárůst M/1107 na konci hydrogenace vedl k závěru ukončovat hydrogenaci kvůli horšímu vyčištění dříve, jakmile je konverze M/1105, M#1105-I a M#1105-II pod 2% obsahu.

Stejný pokus byl pro ověření předešlého pokusu nasazen za stejných podmínek a stejné nasadě. Výsledky dopadly podobně jako v prvním případě. První fáze trvala 6, druhá pak 6,5 hodiny. Výtěžek byl 58,3% o čistotě 96,23%. Nárůstu M/1107 se podařilo předejít rychlejším ukončením.

Ani tento způsob výroby za použití kyseliny chloristé nebyl zvolen pro nízké výtěžky, velkou spotřebu katalyzátoru a časovou náročnost obou fází hydrogenace.

Protože všechny předešlé pokusy, které byly prováděny v jednom zařízení - autoklávu, nesplňovaly požadované cíle efektivní výroby, byl pro následující řadu pokusů zvolen nový způsob výroby. Hydrogenace podle fází byla rozdělena do dvou zařízení. První fáze, při kyselé katalýze za mírného přetlaku, byla hydrogenována ve skleněném reaktoru a 2. fáze, byla provedena za neutrálních katalytických podmínek při vysokém tlaku v autoklávu. Toto rozdělení pak umožnilo v první fázi použít i kyseliny, které působí korozivně na autokláv.

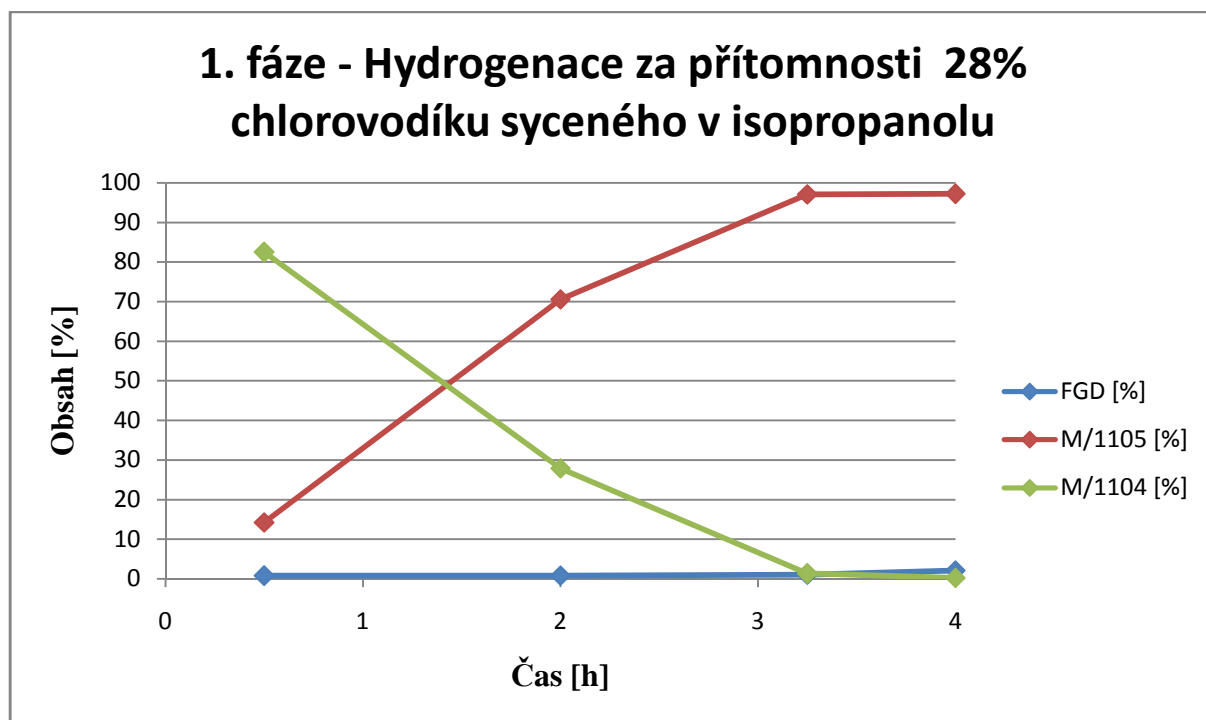
5.1.5 Redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Aby byl usnadněn průběh dehydrogenace benzylické hydroxyskupiny, bylo vhodné použít kyselinu v nevodném prostředí. Jako nejdostupnější se jevil chlorovodík sycený v isopropanolu, který se používá v dalším stupni pro následnou přípravu FGD.hcl.

Laboratorní výsledky ve výzkumu vedly k rozdělení fází hydrogenace do 5L souboru a autoklávu. První fáze byla nasazena do reaktoru 5L souboru o navážce: 140 g M/1104, 3000 ml MeOH, 10 g katalyzátoru Pd/C a 15g 28% HCl v IPA. Parametry nastavení byly: $p = 110 \text{ kPa}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, otáčky = 220 rpm. Průběh 1. fáze hydrogenace byl monitorován HPLC. Po nasazení nového typu pokusu s poloviční nasadou katalyzátoru bylo z výsledků odebraných po půl hodině patrné, že reakce téměř neběží. Proto bylo nutné dopřidat katalyzátor na standardní množství 20 g. S tímto množstvím katalyzátoru pak reakce došla během čtyř hodin (Tab. 11), (Graf 7). Výsledky konverze M/1104 na M/1105 byly nejvyšší z doposud provedených pokusů.

Tab. 11 Průběh konverze za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Čas [h]	0,50	2,00	3,25	4,00
FGD [%]	0,8	0,8	1,0	2,1
M/1105 [%]	14,2	70,6	97,1	97,2
M/1104 [%]	82,5	27,9	1,3	0,2



