

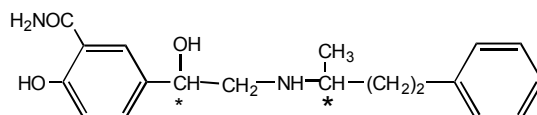
Případová studie:**Dilevalol hydrochlorid – přechod od racemátu k enantiomeru**

podle D. Walker: *Dilevalol Hydrochloride: Development of a Commercial Process*,
Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry (ed. K.G. Gadamasetti), Marcel Dekker, Inc., New York -
Basel, 1999, str. 125

Výrobci originálních léčiv obvykle nedávají k dispozici dostatečně podrobné informace o tom, jak u nich probíhá vývoj výrobních procesů, protože by tím usnadňovali práci výrobcům generik, kteří jim mohou po uplynutí patentoprávní ochrany konkurovat. Pokud informace poskytují, jde o přípravky, které nebyly na trh uvedeny nebo byly z trhu staženy. Jedním z takových případů je hydrochlorid dilevalolu. I když jde o přípravek stažený z trhu, je zajímavé sledovat, jakým způsobem probíhal vývoj procesu přípravy účinné látky a jaká pozornost přitom byla věnována ekonomickým i dalším aspektům.

1. Úvod

Labetalol hydrochlorid vyvinutý firmou Schering-Plough je lék používaný k léčbě vysokého krevního tlaku a anginy pectoris. Přípravek rozšiřuje cévy a je kompetitivním antagonistou β -adrenergických receptorů.



Labetalol: (RS) (RS)

Dilevalol: (R) (R)

Labetalol je racemát. Jeho molekula obsahuje dvě chirální centra. S ohledem na mechanismus účinku bylo možné předpokládat, že některý ze čtyř možných diastereomerů bude mít vyšší účinnost, takže jej bude možné podávat v menších dávkách. Tím by měl mít méně nežádoucích vedlejších účinků než racemát, který byl uveden na trh v 70. letech 20. století.

Byly proto připraveny jednotlivé isomery a porovnána jejich účinnost ve srovnání s labetalolem, jehož účinnost byla považována za 100%. Ze srovnání vyplynulo, že nejvyšší požadované účinky a současně snížené nežádoucí účinky má (*R,R*) diastereomer, který byl později nazván dilevalol:

Látka	Účinnost ve srovnání s labetalolem		
	Blokáda β_1 receptorů	Vasodilatace	Blokáda α receptorů (nežádoucí)*
Labetalol	100 %	100%	100%
(<i>R,R</i>) isomer	350%	700%	<20%
(<i>R,S</i>) isomer	< 6%	-	0
(<i>S,R</i>) isomer	< 5%	-	510%
(<i>S,S</i>) isomer	0	-	150%

*) V tabulce jsou uvedeny relativní hodnoty, skutečný účinek na β_1 a α receptory byl výrazně odlišný.

Na základě těchto výsledků zahájila firma Schering-Plough vývoj způsobu přípravy dilevalol hydrochloridu.

Srovnání účinnosti i nežádoucích účinků mělo rovněž ekonomické důsledky. Přechod od racemátu k používání čistého diastereomeru mohl mít z ekonomického hlediska smysl, jen v případě, že:

$$VN \text{ na dilevalol} = 3 \times VN \text{ labetalolu} \pm 25\%,$$

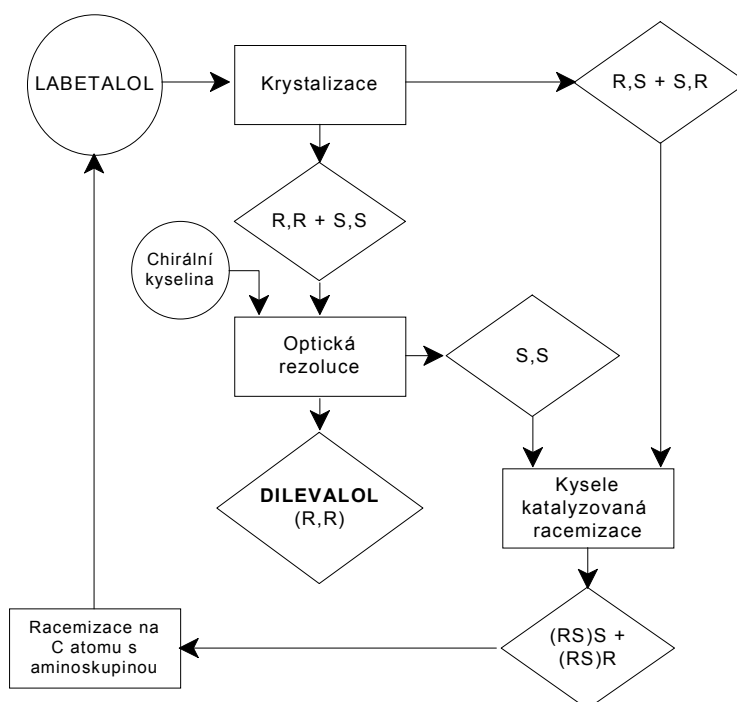
kde VN = výrobní náklady, tj. cena surovin, práce, režijní náklady (zásobovací, výrobní a správní režie) a odpisy

jinak by dilevalol nebyl prodejný. Aby se náklady na vývoj vrátily, zpřísnilo vedení firmy Schering-Plough tento limit tak, že VN na výrobu dilevalolu nesmí přesáhnout trojnásobek VN labelalolu **minus** 25%.

Poznámka: Nákladový limit se vztahoval na výrobu v objemu 50 t ročně (odhad marketingového oddělení firmy pro odbyt přípravku v 3. roce od uvedení na trh). V časných fázích vývoje se dosažení nákladového limitu nemusí jevit jako reálné, což může vést k předčasnému ukončení slibných projektů. Citlivé posuzování, zda pokračovat v práci, protože nebyly vyčerpány všechny možnosti snížení nákladů, nebo zda by další vývoj představoval jen plýtvání finančními i lidskými zdroji vyžaduje velké zkušenosti vedoucích pracovníků. V případě dilevalolu byli vývojoví pracovníci podporováni marketingem i pracovníky řídicími portfolio firmy.

2. První fáze vývoje

Na začátku vývoje byla zvažována možnost přípravy dilevalolu z labelalolu. Ukázalo se, je možné oddělit prostou krystalizací oba racemické páry (*R,R*)/(*S,S*) a (*R,S*)/(*S,R*) a pak z páru (*R,R*)/(*S,S*) oddělit (*R,R*) isomer krystalizací soli s chirální kyselinou. Výtěžek dilevalolu připraveného tímto způsobem však mohl činit nejvýše 25%. Požadavek na nákladovost přitom mohl tedy být splněn jen pokud by se podařilo účinně zpracovat a recyklovat odpady z fyzikální i optické rezoluce:

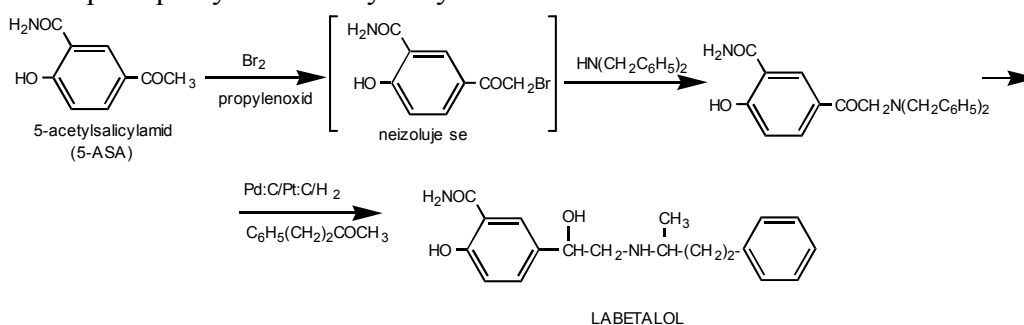


Praktická zkouška ukázala, že kysele katalyzovaná racemizace na uhlíku nesoucím hydroxylovou skupinu probíhá bez problémů, avšak racemizace na uhlíku s navázanou aminoskupinou se jevila jako problematická, zejména, pokud by byla prováděna ve výrobním měřítku. Příprava dilevalolu z labelalolu by proto nebyla účelná.