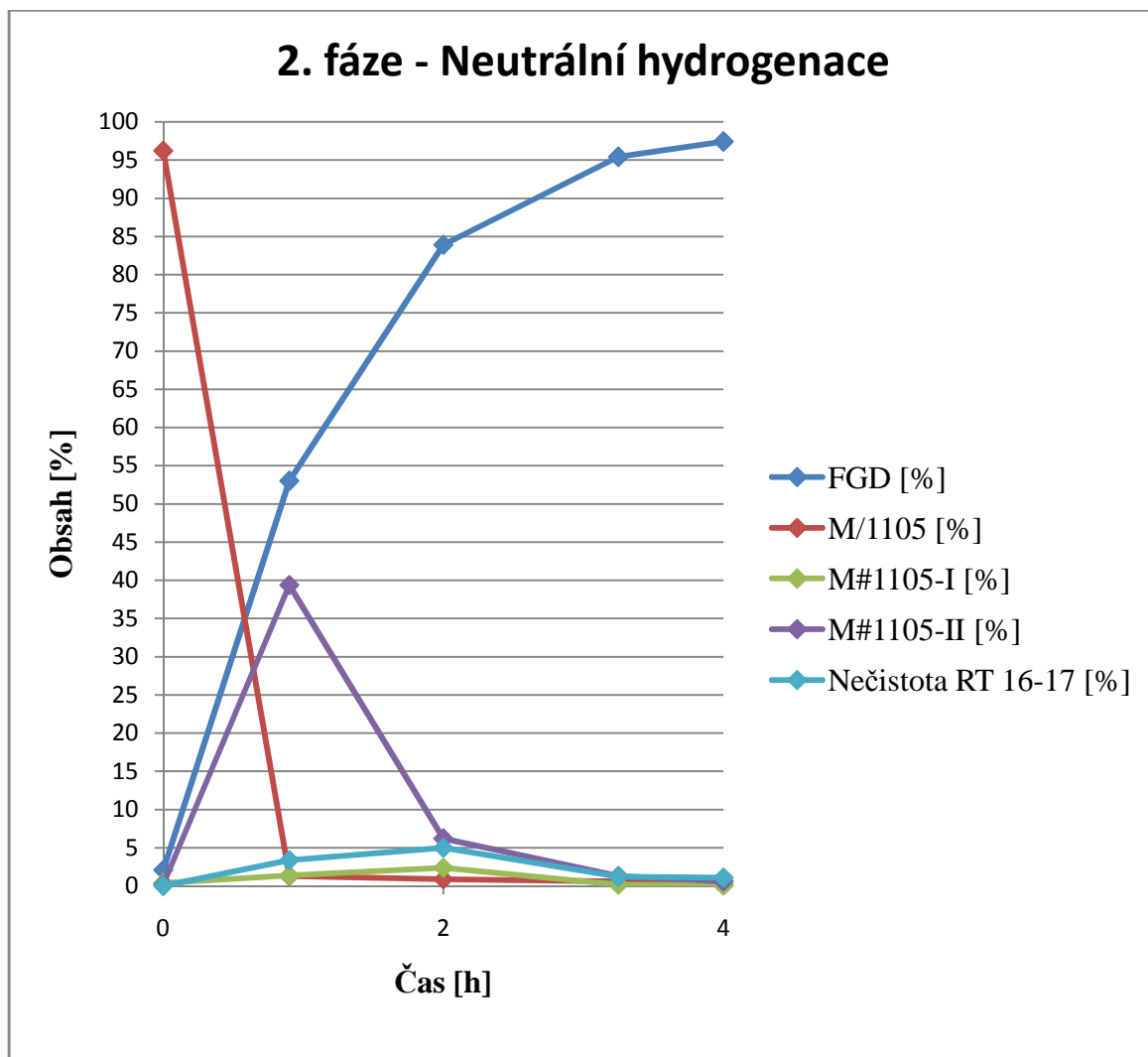
Graf 7 Průběh 1. fáze hydrogenace za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Následovala neutralizace v reaktoru a přetlačení suspenze do autoklávu. Druhá fáze hydrogenace byla nastavena na $p = 3500 \text{ kPa}$, $T = 40 \text{ °C}$ a otáčky = 1000 rpm. Hydrogenace byla monitorována pomocí HPLC.

Výsledky konverze druhé fáze hydrogenace měly stejně jako výsledky první fáze požadovanou kvalitu. Veškará M/1105 byla redukována na FGD bez vzniku nečistot nebo velkých ztrát (Tab. 12), (Graf 8).

Tab. 12 Výsledky 2. fáze hydrogenace

Čas [h]	0,00	0,90	2,00	3,25	4,00
FGD [%]	2,1	53,0	83,9	95,4	97,4
M/1105 [%]	96,2	1,3	0,9	0,6	0,1
M#1105-I [%]	0,4	1,4	2,4	0,2	0,1
M#1105-II [%]	0,2	39,4	6,2	1,3	0,6
Nečistota RT 16-17 [%]	0,0	3,4	5,0	1,2	1,1



Graf 8 Průběh 2. fáze hydrogenace po neutralizaci 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Po ukončení hydrogenace byla směs přefiltrována, zahuštěna a krystalována. Produkt byl následně separován na filtru a sušen. Výtěžek produktu byl 75,2% o čistotě 96,56%. Dobré výsledky v rychlosti a čistotě konverze v první i druhé fázi a vysoký výtěžek a čistota adjustovaného produktu vedly k výrobě fingolimodu právě touto cestou, tedy redukcí M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu. A tento postup byl dále optimalizován.

5.1.6 Optimalizace redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Bylo provedeno devět optimalizačních pokusů, které jsou jednotlivě popsány níže a shrnuty v tabulce 14. Optimalizace 1 probíhala ověřením výsledků předešlého pokusu za stejných podmínek (Tab. 14 - optimalizace 1). Pouze vlivem špatné manipulace došlo ke zpomalení 2. fáze reakce. Ověřené výsledky však určily tento pokus za výchozí bod pro následnou optimalizaci. Hlavními problémy řešenými při optimalizaci v následných pokusech bylo použití velkého množství katalyzátoru a nutnost čištění na požadovanou mez $\geq 98\%$.

Vliv katalyzátoru na průběh reakce byl ověřen v pokusu optimalizace 2, kdy po stejné násadě nebyl katalyzátor aktivován. Další podmínky pak byly nastaveny shodně. Malá rychlost reakce pak dokázala nutnost aktivace katalyzátoru před zahájením reakce. Další pokusy se snížením násady katalyzátou byly provedeny v pokusu optimalizace 4,6 a 7. Tyto pokusy naznačily, že množství nasazeného katalyzátoru pak ovlivňuje rychlost průběhu reakce. Proto bylo ve výsledném postupu používáno optimální množství 0,05 až 0,08 molární množství na 1 mol M/1104.

Problematika čistoty finálního produktu FGD byla řešena pomocí rekrystalizace FGD v různých rozpouštědlech. Rekrystalizace byly provedeny s FGD o čistotě 95,98%, za použití rozpouštědel: methanol, ethylacetát, směs ethylacetát a metanol v poměru 1:1, směs ethylacetát a voda v poměru 5:1 (Tab. 13).

Tab. 13 Výsledky rekrystalizace FGD o čistotě 95,98%

	Čistota rekrystalovaného FGD
Methanol	96,45
Ethylacetát	99,48
Ethylacetát methanol v poměru 1:1	98,23
Ethylacetát voda v poměru 5:1	97,82

Tyto výsledky pak vedly k pokusům optimalizace 3, 4 a 5, ve kterých byl methanol nahrazen ethylacetátem nebo jeho směsí. Protože FGD je v ethylacetátu rozpustné méně než v methanolu, došlo během separace katalyzátoru k významným ztrátám. Tyto ztráty se podařilo částečně zmenšit pomocí vyhřívaného filtru. I tak ale použití ethylacetátu jako rozpouštědla reakční směsi nebylo vhodné. Ve výrobě by došlo k ochlazení směsi ve spojovacím potrubí mezi zařízeními a vypadnutí krystalů. Trasy není možné přehřát a zabránit tak ztrátám.

Protože záměna rozpouštědla nebyla z technických důvodů možná. Muselo dojít ke změně postupu - optimalizace 6. Po odseparování katalyzátoru byla směs zahuštěna do husté míchatelné kaše, která byla naředěna 250 g ethylacetátu, ty byly společně se zbytky methanolu zahuštěny do sucha. Tak bylo provedeno ještě dvakrát. Po oddestilování veškerého methanolu bylo přidáno 750 g ethylacetátu a směs byla za varu rozpuštěna. Následně byla směs krystalována a dál standardně zpracována. Díky krystalizaci z ethylacetátu pak bylo

zjištěno, že krystal není nutné sušit ve vakuové sušárně, ale stačí jej řádně prosát pomocí vakua a dusíku. Tento postup byl ověřen při optimalizaci 8 a 9.

U pokusu optimalizace 7 byl zkoušen vliv pH. To má, jak již bylo zjištěno, v první fázi hydrogenace zásadní dopad na průběh reakce. Pro robustnost postupu byl zkoušen vliv pH ve druhé fázi. U předchozích pokusů bylo pH při vstupu do druhé fáze vždy v rozmezí 6 až 7,5. Proto bylo vyzkoušeno bazické pH o hodnotě 11,5. Bazické pH způsobilo úplné zastavení reakce, kterou nebylo možné zpustit ani následným okyselením na neutrální nebo mírně kyselé pH. Proto byla neutralizace zařazena mezi kritické operace.

Proto byl vybrán optimalizovaný postup 6, který byl dvakrát vyzkoušen při nastavení stejných podmínek - optimalizace 8 a 9.

Tab. 14 Výsledky devíti pokusů optimalizace redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu

Pokus	Rozpouštědlo	Množství katalyzátoru [g]	Doba reakce 1. fáze [h]	Doba reakce 2. fáze [h]	Výtěžek [%]	Čistota [%]	Poznámky
Optimalizace 1	MeOH	20	3	21	74,98	97,06	vliv špatného propláchnutí autoklávu
Optimalizace 2	MeOH	20	18,5	10,5	44,25	98,44	bez aktivace katalyzátoru
Optimalizace 3	EtAc	20	3	1,5	33,89	99,44	ztráty při separaci katalyzátoru
Optimalizace 4	MeOH:EtAc 1:1	10	1,5	6,5	56,14	99,67	ztráty při separaci katalyzátoru
Optimalizace 5	MeOH:EtAc 1:9	20	3,5	4	72,35	99,15	vyhřívaný filtr
Optimalizace 6	MeOH	7,5	5,5	16	82,66	99,71	nový způsob zahuštění
Optimalizace 7	MeOH	15	1,75				vysoké pH ve 2. fázi
Optimalizace 8	MeOH	20	2,5	4	80,25	99,62	nový způsob zahuštění
Optimalizace 9	MeOH	20	3	4	84,78	99,53	nový způsob zahuštění

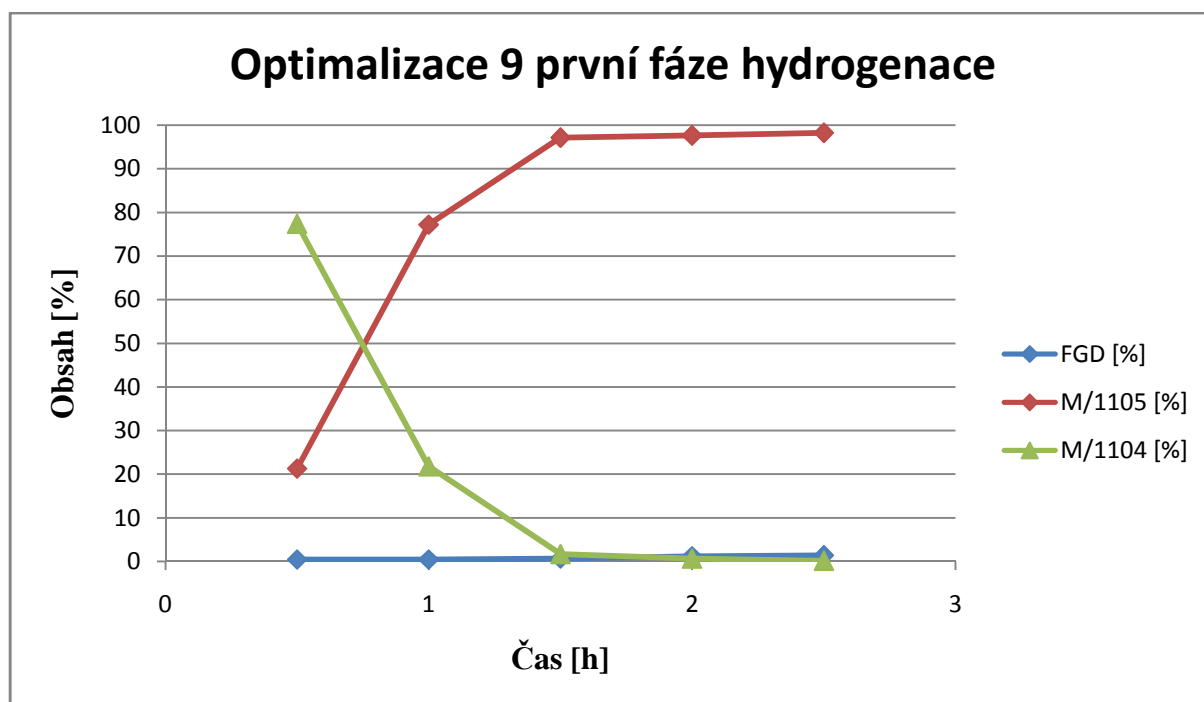
Z tabulky vyplývá, že výsledky pokusů optimalizace 8 a 9 pak byly dostačující k provedení výrobních šarží na pilotní jednotce.

5.1.6.1 Redukce M/1104 za přítomnosti 28% chlorovodíku syceného v isopropanolu za použití postupu optimalizace 9

Po půlhodinových časových intervalech byly odebírány vzorky směsi, ze kterých byl stanoven obsah výchozí látky, meziproductu a výsledného fingolimodu. Konverze proběhla během dvou a půl hodiny, kdy došlo k přeměně výchozí látky v meziproduct. Tím byla uspokojivě provedena první fáze hydrogenace (Tab. 15), (Graf 9).