3. Vývoj nového výrobního postupu – „(*R,R*)“ proces

Bez ohledu na problémy s racemizací by byl labelalol jako výchozí látka drahý. Ekonomicky výhodnější proto mohl být spíše přímý postup, při němž by byly použity chirální komponenty.

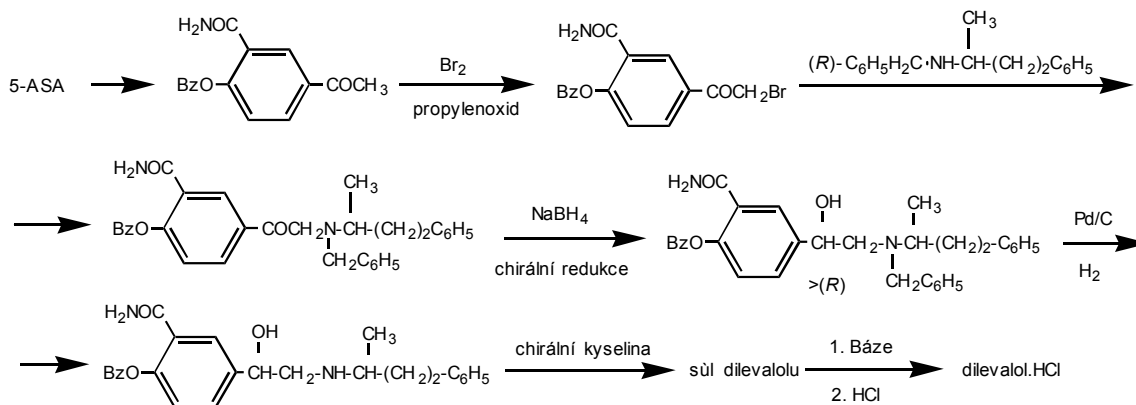
Vývoj tohoto postupu vycházel ze syntézy labelalolu:



Rozbor syntézy ukázal, že místo dibenzylaminu by mohl být použit chirální sekundární amin který by mohl být snadno připraven krystalizací solí připravených z racemátu a chirální kyseliny. Navázáním chirálního aminu by vzniklo v molekule chirální centrum, jehož přítomnost by měla indukovat chiralitu na druhém asymetrickém uhlíku při redukci ketoskupiny.

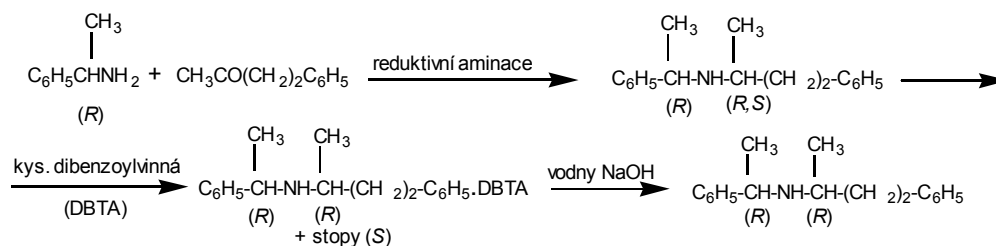
Japonští autoři studující redukce ketoskupiny tetrahydridoboritanem sodným ukázali, že pokud je v blízkosti karbonylové funkce chirální centrum nesoucí skupinu schopnou vytvářet s borem komplexy (-OH, -SH, -NRR') je průběh redukce do značné míry stereospecifický. Pokud by byl v sousedství ketoskupiny navázán (*R*)-amin, opak by měl vzniknout produkt, v němž by převládal (*R,R*) diastereomer.

Jako vhodný chirální amin přicházel v úvahu (*R*)-2-benzylamino-4-fenylbutan. Upravený postup syntézy, který zahrnul i chránění fenolické skupiny benzoylaci je znázorněn následujícím schematem:

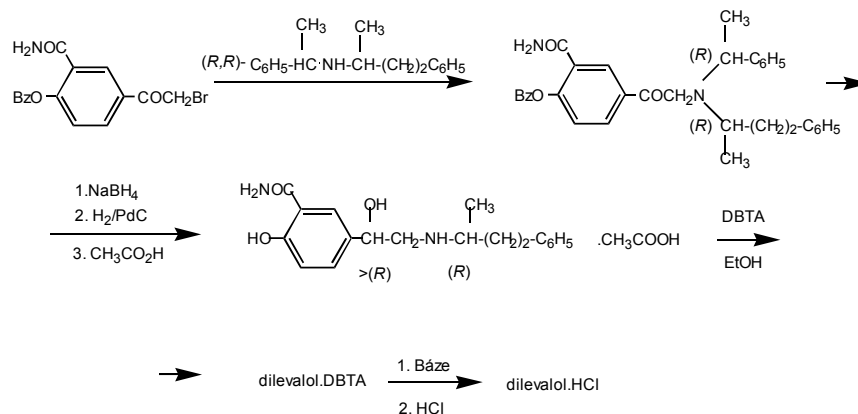


Při studiu průběhu redukce byla sice prokázána indukce chiraloty, ale s ohledem na podmínky reakce (vliv rozpouštědel a teploty) byl experimentálně dosažený poměr (*R,R*) isomeru k (*S,R*) nejvýš 3:1. Cesta ke zlepšení byla zprvu spatřována v podpoře stereospecifické indukce.

Bylo předpokládáno, že se stereospecifita redukce zvýší při použití sekundárního aminu, který by obsahoval dvě chirální centra s (*R*) konfigurací. Jako zvláště výhodná se jevila náhrada benzylskupiny za α -methylaminobenzylskupinu. Důvodem bylo, že α -methylbenzylamin byl relativně levný a snadno dostupný, a to jak racemát, tak (*R*) enantiomer. Kromě toho bylo známo, že benzylskupiny, které jsou v α -poloze alkylovány, lze hydrogenolyticky odštěpit snadněji než nesubstituované benzylskupiny. Výchozí (*R,R*) amin byl připraven následujícím způsobem:



Reakcí bromketonu s takto připraveným sekundárním aminem byl připraven aminoketon. Jeho redukce borohydridem a hydrogenolytické odštěpení α -methylbenzylskupiny poskytla surový diltiazem, který byl izolován jako acetát. Produkt obsahoval jen asi 10% (*S,R*) isomeru, Následovala příprava soli s dibenzoylvinnou kyselinou a převedení získaného krystalického produktu na diltiazem hydrochlorid:



S cílem zjistit, zda a jak použití sekundárního aminu s (*R,R*)-konfigurací podpořilo stereospecifický průběh redukce, bylo zjišťováno zastoupení jednotlivých stereoisomerů v reakčních produktech získaných při použití sekundárního aminu připraveného jak z racemického α -methylbenzylaminu, tak jeho (*R*)-enantiomeru:

Stereoisomerní složení výchozího sekundárního aminu	Stereoisomerní složení dilevalol acetátu				Stereoisomerní složení soli dilevalolu s DBTA				Výtěžek DBTA soli vztahený na násadu sekundárního aminu
	(<i>R,S</i>)	(<i>S,R</i>)	(<i>R,R</i>)	(<i>S,S</i>)	(<i>R,S</i>)	(<i>S,R</i>)	(<i>R,R</i>)	(<i>S,S</i>)	
(<i>R,R</i>):(<i>R,S</i>) = 52:48	-	21,3	77,5	1,2	-	4,3	94,6	1,2	50,5%
(<i>R,R</i>) > 98%	0,7	10,2	86,9	2,1	0,2	2,3	96,2	1,3	59,0%

Z výsledků vyplynulo, že použití sekundárního (*R,R*)-aminu se sice stereospecifický průběh reakce zlepšuje. Současně se však ukázalo, že proces zřejmě nelze modifikovat tak, aby bez použití rezoluce pomocí kyseliny dibenzoylovinné byla dosažena uspokojivá optická čistota produktu. Výtěžky produktu sice byly vyšší, otázkou však bylo, zda zvýšení výtěžku dostatečně kompenzuje vyšší náklady spojené s přípravou (*R,R*)-aminu.