Tab. 15 Výsledky pokusu optimalizace 9 - první fáze hydrogenace

Čas [h]	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50
FGD [%]	0,5	0,5	0,7	1,2	1,4
M/1105 [%]	21,3	77,2	97,1	97,6	98,2
M/1104 [%]	77,4	21,8	1,7	0,7	0,2

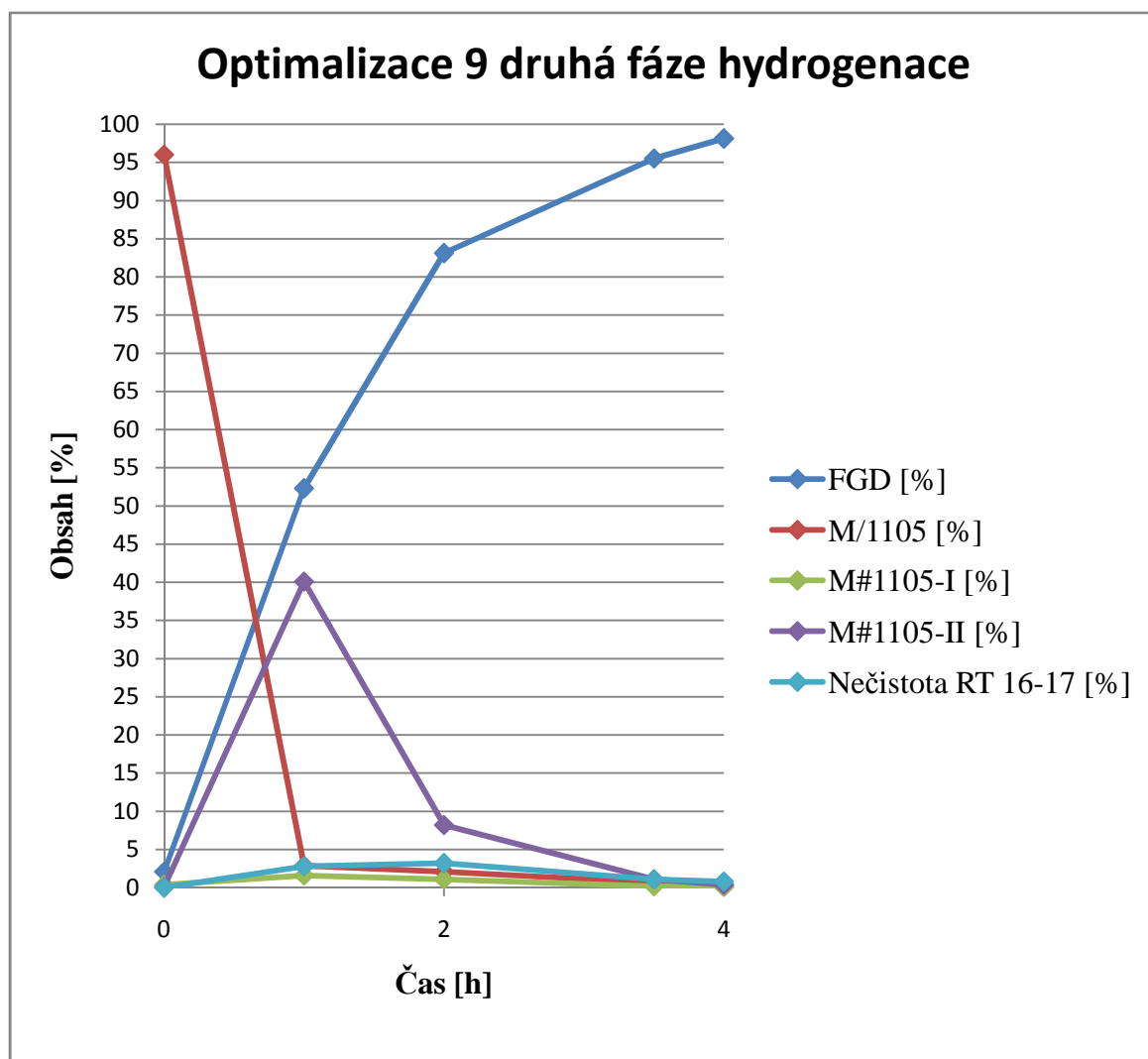


Graf 9 Složení reakční směsi v průběhu pokusu - optimalizace 9 první fáze hydrogenace

Po neutralizaci reakční směsi byla spuštěna druhá fáze hydrogenace. Ta byla ukončena po čtyřech hodinách za vzniku 98,1% fingolimodu (Tab. 16) (Graf 10).

Tab. 16 Výsledky pokusu - optimalizace 9 druhé fáze hydrogenace

Čas [h]	0,00	1,00	2,00	3,50	4,00
FGD [%]	2,1	52,3	83,1	95,5	98,1
M/1105 [%]	96,0	2,9	2,1	0,7	0,2
M#1105-I [%]	0,4	1,6	1,1	0,2	0,1
M#1105-II [%]	0,1	40,1	8,2	1,1	0,4
Nečistota RT 16-17 [%]	0,0	2,8	3,2	1,1	0,8



Graf 10 Složení reakční směsi v průběhu pokusu - optimalizace 9 druhé fáze hydrogenace

Během vývoje byl dále optimalizován vliv otáček, teploty a tlaku. Pokud hodnoty nebyly extrémní, tak neměly na průběh reakce výrazný vliv. Proto bylo pro výrobu ustanoveno toto nastavení pro 1. fázi: tlak 110 kPa teplota 25 až 35 °C a otáčky 220 rpm; pro 2. fázi tlak 3400 - 3800 kPa, teplota 30 až 40 °C a otáčky 1000 rpm.

5.2 Výroba šarží fingolimodu na pilotní jednotce

Podle optimalizovaného postupu byly vytvořeny záznamy o výrobě šarže. Tyto záznamy pak sloužily jako návod pro výrobu pěti šarží na pilotní jednotce (Tab. 17). Výroba proběhla bez závažných problémů. Všechny šarže vyhověly velikostí výtěžku i svojí čistotou. Vyskytly se v ní pouze odchylky v délce trvání první a druhé fáze hydrogenace.

Průběh hydrogenace 1. a 2. fáze byl monitorován HPLC dle předepsaných mezioperačních kontrol IPC. Při výrobě pilotních šarží se vyskytly komplikace způsobené rychlostí průběhu konverze. Odchylka se vyskytla v první fázi hydrogenace u čtvrté šarže. Ve druhé fázi hydrogenace se pak vyskytly odchylky ve třetí a čtvrté šarži. Důvody vzniku odchylek bylo možné pouze předpokládat. Zpomalení průběhu konverze bylo patrně způsobeno vznikem inhibitorů katalyzátoru v zařízení důsledkem nedostatečného vyčištění. To potvrzuje výsledek páté šarže, před kterou bylo zařízení důkladně vyčištěno. Čistota a výtěžek produktu byl monitorován při výstupní kontrole produktu IPMS.

Tab. 17 Výsledky výrobních šarží na pilotní jednotce

Šarže	1	2	3	4	5
Doba reakce 1. fáze [h]	2,0	2,0	2,0	4,5	2,0
Doba reakce 2. fáze [h]	4,0	4,5	9,0	8,0	4,0
Výtěžek [%]	82,43	76,35	77,18	78,01	80,65
Čistota [%]	99,39	99,12	99,82	99,43	99,96

5.3 Optimalizace na základě výsledků výroby

Kvůli třem odchylkám rychlosti konverze v šarži 3 a 4 byl postup vrácen k doplnění. Na základě těchto odchylek byl následně otestován vliv nečistot a množství katalyzátoru na rychlost konverze v pěti pokusech (Tab. 18). Ty byly nasazovány dle stejných parametrů a podmínek jako pilotní šarže. Nečistoty, ačkoliv byly produktem z předchozích pokusů, působily jako inhibitor katalyzátoru a zpomalovaly tím hydrogenaci. U množství katalyzátoru bylo prokázáno, že jeho množství ovlivňuje rychlost reakce. Zvýšení katalyzátoru bylo ekonomicky nepřípustné a jeho snížením byl výrazně prodloužen čas hydrogenace. Proto bylo určeno jako optimální původní stanovené 0,05 až 0,08 molární množství.

Tab. 18 Výsledky vlivu nečistot a množství katalyzátoru na rychlost reakce

Pokus číslo	Množství katalyzátoru [g]	Doba reakce 1. fáze [h]	Doba reakce 2. fáze [h]	Výtěžek [h]	Čistota [%]	Poznámky
1	20	2,25	3,5	75,42	98,35	standardní postup
2	20	4	5	81,42	98,25	vliv znečištění zařízení
3	10+10	2	2,5	78,37	98,91	rozdělení katalyzátoru, neutralizace po separaci katalyzátoru
4	10+10	2	2,5	82,26	99,25	rozdělení katalyzátoru, neutralizace po separaci katalyzátoru
5	10	2	11	80,34	99,51	50% násada katalyzátoru

První z pěti pokusů byl srovnávací s pilotními šaržemi. Po vyhovujících výsledcích byl ověřen vliv nečistot, které zůstaly v zařízení po předchozí šarži. Doba reakce pak prokázala jasný negativní vliv nečistot zvláště v první fázi. Tyto výsledky vedly k nutnosti vyčištění aparatury mezi jednotlivými šaržemi.

Ve třetím pokusu byl vyzkoušen vliv neutralizace na aktivitu katalyzátoru a vliv množství katalyzátoru v první fázi reakce. Pro hydrogenaci byla použita poloviční násada katalyzátoru. Z výsledků je patrné, že tato snížená násada katalyzátoru nezpomalila průběh 1. fáze hydrogenace. Po ukončení první fáze hydrogenace a po odseparování katalyzátoru na filtru byla směs zneutralizována methoxidem sodným. Separovaný katalyzátor byl následně přidán společně s novým katalyzátorem ke směsi a pokus pokračoval standardním způsobem za obsahu plného množství katalyzátoru 20 g. Suspenze byla následně přetlačena do autoklávu, kde byla dále zpracována dle standardního postupu. Výsledky ověřené čtvrtým pokusem vedly k závěru, že průběh neutralizace na aktivitu katalyzátoru nemá vliv. O málo rychlejší průběh reakce 2. fáze hydrogenace byl způsoben přidáním nového katalyzátoru.

Pátý pokus byl nasazen pouze s polovičním množstvím katalyzátoru (10 g Pd/C). Toto množství opětovně potvrdilo rychlý průběh 1. fáze hydrogenace. Druhá fáze trvala úměrně dlouho množství katalyzátoru.

Tato dodatečná optimalizace pak prokázala vliv nečistot na aktivitu katalyzátoru a také prokázala vliv množství katalyzátoru na rychlost průběhu druhé fáze. Tyto poznatky byly zahrnuty do závěrečné zprávy vývojového stupně fingolimod.

5.4 Zvolený způsob výroby fingolimodu

Optimalizace výrobního stupně fingolimod byla zkoušena za kyselé katalýzi pěti různých kyselin. Jako nejvhodnější bylo vybráno prostředí isopropanolu syceného chlorovodíkem. V prvních pokusech bylo zkoumáno, jaké prostředí a podmínky jsou pro výrobu léčiva nejvhodnější.

Pro špatné výsledky pokusů probíhajících v autoklávu bylo nutné rozdělit reakci na dvě fáze ve dvou různých zařízeních. První fáze, ve které probíhala kyselá katalitická hydrogenace benzylické hydroxyskupiny, proto probíhala ve skleněném reaktoru a katalytické hydrogenace nitroskupiny, která probíhala za neutrálních až slabě kyselých podmínek, probíhala v autoklávu. Výsledky pokusu s 28% chlorovodíkem syceným v isopropanolu splnily požadavky na čistotu a výtěžek. Tento postup byl následně dále optimalizován.

Během optimalizace provedené při devíti pokusech zmíněným vyhovujícím postupem s 28% syceným chlorovodíkem v isopropanolu byl zkoušen vliv rozpouštědla, pH, otáčky, teplota, tlak vodíku a množství katalyzátoru při hydrogenaci (viz kapitoly 5.4.1 až 5.4.6).

Závěrem lze naznačit další možné postupy zefektňující výrobu léčivé látky. Nebyla ověřena možnost regenerace katalyzátoru a jeho opakovatelné využití. Dále nebylo podrobněji vyhodnoceno využití matečných louhů, ve kterých se ztrácelo přibližně 5% vyráběné látky.

5.4.1 Rozpouštědla zvolená pro výrobu fingolimodu

Reakce byla nasazena do methanolu, ve kterém proběhly obě fáze hydrogenace. Po ukončení hydrogenace a separaci katalyzátoru na filtru byla směs zahuštěna a převedena do ethylacetátu. Ten vykazoval nejlepší výsledky čistoty krystalu, a proto z něj byla provedena krystalizace.