V době zahájení zkoušek dilevalolu nebyl lepší postup k dispozici. Po několika menších zlepšeních proto byl vyvinutý „(*R,R*)“ proces použit k přípravě dilevalolu v množství stovek kg pro preklinické, toxikologické a klinické zkoušení. Současně byl patentován. Úpravy procesu umožnily, aby limit obsahu (*R,R*) isomeru byl stanoven na > 97% a obsah nežádoucích diastereomerů (*R,S* + *S,R* + *S,S*) byl max. 3%. Obsah ostatních nečistot byl dokonce nižší než v labetalolu.

4. Zjednodušování a zlepšování „(*R,R*)“ procesu - „(*R*)“ proces

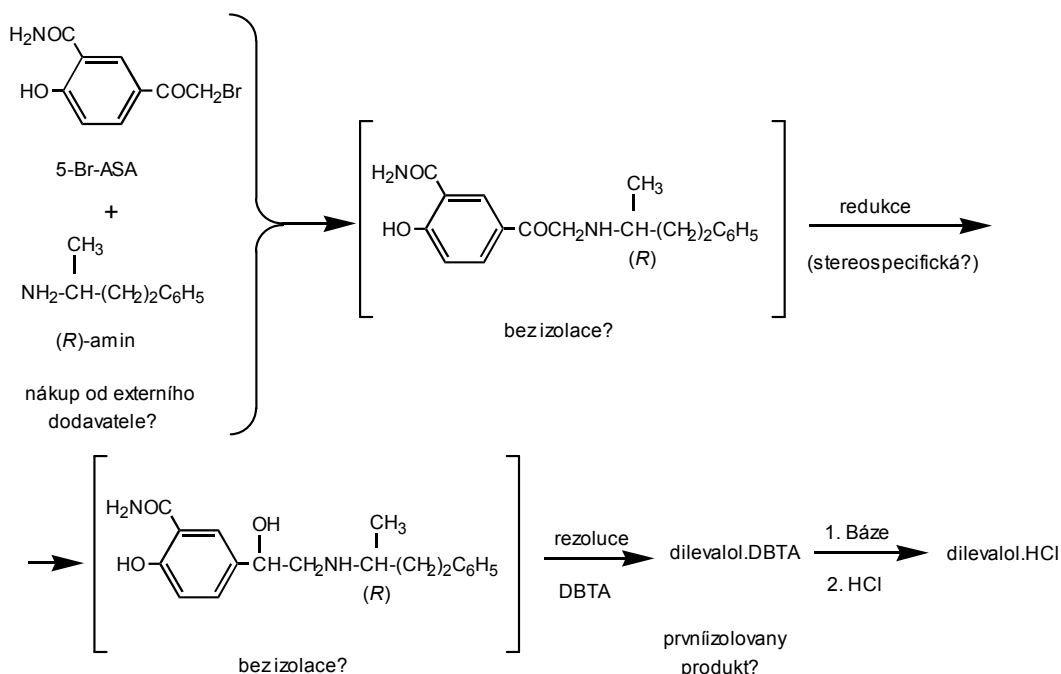
Z ekonomických, technologických i jiných důvodů nebyl však „(*R,R*)“ proces stále ještě považován za zcela uspokojivý. Byly proto hledány možnosti jeho dalšího zlepšení. Z rozboru nevýhod postupu vyplynuly následující možnosti jeho zlepšení:

Hlavní nevýhody	Možnosti zlepšení
<p>1. Příliš mnoho reakčních kroků</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Je benzoylace fenolické skupiny nezbytná? ▪ (<i>R,R</i>) sekundární amin je novou látkou, na trhu je nedostupný ▪ Redukce není zcela stereospecifická, resoluční s DBTA nelze vynechat ▪ Postup zahrnuje dvě redukce (NaBH₄ a katalytickou hydrogenaci) ▪ Vysoká spotřeba rozpouštědel a činidel <p>2. Vysoké výrobní náklady</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Spotřebovává se drahý chirální α-methylbenzylamin (eliminován jako ethylbenzen) ▪ Regenerace, recyklace a likvidace odpadů zvyšuje náklady ▪ Převedení do výrobního měřítka vyžaduje vysoké investiční náklady – vysoké odpisy ▪ Vysoká pracnost 	<p>1. Vynechat některé kroky, neizolovat meziprodukty</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vyzkoušení postupu s nechráněnou OH skupinou ▪ Nalezení dodavatele aminu (snížení objemu investic) ▪ Minimálním zlepšením je recyklace DBTA ▪ Pokud by byl použit primární chirální amin, bylo by možné vynechat hydrogenolytické odštěpení benzylskupiny ▪ Zvýšení koncentrace reaktant/regenerace rozpouštědel <p>2. Snížení nákladů</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Protože nelze vynechat resoluční s DBTA, jsou snahy o zvýšení podílu asymetrické indukce zbytečné ▪ Minimalizace odpadů ▪ Zjednodušení procesu s cílem snížit investiční náklady ▪ Zjednodušení procesu s cílem snížit pracnost

Na základě tohoto rozboru byl navržen „zlepšený“ postup syntézy, který je schematicky znázorněn na následující stránce.

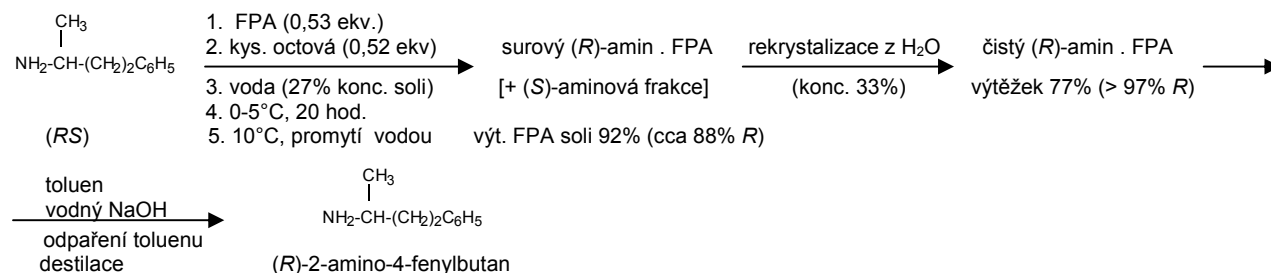
Při vývoji zjednodušeného procesu bylo třeba řešit tyto otázky:

- Které suroviny bude možné nakoupit od externích firem a bude jejich cena přijatelná?
- Použití primárního aminu přináší riziko vzniku N,N-dialkylderivátu. Nevzniknou přitom nové nečistoty, které by se jen obtížně odstraňovaly?
- Bude možné se kvůli možnosti vzniku N,N-dialkylderivátu vyhnout izolaci prvního meziprojektu nebo bude nutná krystalizace aminoketonu, při níž se dvedlejší produkty odstraní?
- Po redukci vznikne směs (*S,R*) a (*R,R*) diastereomerů. Bude možné ji rozdělit pomocí DBTA nebo jiné chirální kyseliny?
- Bude možné recyklovat (*S,R*) produkt odpadající po rezoluci
- Bude možné recyklovat DBTA po jejím uvolnění ze soli dilevalolu a jejím a převedení na hydrochlorid?
- Nebude dilevalol hydrochlorid připravený zjednodušeným postupem obsahovat některé nové nečistoty, které by mohly zapříčinit, že nebudou uznány výsledky probíhajících klinických zkoušek a znesnadnit tak registraci?
- Bude možné dokončit vývoj zjednodušeného procesu, který by byl přijatelný pro registrační autority, ještě v době, která zbývá do dokončení klinických zkoušek a podání žádosti o registraci?

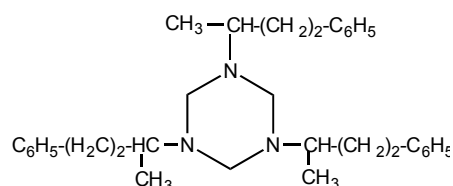


Při řešení otázky dostupnosti surovin se ukázalo, že 5-bromacetylsalicylamid nelze nakoupit, vlastní výroba však nepředstavovala žádný problém. Bezproblémový byl nákup dibenzoylviné kyseliny, italský výrobce ji nabízel v tunovém množství. Racemický 2-amino-4-fenylbutan bylo možné koupit v tunovém množství za přijatelnou cenu (10-12 \$/kg), (*R*)-enantiomer však na trhu nebyl a bylo třeba vyvinout vlastní způsob jeho přípravy.

Při řešení přípravy (*R*)-2-amino-4-fenylbutanu byla vyzkoušena rezoluce s použitím různých chirálních kyselin. Nejlépe se osvědčil N-formyl-L-fenylalanin (FPA). Postup rezoluce s touto látkou byl patentován a úspěšně převeden do výrobního měřítka:



Při prvních experimentech byl místo toluenu použit k převedení FPA soli aminu na volnou bázi používán dichlormethan. V laboratorním měřítku to nečinilo potíže. Při převedení do výrobního měřítku bylo třeba dobu odpařování prodloužit na 30 hodin, jinak by chladicí systém nemohl zkondenzovat všechny páry rozpouštědla a byla by překročena povolená koncentrace rozpouštědla v ovzduší. Protože dichlormethan není chemicky zcela nereaktivní, prodloužení reakční doby mělo za následek vznik nové nečistoty:



Při výrobě proto byl dichlormethan nahrazen toluenem. Amin se v toluenu dobře rozpouští, toluenová a vodní fáze byly dobře oddělitelné a zbytkové množství toluenu bylo stejně kontrolováno, protože se toluen používal i v prvním reakčním kroku.

N-Formyl-L-fenylalanin byl připraven reakcí mravenčanu methylnatého s L-fenylalaninem. Chemická stabilita látky (při teplotě 25°C a pH v rozmezí 2-12 nedochází ani k hydrolyze ani racemizaci) umožnila její snadnou recyklaci: FPA odpovídající požadované specifikaci byl získán ve výtěžku cca 95% po okyselení alkalické vodní fáze po rozkladu soli a extrakci aminu, filtraci a promytí.

Matečné louhy po separaci soli (*R*)-aminu s FPA obsahující převážně (*S*)-enantiomer byly podrobeny racemizaci. Ta proběhla snadno a bez rozkladu při zahřívání na 150°C v atmosféře vodíku (10-15 bar) za přítomnosti Raneyova niklu, tedy za podmínek využívaných při reduktivní aminaci benzylacetonu na 2-amino-4-fenylbutan. Matečné louhy proto bylo možné přidávat k hydrogenované směsi, což usnadnilo manipulaci a snížilo výrobní náklady (včetně nákladů na likvidaci odpadů).

5. Převedení „(*R*)“-procesu do výrobního měřítko

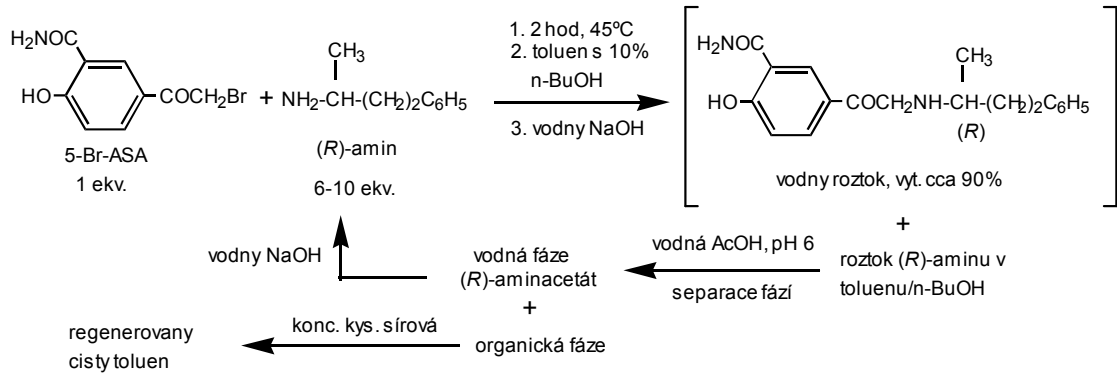
Výrobní divize fy Schering-Plough nejprve zahájila průzkum mezi potenciálními dodavateli s cílem zjistit, zda by některá jiná firma neměla dostatek výrobních kapacit a nemohla vyrobit dilevalol hydrochlorid nebo některý z posledních meziproductů v objemu kolem 50 t za rok za výhodnou cenu. Současně provedlo oddělení investiční výstavby odhad investičních nákladů potřebných pro zajištění vlastní výroby 50 t dilevalol hydrochloridu v závodě fy Schering-Plough v Irsku. Za předpokladu, že výchozí látky bude možné získat nákupem, činil odhad 48-50 mil. \$. Jako alternativa byl zpracován odhad investičních nákladů pro případ, že by byla využita uvolněná kapacita jednoho amerického závodu firmy pro výrobu dilevalol hydrochloridu „(*R*)“ procesem z některého z posledních mezi-productů. Náklady by v tomto případě byly výrazně nižší, odhad se pohyboval mezi 5 a 6 mil. \$. Značný rozdíl v investičních nákladech, které by se promítly do ceny produktu (formou odpisů), byl výrazným argumentem ve prospěch zjednodušeného „(*R*)“ procesu.

Jedním z klíčových předpokladů využití zjednodušeného procesu podle schematu v předchozí kapitole bylo vynechání izolace jednoho nebo dvou meziproductů v pevném stavu. Pokud by nebylo třeba manipulovat s pevným produktem (separovat jej filtrací, promývat, sušit a homogenizovat), poklesl by počet pracovních hodin na šarži, snížily se režijní náklady a zvýšila produktivita práce a kapacita výroby. Nevýhodou by bylo větší riziko znečištění konečného produktu. Aby se tomu předešlo, bylo třeba v první řadě věnovat velkou pozornost kvalitě výchozích látek a rozpouštědel. Pro 5-bromacetylsalicylamid byl stanoven limit obsahu účinné látky min. 95%. Vedle hlavní nečistoty (5-acetylsalicylamid) směl produkt obsahovat nejvýše 0,3% nečistoty obsahující brom navázaný na aromatickém jádře. U (*R*)-2-amino-4-fenylbutanu byl požadován obsah (nevodnou titrací) 98-102%, obsah (*R*)-enantiomeru min. 98%, zbytkové rozpouštědlo max. 0,5% a obsah příbuzných látek (GC) max. 1%. Vysoké kvalitativní požadavky byly kladeny rovněž na používaná rozpouštědla. Byly nalezeny podmínky výroby, při nichž byly maximalizovány výtěžky a současně minimalizován rozklad intermediátů a činidel jako je DBTA.