5.4.2 Zvolené pH pro výrobu fingolimodu

Pro hydrogenaci, v jejíž první fázi probíhala redukce v kyselém prostředí, bylo nutné zjistit, jaký vliv na průběh reakce má pH. Aby reakce probíhala v první fázi, bylo nutné z důvodu principu reakce udržovat kyselé pH 1 - 2. V přítomnosti minerální kyseliny v bezvodém prostředí a za přítomnosti mírného přetlaku vodíku, docházelo k dehydrataci benzylické hydroxyskupiny a následné hydrogenaci bez vzniku dvojnásobné vazby. Ve druhé fázi, probíhající v autoklávu, bylo nutné pH zvýšit. Při optimalizaci byl vyzkoušen vliv pH i při druhé fázi. Kyslejší prostředí by mohlo ohrozit zařízení, proto bylo zkoušeno pH bazické (viz kapitola 5.1.6 - optimalizace 7). Bylo stanoveno pH 6 - 7,5, při kterém byl průběh druhé fáze standardní.

5.4.3 Otáčky zvolené pro výrobu fingolimodu

Během optimalizace byl zkoušen také vliv otáček. V první fázi hydrogenace v reaktoru byly otáčky optimalizovány tak, aby směs byla dobře míchaná a docházelo ke snadnému kontaktu aktivovaného katalyzátoru s nitrofinogotriolem (M/1104). Otáčky byly nastaveny na 220 rpm při použití vrtulového typu míchadla. Ve druhé fázi hydrogenace v autoklávu byly otáčky nastaveny podle možností zařízení na 1000 rpm.

5.4.4 Teplota zvolená pro výrobu fingolimodu

V první i druhé fázi byla hydrogenace slabě exotermní. V první fázi hydrogenace byla teplota udržována v rozmezí 25 - 35 °C, kdy na základě použití katalyzátoru byla tato teplota optimální. U hydrogenace ve druhé fázi pak byla teplota 30 - 40 °C. U teploty kolem 40 °C byla rychlost hydrogenace mírně větší. Vyšší teplota než 40 °C ale inhibovala katalyzátor, který ke konci hydrogenace výrazně snížil svoji aktivitu a nedocházelo k doreagování veškerého nitrofinodiolu (M/1105) na fingolimod. Příliš vysoká teplota společně s vysokým tlakem by pak umožnily nechtěnou hydrogenaci aromatického kruhu.

5.4.5 Tlak zvolený pro výrobu fingolimodu

V první fázi byl v reaktoru udržován pouze mírný přetlak o výšce tlaku 110 kPa. Vyšší tlak z hlediska použití zařízení nebyl možný. U druhé fáze hydrogenace byl podle výsledků optimalizace a možností zařízení tlak nastaven na 3400 - 3800 kPa. Velmi důležité bylo dobré propláchnutí zařízení inertním plynem a následně dobré natlačení vodíku tak, aby nezůstal polštář těžšího inertního plynu nad hladinou a znemožňoval tak vstup vodíku do systému. Snadnější vstup vodíku do směsi byl umožněn díky velkými otáčkami míchadla a dávkování vodíku pod hladinu směsi. U autoklávu byl snadnější vstup umožněn použitím dutého míchadla s rozvodem vodíku pod hladinu pomocí trysek.

5.4.6 Množství katalyzátoru zvolené pro výrobu fingolimodu

Během optimalizace byl mimo předešlé parametry zkoumán vliv množství katalyzátoru na rychlost průběhu reakce. Množství katalyzátoru bylo zkoušeno na 0,05 až 0,08 molárním množství vůči nitrofinogotriolu (M/1104). Protože množství katalyzátoru pro svou vysokou cenu výrazně ovlivňovalo výslednou cenu léčiva, byla snaha o jeho maximální snížení. Během optimalizace se však ukázalo, že 0,05 molární množství (při pokusech 20 g) je minimální.

6. ZÁVĚR

V diplomové práci jsou popsány a shrnuty všechny pokusy vedoucí k optimalizaci výroby léčiva fingolimodu. Práce se zabývá nejprve samotným významem výroby fingolimodu. Vysvětluje průběh nemoci roztroušené sklerózy, její dnešní léčbu a vývoj moderních léčiv. Podrobně se pak věnuje fingolimodu a jeho účinku v klinických fázích. Protože je při optimalizaci výroby fingolimodu využita katalytická hydrogenace, jsou v práci podrobněji rozebrány katalyzátory a jejich využití. Hlavní metodou měření obsahu fingolimodu během optimalizace byla kapalinová chromatografie, která je v této práci také podrobněji popsána.

V experimentální části práce je pak uvedena metodika měření HPLC. Dále je v této části popsán návrh postupů pro výrobu fingolimodu, který byl vytvořen na oddělení výzkumu R&D.

Pomocí tohoto návrhu byl v kapitole „Výsledky a diskuze“ shrnut a objasněn postup vhodný pro výrobu na pilotní jednotce. Ten byl rozdělen podle způsobu hydrogenace do dvou fází. Po nasazení definovaného množství výchozí látky nitrofungotriolu (M/1104) do reaktoru a přidání methanolu s katalyzátorem bylo nutné katalyzátor aktivovat. Po té byla směs okyselená pomocí 28 % chlorovodíku v isopropanolu a dobře propláchnutý reaktor byl natlačen na tlak 110 kPa. Byly nastaveny podmínky o teplotě 25 - 35 °C a otáčkách 220 rpm. Tím byla zahájena první fáze hydrogenace. Po konverzi výchozí látky v meziprodukt nitrofungodiol (M/1105) byla směs zneutralizována a přetlačena do autoklávu, kde byly podmínky teploty 30 - 40 °C a otáčky 1000 rpm. Propláchnutím a natlakováním takto nachystaného autoklávu byla spuštěna druhá fáze hydrogenace. Po konverzi meziproductu ve fingolimod byla hydrogenace ukončena. Katalyzátor byl separován na filtru a směs byla jímána do čistého reaktoru. V tomto reaktoru pak probíhalo zahuštění methanolu a převod směsi do ethylacetátu, ze kterého byl produkt krystalizován. Po izolaci byl produkt promyt a sušen prosáváním na filtru. Po adjustaci byl suchý krystal dále zpracován. Pro úplnost je celá práce doplněna tabulkami a obrázky. Výsledky průběhu reakcí jsou znázorněny také ve formě grafů.