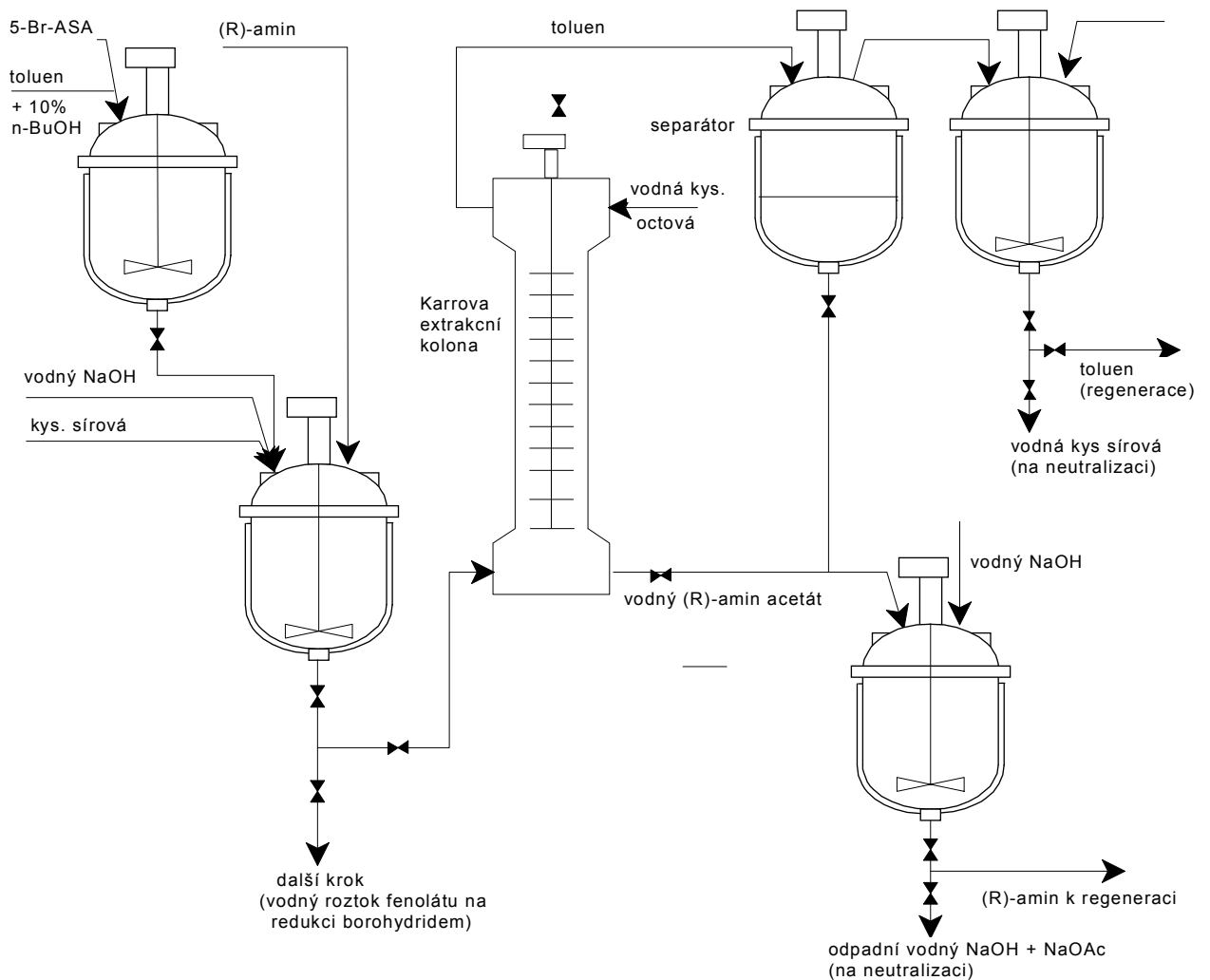
Prvním stupněm byla **alkylace aminu** bromketonem za vzniku ketoaminu

Aby přitom bylo minimalizováno riziko dialkylace, byl 5-bromacetylsalicylamid přidáván k velkému přebytku (*R*)-2-amino-4-fenylbutanu. Nezareagovaný (*R*)-2-amino-4-fenylbutan musel přitom být recyklován, jinak by proces nebyl ekonomický. Recyklace byla provedena protiproudou extrakcí toluenem obsahujícím *n*-butanol. Ze studia reakčních podmínek a výsledků vyplynul optimalizovaný postup alkylačního kroku znázorněný následujícími schématy:

Reakční schéma:



Proudové schéma

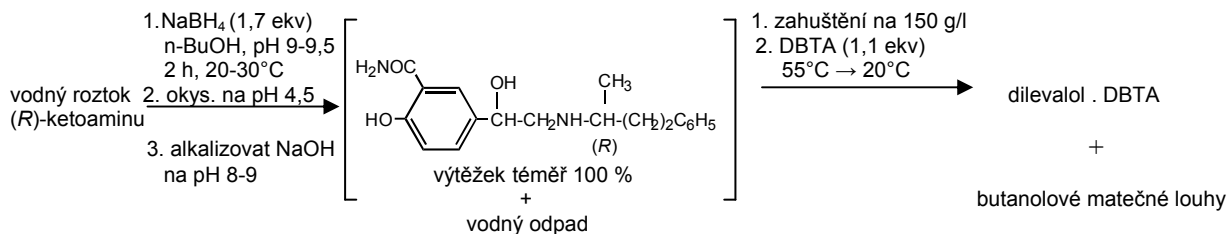


I když (*R*)-amin může vytvářet s fenoly soli, nebyl prokázán vznik nečistoty, která by vznikala reakcí fenolátového iontu s bromem bromacetylskupiny. Jediným vedlejším produktem proto byl *N,N*-disubstituovaný (*R*)-amin, jehož množství nepřesáhlo 2%. Přebytečný (*R*)-amin byl po reakci vyextrahován z toluenového roztoku vodnou kyselinou octovou v Karrově protiproudém extraktoru. Po alkalizaci vodného extraktu se uvolnil volný (*R*)-amin, který byl použit v další násadě. Při opakované regeneraci sice (*R*)-amin tmavnul, ale to nemělo vliv na kvalitativní parametry požadované specifikací ani na kvalitu vznikajícího ketoaminu. Přesto byl regenerovaný (*R*)-amin po každé desáté šarži přečištěn destilací. Nákladná regenerace odpadního toluenu destilací (vysoké nároky na energie a obslužnou dobu) byla nahrazena promytím koncentrovanou kyselinou sírovou, oddělením fází a promytím vodou.

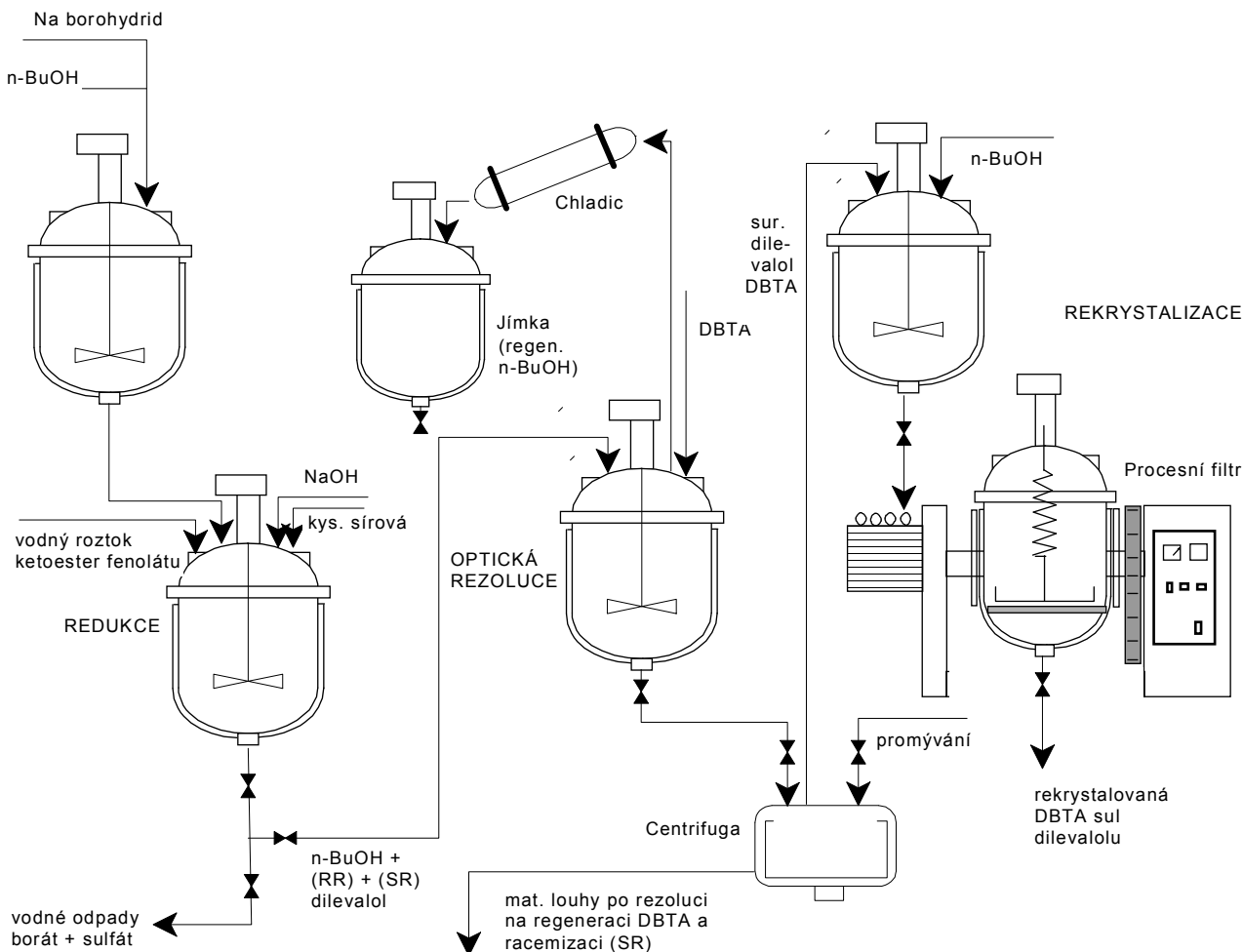
Při vývoji (*R*)-procesu bylo zjištěno, že (*R*)-ketoamin může být poměrně snadno izolován v čistém stavu. Vodný alkalický roztok (*R*)-ketoaminu byl přitom zneutralizován a ketoamin extrahován do organického rozpouštědla. Po přidání HCl vykristaloval čistý ketoamin hydrochlorid. Izolace však nebyla nezbytná a při výrobě nebyla prováděna.

Dalším stupněm byla **stereospecifická redukce**:

Reakční schéma:



Proudové schéma:



Při vývoji výrobního procesu byly optimalizovány parametry jako je rozpouštědlo, teplota, množství NaBH₄, množství DBTA a podmínky krystalizace produktu, proces byl monitorován pomocí HPLC. Po redukci v podstatě vznikala směs 1:1 (R,R) a (S,R) diastereomerů. Filtrace, promytí a sušení soli kyseliny dibenzoylvinné s dilevalolem byla prováděna v uzavřeném systému procesního filtru. Celkový výtěžek soli činil 30-40% vztaheno na 5-Br-ASA.

Okyselení reakční směsi kyselinou sírovou na pH 4,5 bylo prováděno s cílem rozložit borátové komplexy, jejichž přítomnost by komplikovala extrakci směsi (R,R) a (S,R) diastereomerů do n-butanolu. Značná pozornost byla věnována propracování procesu krystalizace soli kyseliny dibenzoylvinné s dilevalolem. Cílem bylo nalezení podmínek, při nichž by byla získána krystalická sůl s obsahem (R,R) isomeru vyšším než 97% a krystalizaci nekomplikoval vznik polotuhých látek. S ohledem na čistotu produktu byly optimální výsledky získány v případě, že sůl byla rozpuštěna při teplotě 55°C a krystalizace probíhala při 45°C. Při ochlazení na 0°C se výtěžky krystalické soli pochopitelně zvýšily, produkt však nebyl dostatečně čistý a obsahoval asi 5% (S,R)-diastereomeru. Pro rutinní sledování průběhu redukce byla využita tenkovrstvá chromatografie na silikagelu s mobilní fází ethylacetát-isopropanol-voda-konc.čpavek 50:30:16:4. Pro sledování účinnosti optické rezoluce a případně i případné racemizace byla vypracována poměrně

jednoduchá GC metoda využívající vznik komplexů s methylboronovou kyselinou, jejichž retenční časy se u (*R,R*) a (*S,R*) isomerů výrazně lišily. Tato metoda sice (na rozdíl od HPLC na chirální fázi) neumožnila rozlišení párů (*R,R*) a (*S,S*) resp. (*R,S*) a (*S,R*), což však pro daný účel nebylo nutné.

Proces krystalizace nebyl dostatečně robustní a poměrně často bylo třeba přepracovávat produkt u něhož obsah (*R,R*)-derivátu poklesl pod požadovaných 97%. Přepracování se provádělo tak, že se sůl rozložila v *n*-butanolu zpět na bázi a vyloučení DBTA soli se opakovalo. Postupně bylo stále více zřejmé, že by bylo vhodnější, a to jak z ekonomického hlediska, tak i s ohledem na kvalitu produktu roztok soli ochladit na 0°C a surovou sůl pak rekrystalovat. Tato úprava postupu byla provedena, stala se však předmětem kritiky FDA (viz kap. 7).

Aby postup byl ekonomicky výhodný, bylo třeba řešit nejen vlastní proces výroby dilevalolu, ale i některé související kroky, jako byla **racemizace vedlejšího produktu (*S,R*) a recyklace dibenzoylvinné kyseliny**, jinými slovy řešit zpracování butanolových matečných louhů.

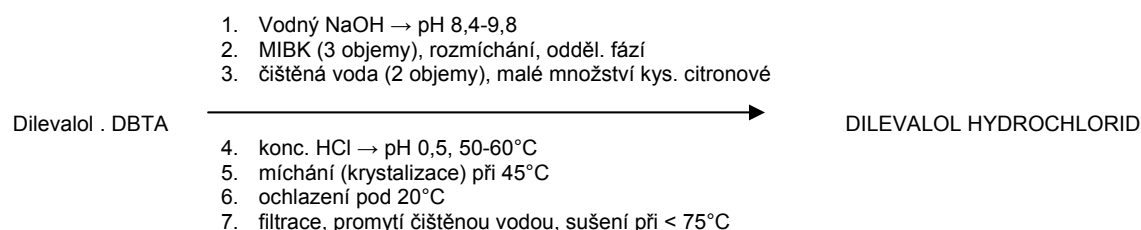
Recyklace DBTA byla relativně jednoduchá – extrakce do vodného roztoku alkálií a okyselení. Větší problém představovala racemizace. Matečné louhy obsahovaly vedle (*S,R*) stereoisomeru ještě určité množství (*R,R*) derivátu - poměr (*S,R*) a (*R,R*) v matečných loužích obvykle byl cca 70 : 30. Směs byla zpočátku srážena ve formě soli s kyselinou šťavelovou. Matečný luh byl azeotropně vysušen částečným oddestilováním *n*-butanolu, krystalky oxalátu odsáty a po promytí byla provedena racemizace zahříváním se zředěnou kyselinou sírovou na 40-60°C. Po alkalizaci na pH 8,3-8,8 byl racemizovaný hydroxyamin vyextrahován do *n*-butanolu. Tento postup však byl pracný, bylo třeba manipulovat s velkým množstvím oxalátu a vznikalo velké množství odpadů. Elegantní řešení bylo nalezeno v racemizaci hydroxyaminu ve vlhkém butanolu (po vyextrahování DBTA) pomocí silně kyselého katexu. Ze zkoušených katexů se nejvíce osvědčil Dowex XFS 43279 v H⁺ cyklu. Racemizace byla prováděna šaržovitě v 10 m³ smaltovaném duplikátoru s filtrem na výpusti. Po nasazení směsi (*S,R*) a (*R,R*) diastereomerů a katexu byl *n*-butanol odsát a katex s nasorbovaným hydroxyaminem promyt jedním objemem *n*-butanolu, vodou, 5% vodnou kyselinou sírovou a vodou. Racemizace byla provedena vyhříváním suspenze katexu na 90°C po dobu 2 hodin. Racemizovaný hydroxyamin (směs (*S,R*) a (*R,R*) diastereomerů 1: 1) byl z katexu desorbován směsí vodného NaOH a *n*-butanolu. Pak bylo pH upraveno na 8,5, aby karboxylová kyselina vzniklá hydrolyzou (asi 7% amidu hydrolyzuje) zůstala ve vodné fázi a racemizovaný amin v butanolové fázi, která pak byla přímo použita k optické rezoluci. Regenerace katexu byla provedena kyselinou sírovou. Postup racemizace byl zapatentován.