Výsledný postup předaný pro výrobu léčiva je pak shrnut v závěrečné kapitole, ve které jsou také zmíněny další možnosti zefektivnění výroby.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. HERNDON, R., M.; Multiple sclerosis: Immunology, Pathology and Pathophysiology, Demos medical publishing, USA, 2003.
2. ADACHI, K.; CHIBA, K.: FTY720 Story. Its Discovery and the Following Accelerated Development of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Agonists as Immunomodulators Based on Reverse Pharmacology. *Perspect Medicin Chem.* 2007; 1: 11–23.
3. MAHOVSKÝ, A.; Protokol pro procesní validaci FGD na PP stupeň fingolimod, Synthron 2011.
4. CAMPBELL, N., A., REECE, J., B.: *Biologie*, Computer Press, a.s. 2008.
5. ROSATI, G.; The prevalence of multiple sclerosis in the world:an update. *Neurological sciences*, svazek 22, číslo 2, 2011, pp. 117-139.
6. COMPSTON, A.; COLES, A.; Multiple sclerosis. *Lancet*, duben 2002, roč. 9313, čís. 359, pp. 1221-31.
7. LUBLIN, FD.; REINGOLD, SC.: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, duben 1996, roč. 4, čís. 46, pp. 907–11.
8. FEIT, J. et. al.: *Atlas patologie pro studenty medicíny*, Masarykova univerzita Brno, 2010.
9. PASCUAL, A., M., MARTÍNEZ-BISBAL, MC., BOSCÁ, I. et. al.: Axonal loss is progressive and partly dissociated from lesion load in early multiple sclerosis. *Neurology*, červenec 2007, roč. 1, čís. 69, s. 63–7.
10. KRISHNAMOORTHY, G. et. al.: Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nature Medicine* 15, 2009, pp. 626 – 632.
11. PÖLLINGER, B. et. al.: Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *The journal of experimental medicine*, JEM vol. 206 no. 6, 2009, pp. 1303-1316.
12. MARRIE, R., A.: Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*, prosinec 2004, roč. 12, čís. 3, s. 709–18.
13. VACHOVÁ, M.: Éra nových léků v terapii roztroušené sklerózy, *Neurologie pro praxi*, 10 2009, pp. 305-308.

14. MAREŠ, J.: Monoklonární protilátky v léčbě roztroušené sklerózy. *Sanquis*, 59, 2008, pp. 58.
15. CAMMACK, E. et. al.: Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition. Oxford university press, 2006.
16. PILZ, G. et. al.: Modern multiple sclerosis treatment? What is approved, what is on the horizon. *Drug Discovery Today*, 13, 2008, pp. 1013-1025.
17. BEDNÁŘOVÁ, M., Standartní operační postup při registraci léčiv v ČR na základě předpisů SUKL, Interní dokumentace, Synthron, 2000.
18. KING, R., C. et. al.: Dictionary of Genetics, Seventh Edition. [s. l.]: Oxford University Press, 2006.
19. COYLE, P., K., HAMMAD, M., A.: General background: Atlas of multiple sclerosis. 1st ed. London: Science Press, 2003, pp. 1 - 15.
20. SIMPSON, B., S., COLES, A., J.: Rationale for cytotoxic Monoclonal Antibodies in MS, *Int MSJ*, 14, 2007, pp. 48 - 56.
21. SCHIPPLING, S., MARTIN, R.: Spotlight on Anti-CD25; Daclizumab in MS, *Int MSJ*, 15, 2008, pp. 94 - 98.
22. WAUBANT, E.: Spotlight on Anti-CD20. *Int MSJ*, 2008;15; pp. 19 - 25.
23. COLLEEN, E.: Emerging oral therapies for multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Nursing*, 2011.
24. KIESSEIR, B., C. et. al.: The future of multiple sclerosis therapy. *Pharmacological Research*, 60, 2009, pp. 207 - 211.
25. HAVRDOVÁ, E.: Neuroimunologie. Maxdorf Praha, 2001, pp 451.
26. GIOVANNONI, G. et. al.: A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 362, 2010, pp. 416 - 426.
27. Merck Serono.: Oral Investigational Treatment Cladribine Tablets for Multiple Sclerosis Significantly Reduced Relapse Rate in Two Year Phase III Pivotal Trial, News Release. Geneva, 2009.
28. WARNKE, C. et. al.: Review of teriflunomide and its potential in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 5, 2009, pp. 333 - 340.
29. TALLANTYRE, E., EVANGELOU, N., CONSTANTINESCU, C., S.: Spotlight on teriflunamide. *Int MSL*, 15, 2008, pp. 62 - 68.

30. Sanofi-Aventis U.S. LLC.: Arava[R] (leflunomide) product information. Bridgewater, 2009.
31. MOHARREGH-KHIABANI, D. et. al.: Fumaric acid and its esters: An emerging treatment for multiple sclerosis. *Current Neuropharmacology*, 7, 2009, pp. 60 - 64.
32. LEE, D., H., LINKER, R., A., GOLD, R.: Spotlight on Fumarates. *Int MSJ*, 15, 2008, pp. 12 - 18.
33. COMI, G. et. al.: Long-term open extension of oral laquinimod in patients with relapsing multiple sclerosis shows favourable safety and sustained low relapse rate and MRI activity. *Multiple Sclerosis*, 15(Suppl.), 2007 pp. 127.
34. REINES, I.: Die Rolle des Sphingosin-1-Phosphats in der Pathogenese allergisch-entzündlicher Hauterkrankungen. Inaugural – dissertation zur erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin, Hannover 2009.
35. DOGGRELL, S., A.: Novel drugs and products on neuroscience: highlights from IBRO. *Drugs of the future*, 2007.
36. BRINKMANN, V.: Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 115, 2007, pp. 84 - 105.
37. BRINKMANN, V. et. al.: The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277, 2002, pp. 21453 - 21457.
38. ALBERT, R. et. al.: Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its inactive enantiomer. *J Med Chem* 48, 2005, pp. 5373 - 5377.
39. MANDALA, S. et. al.: Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine 1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 2002, pp. 346 - 349.
40. HORGA, A., MONTALBAN, X.: FTY720 (fingolimod) for relapsing multiple sclerosis. (2007). *Expert Reviews in Neurotherapeutics*, 8, 208, pp. 699 - 714.
41. GARBER, K.: Infections cast cloud over Novartis' MS therapy. *Nature Biotechnol.* 26, 2008, pp. 844 - 845.
42. WESTHOFF, T., H. et. al.: The impact of FTY720 (fingolimod) on vasodilatory function and arterial elasticity in renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22 (8), 2007, pp. 2354 - 2358.