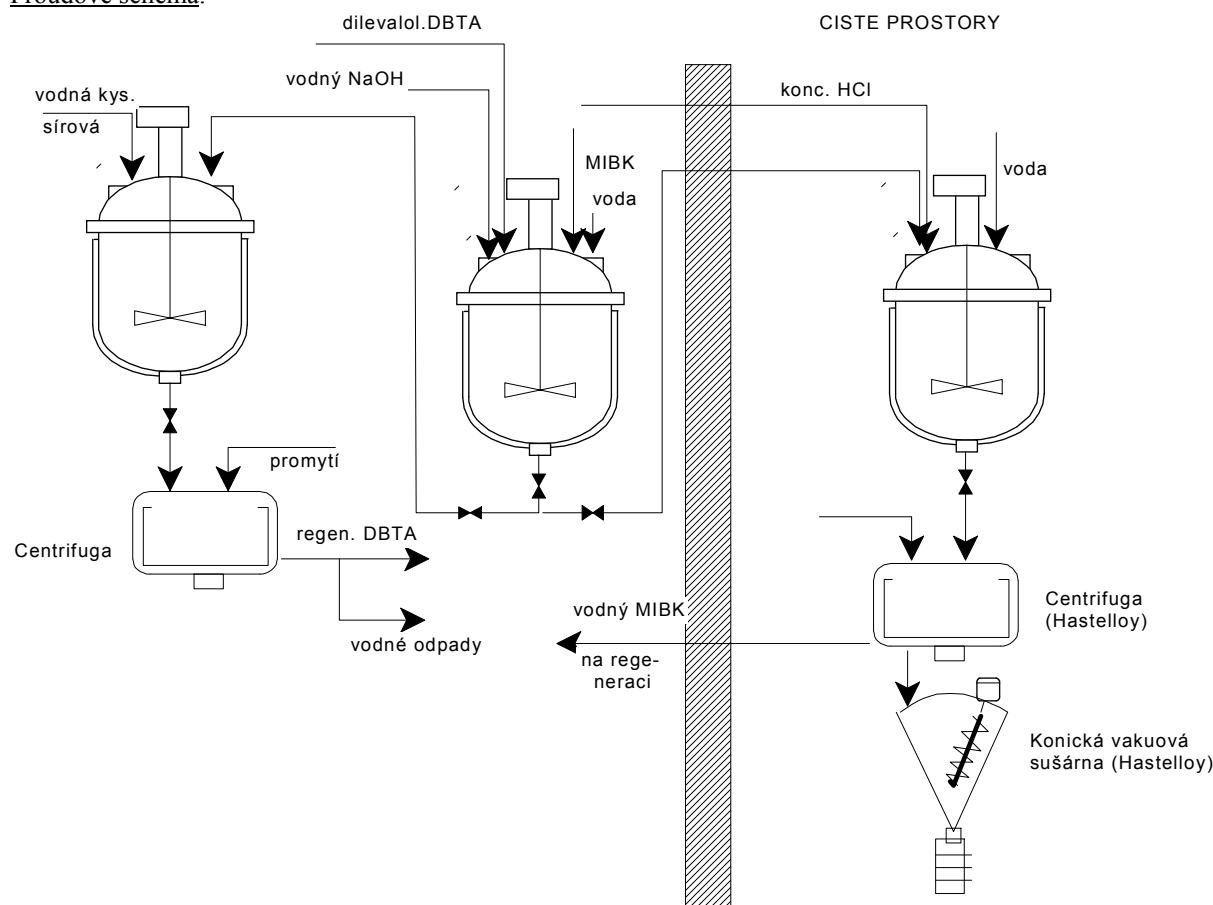
Posledním stupněm zjednodušeného procesu bylo **převedení dibenzoylvinanu dilevalolu na hydrochlorid**.

V první fázi práce byl jako rozpouštědlo použit octan ethylnatý. Ten jako ester může snadno hydrolyzovat, proto bylo hledáno lepší rozpouštědlo. Nejlépe se pro své výhodné vlastnosti přitom osvědčil methylisobutylketon (MIBK), s bv. 117-118°C, nízkou toxicitou (LD₅₀ 2,08 g/kg – potkan, orálně) a malou rozpustností ve vodě (1,91%). Po alkalizaci přešla dibenzoylvinná kyselina do vodné fáze, z níž byla po okyselení regenerována DBTA vysoké kvality ve výborném výtěžku. K organické fázi tvořené roztokem dilevalolu v MIBK byla přidána kyselina solná, přičemž došlo k vysrážení hydrochloridu. Aby produkt dobře krystaloval, bylo třeba roztok okyselit na pH 0,5 (podstatně větší okyselení než u racemátu – labetalolu, kde hydrochlorid nejlépe krystaluje při pH 3,0). Srážení bylo třeba provádět při 55°C (u labetalol. HCl při 25°C), jinak se někdy vylučoval polotuhý produkt. Při práci s běžným nerezovým zařízením při tak nízkém pH byl získáván produkt, který byl v důsledku přítomnosti železitých iontů zbarven žlutě. Pro přípravu nezbarveného dilevalol hydrochloridu proto bylo třeba používat zařízení z antikorozi slitiny hastelloy, plastu nebo keramiky, poslední stopy železa byly vázány ve formě komplexu přidáním malého množství kyseliny citronové. Podmínky krystalizace byly optimalizovány s cílem získat krystalický produkt, který byl dobře filtrovatelný, dobře se promýval a sušil (zbytkový MIBK < 0,05%) a měl sypanou hmotnost asi 0,3 g/ml. Pečlivé analytické sledování procesu srážení ukázalo, že při 50-60°C nedochází k racemizaci produktu.

Postup při posledním stupni výroby je znázorněn následujícími schématy:

Reakční schéma:



Proudové schéma:

Produkt zjednodušeného (*R*) procesu byl velmi pečlivě porovnáván s produktem získaným (*R,R*) procesem, aby byla zaručena jejich vzájemná bioekvivalence a kompatibilita výsledků.

Analytické oddělení se přitom zaměřilo především na krystalovou strukturu, aby byla vyloučena přítomnost odlišných polymorfních forem a rovněž na přítomnost nových nečistot (diaktylovaného aminu z prvního stupně). Porovnávány byly stability obou substancí a dále i parametry finální lékové formy připravené z obou produktů (pevnost tablet, disoluční profil). Jelikož optická rezoluce pomocí DBTA, krystalizace a izolace finálního produktu byly stejné u obou procesů, nevznikly v těchto stupních žádné nové nečistoty ani nebyly změněny fyzikální parametry ovlivňující farmaceutické vlastnosti konečného léčivého přípravku.

6. Chemicko inženýrské, bezpečnostní a environmentální aspekty

Při vývoji procesu výroby labetalolu s organickými i analytickými chemiky úzce spolupracovali i chemičtí inženýři.

Jeich práce výrazně přispěla ke zkrácení doby vývoje výrobního procesu a ke zlevnění výroby a vedla k návrhům výrobního zařízení znázorněného na proudových schématech. Přitom většinou šlo o přizpůsobení běžného zařízení, které firma Schering-Plough již měla k dispozici ve svém výrobním závodě. Nově byl zakoupen pouze smaltovaný reaktor o objemu 2000 gallonů (8 m³) pro racemizaci, Karrův protiproudý extraktor a automatizovaný procesní filtr. Ten představoval uzavřený systém, v němž byla prováděna krystalizace, filtrace, promývání a sušení produktu, a to v ochranné atmosféře filtrovaného dusíku. Ta byla nezbytná, protože bezpečnostní testování prokázalo, že prach dilevalolu je výbušnější než uhelný prach. Jedinou operací, při níž by operátoři mohli být vystaveni účinku hypotenzně působícího dilevalolu, bylo vyprazdňování filtru. I když výrobní prostory byly dobře vzduchotechnicky ošetřeny, používali operátoři při této operaci ochranný oblek s kuklou chránící oči, ústa a dýchací cesty.

Paralelně s vývojem procesu řešili chemičtí inženýři problematiku využití odpadů.

Snahou byla minimalizace odpadů určených k likvidaci a maximální recyklace rozpouštědel, pomocných látek (dibenzoylvinná kyselina) a vedlejších produktů (*S,R*-diastereomer). Úspěšné řešení těchto problémů se odrazilo ve výrazném snížení nákladovosti procesu.

7. Povolení labetalol hydrochloridu ze strany FDA

Zjednodušení a zlevnění výroby spočívající v náhradě „(*R,R*)“-procesu za „(*R*)“-proces v době mezi podáním žádosti o povolení klinických zkoušek a podáním žádosti o registraci a povolení prodeje dilevalol hydrochloridu bylo riskantní, protože FDA mohla žádost vrátit a požadovat opakování řady preklinických i klinických zkoušek.