43. BRINKMANN, V.: FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system, *British Journal of Pharmacology*, 158, 2009, pp. 1173 – 1182.
44. ZHANG, Z., Y., ZHANG, Z., SCHLUESENER, H., J.: FTY720 attenuates lesional interleukin-17 cell accumulation in rat experimental autoimmune neuritis. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Epub ahead of print].
45. KAPPOS, L. et. al.: Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355, 2006, pp. 1124 - 1140.
46. O'CONNOR, P. et. al.: Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: two-year results of a phase II extension study. *Neurology* 72, 2009, pp. 73 - 79.
47. COHEN, J., A. et al.: Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 362, 2010, pp. 402 - 415.
48. KAPPOS, L. et. al.: A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis, *N Engl J Med* 2010, 2010, pp. 362 – 401.
49. DERWENKUS, J.: Current Disease-Modifying Treatment of Multiple Sclerosis. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 78:2, 2011, pp. 161-175
50. KAPPOS, L. et. al.: A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 362, 2010, pp. 387-401.
51. MASSBERG, S., von ANDRIAN, U., H.: Fingolimod and sphingosine-1-phosphate Modifiers of lymphocyte migration. *New England Journal of Medicine*, 2009, 355, pp. 1088 - 1091.
52. Novartis AG. Novartis erhält die Zulassung der FDA für Gilenya. Pressemitteilung vom 22. September 2010. Zugegriffen am 29. September 2010.
53. European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use (CHMP) Gilenya, EMA/26661/2011. 2011.
54. PCT.: International applications under the patent cooperation treaty (PCT), WO 2011/009634 A2; 2011.
55. NEVIANI, P. et. al.: FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome - positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2007 September 4; 117(9): pp. 2408 - 2421.
56. PREMENKO-LANIER, M. et. al.: FTY720 treatment promotes immune-mediated clearance of a chronic viral infection. *Nature* 454, 2008, pp. 894 - 898.

57. HONZA, J., MAREČEK, A.: Chemie pro čtyřletá gymnázia 2. díl, třetí přepracované vydání, 2005.
58. WEISSERMEL, K., ARPE, H., J.: Industrial Organic chemistry, 4. Vyd., Wiley-VCH, Wienheim, 2003.
59. de VRIES, J., C., ELSEVIER, C., J.: Handbook of Homogeneous Hydrogenation, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007
60. SVOBODA, J.. Organická syntéza I. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2000.
61. MAJER, M. et. al.: Základy organické technologie I, II, skripta, Pardubice, 1980.
62. KLOUDA, P.: Moderní analytické metody, Pavel Klouda, Praha 2003.
63. HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK, J. et. al.: *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1987, pp. 664.
64. TERNES, T., A.: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. Trends in analytical chemistry, vol. 20, No. 8, 2001.
65. CHURÁČEK, J., JANDERA, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984.
66. JANDERA P., CHURÁČEK, J.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod. Academia, Praha 1993, pp. 192 - 222.
67. SOMMER, L. et. al.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, pp. 347.
68. NISHIMURA, S.: Handbook of Heterogeneous Catalytic Hydrogenation for Organic Synthesis, J. Wiley, New York 2001, pp. 245.
69. WALSH, S.: FDA approves first oral drug to reduce MS relapses, FDA U.S. Food and Drug Administration, 22, 2010.
70. KRAJČOVIČ, J., FRÁNEK, J., POKORNÁ, I.: Laboratorní deník optimalizace výroby fingolimodu JP.01.09.10. Interní dokumentace, Synthron, 2010
71. POKORNÁ, I., Zápisy minutes - projekt FGD, Interní dokumentace, Synthron 2010/2011
72. LITTLER, B., J., LOOKER, A., R., TODD A., B.: Optimization of a Hydrogenation Process using Real-Time Mid-IR, Heat Flow and Gas Uptake Measurements, Organic Process Research & Development, 14 (6), 2010, pp. 1512-1517.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ARR	Roční účinnost v množství reminentních relapsů
DEMI	Demineralizovaná voda
EMA	European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA	Food and Drugs Administration, Správa potravin a léčiv
FGD	Fingolimod
FGD.hcl	Fingolimod hydrochlorid
HPLC	High-pressure liquid chromatography, Vysokotlaká kapalinová chromatografie
IPC	In - Process Control, Mezioperační kontrola
IPMS	Incoming Process Material Specification, Výstupní kontrola produktu
LC/MS	Liquid chromatography - mass spectrometry, Kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
M/1104	Nitrofingotriolu
M/1105	Nitrofingodiol
M/1106	Nitrofingolene
M/1107	Fingolimol
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MRI	Měření funkční aktivity mozku pomocí magnetické resonance
NMR	Nukleární magnetická resonance
Pd/C/H ₂	Katalyzátor paládia na uhlíku, za přítomnosti vodíku
PTSA	Kyselina p-toluensulfonová
RS	Roztroušená skleróza

9. PŘÍLOHY

Příloha 1 Klinické fáze výzkumu léčiva

I. fáze představuje studie/klinická hodnocení s prvním podáním léčivého přípravku lidským subjektům, nejčastěji zdravým dobrovolníkům. V těchto klinických hodnoceních se zjišťuje, jak je nová látka lidským organismem tolerována, případně jaký je její osud v organismu. Začíná se podáváním nízkých dávek, které se postupně zvyšují a hledá se maximální tolerovatelná dávka., Použité dávky se určují extrapolací z pokusu na zvířeti. Výzkum na zdravých dobrovolnících se neprovádí, je-li podání látky zdravému člověku vysoce nevhodné (např. u cytostatik). Počty zařazovaných subjektů jsou nízké (desítky zdravých dobrovolníků).

II. fáze - látka se poprvé podává v dané indikaci malému počtu vybraných, přesně definovaných nemocných (desítky až stovky). Ověřují se léčebné účinky na lidský organismus, hledá se vhodná dávka a zároveň se shromažďují i další údaje, např. o chování v organismu a snášenlivosti.

Potvrdí-li se v této fázi dobrá účinnost a přijatelně nízký výskyt nežádoucích účinků, přechází se do **III. fáze**. To jsou již studie s velkým souborem zařazovaných osob (stovky až tisíce pacientů), které mají na velkém počtu pacientů prokázat účinnost léčivého přípravku. Tedy upřesní, zda nový lék je u zvoleného onemocnění, určené skupiny pacientů a při zvoleném způsobu podávání účinný. Studie zároveň poskytnou další informace o bezpečnosti hodnoceného přípravku.

Projde-li nový lék úspěšně všemi fázemi klinických hodnocení, lze všechny výsledky testování předložit k registraci léku státní autoritou (některé léky registruje v ČR Státní ústav pro kontrolu léčiv, SÚKL, některé jsou registrovány Evropskou lékovou agenturou, EMA).

Po zaregistrování je možné používat přípravek v České republice při poskytování zdravotní péče.

Uvedením do zdravotní péče však sledování nového léčiva nekončí.

Ve **IV. fázi** se shromažďují informace o výskytu nežádoucích účinků, o účincích při dlouhodobém podávání, nové informace o možných interakcích s jinými léky, o podávání speciálním skupinám osob jako jsou např. staří lidé, děti, gravidní ženy, dialyzovaní pacienti apod. V dlouhodobých studiích se např. sleduje, jak léčivo ovlivňuje mortalitu pacientů, tj. zda jeho podávání prodlužuje jejich život a zlepšuje jeho kvalitu (či naopak).