Pracovníci některých útvarů fy Schering-Plough proto měli zprvu námitky proti zjednodušenému procesu. Problematiký se jim jevil zejména profil nečistot produktu, protože standardním „(*R,R*)“-procesem byly připraveny preparáty použité při toxikologických a farmakologických studiích. Rovněž pracovníci vývoje lékových forem požadovali záruky, že při změně procesu nedojde ke změnám polymorfie a velikosti částic produktu, které by mohly mít negativní vliv na tokové vlastnosti látky a disoluční profil tablet a mohly by zapříčinit, že tablety z nově připravované substance nebudou plně bioekvivalentní s tabletami připravenými dříve z produktu „(*R,R*)“-procesu. Oddělení registrace se obávalo, že zlepšený postup nebude dopracován tak rychle, aby mohl být do plánovaného termínu podání žádosti o registraci (2 roky) zvalidován.

Při obraně změny procesu výroby substance bylo zdůrazňováno, že zjednodušený „(*R*)“-proces je založen na stejných chemických reakcích jako „(*R,R*)“-proces. Dále bylo třeba doložit, že hydrogenolytické odštěpení benzylskupiny při „(*R,R*)“-procesu nepřináší navíc žádný čistící krok, kterým by byly odstraněny případné nečistoty produktu.

Změna procesu byla nakonec odpovědnými pracovníky akceptována a dokumentačně zvládnuta. Registrační oddělení přitom dbalo na to, aby byl k dispozici dostatek analytických i farmaceutických dat prokazujících, že produkty připravené oběma procesy jsou shodné a plně bioekvivalentní a že změny výrobního procesu nemají v žádném případě za následek zhoršení jakosti a bezpečnosti dilevalolu. FDA proto změny, k nimž došlo mezi podáním žádosti o povolení klinických zkoušek a žádosti o registraci a povolení uvedení přípravku na trh akceptovala a nové zkoušky nepovažovala.

Při optimalizaci „(*R*)“-procesu, která byla prováděna v době probíhajícího registračního řízení pak byly provedeny některé další změny. Tyto malé změny FDA nakonec akceptovala, aniž by firmu Schering-Plough nějakým způsobem potrestala nebo registraci oddálila. Je však otázkou, zda by v současnosti, po zpřísnění požadavků na řízení změn, byly podobné změny v průběhu registrace možné.

Šlo o tyto změny:

1. Použití toluenu s *n*-butanolem jako média pro reakci 5-brom-ASA s (*R*)-aminem v prvním reakčním stupni, čímž byl minimalizován rozsah manipulací s pevnými produkty
2. Náhrada kyseliny solné za kyselinu sírovou při okyselení na pH 4,5 po skončené redukci, čímž bylo sníženo riziko koroze zařízení a kontaminace produktu ionty železa.
3. Změna teplot při výrobě DBTA soli. Nejprve byla při rozpouštění zvýšena teplota z 50°C na 55-60°C a při krystalizaci byl roztok ochlazen jen na 25-45°C místo na 0-5°C. To mělo sice za následek snížení výtěžku, ale produkt měl vyšší optickou čistotu. Předepsaná optická čistota však nebyla dosažena vždy, řada šarží nevyhověla a musela být přepracována rekrystalizací. Na základě technicko-ekonomického posouzení výsledků dospěli technologové k názoru, že bude nejvhodnější se vrátit k dokončení krystalizace soli při 0-5°C a rekrystalovat každou šarží. V tomto případě se zlepšila jak výtěžnost, tak i kvalita produktu. FDA však měla k této změně výhrady, které jsou zmíněny níže.
4. Při přepracování nevyhovujících šarží DBTA soli dilevalolu bylo původní převedení soli na volnou bázi a opětné vysrážení DBTA nahrazeno rekrystalizací soli z vlhkého *n*-butanolu. Po rekrystalizaci byl získán čistší produkt než při přesrážení.
5. Doladění teplot při precipitaci dilevalol hydrochloridu z MBIK – místo při 25°C byla kyselina solná přidávána k roztoku dilevalolu při 50-60°C.

V průběhu registračního řízení bylo dokončeno zpracování výrobní dokumentace odpovídající požadavkům SVP, včetně dokladů o proškolení operátorů i vedoucích výroby, záznamů o výrobě šarže, technologických reglementů, postupů čištění výrobních prostor a zařízení, analytických postupů, kvalifikačních a validačních protokolů, protokolů o kalibraci měřicích zařízení a čidel, plánů kontroly a údržby zařízení a konečně plánu interních auditů a monitoringu.

Výsledkem první inspekce FDA, která předcházela povolení dilevalol hydrochloridu, bylo, že firma Schering-Plough obdržela firmu vytýkáci dopis FDA. Firma se domnívala, že bez problému obhájí změnu postupu, kdy byla krystalizace DBTA dokončena ochlazením na 0-5°C, aby se zvýšil výtěžek s tím, že produkt bude vždy rekrystalován (změna č. 3). Rekrystalizace byla pro přepracování nevyhovujících šarží popsána již v dosavadní dokumentaci, takže ji firma Schering-Plough nepovažovala za změnu postupu. FDA však byla opačného názoru. Agentura konstatovala, že zavedení rekrystalizace **každé** šarže DBTA soli dilevalolu změnou postupu je. Podle FDA nemá počet nevyhovujících šarží překročit 10%, po chlazení na 0°C však vlastně nevyhověla žádná šarže. Námitka FDA proto byla oprávněná. Skutečnost, že konečný krystalický produkt měl vyšší čistotu než dříve, bylo podle FDA sice příznivé, ale tuto skutečnost bylo třeba považovat za podružnou s ohledem na přesné znění registrační dokumentace. Řešení problému pak bylo nalezeno v sepsání dodatku k registrační dokumentaci, v němž byla změna podrobně zdůvodněna a dosažení vyšší jakosti bylo doloženo přehledem analytických dat před a po změně. Teprve poté FDA změnu postupu akceptovala.

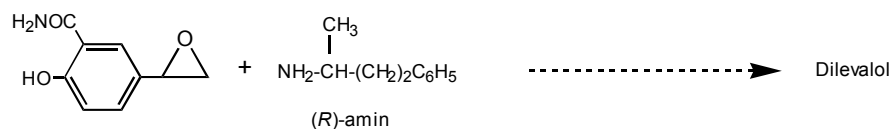
8. Další práce na vývoji procesu výroby

V době povolování přípravku byly zahájeny některé další aktivity s cílem bylo ještě dále zlepšit nákladovost výroby. Tyto aktivity byly organizovány jak u externích dodavatelů, tak přímo ve firmě Schering-Plough.

V případě externích dodavatelů šlo o firmu Celgene, která se snažila zlepšit ekonomiku a snížit cenu (*R*)-aminu enzymatickou rezolucí. K rezoluci byly použity bakterie *Bacillus megatherium*, které obsahují transaminasu převádějící selektivně (*S*)-enantiomer na keton. Výsledky byly uspokojivé a postup dospěl do stadia poloprovozních zkoušek. Pak však byl další vývoj u externího dodavatele zastaven, protože se dilevalol přestal vyrábět.

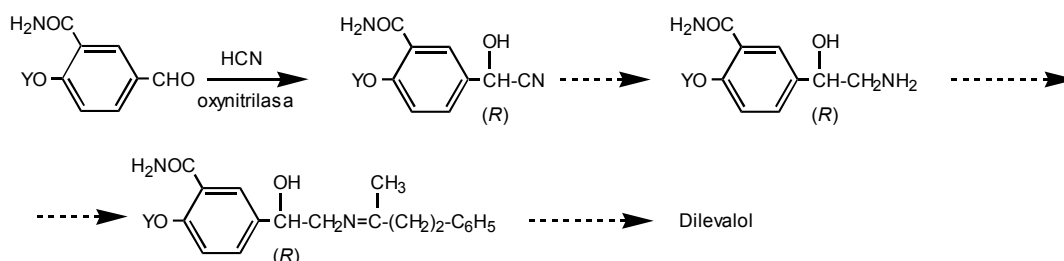
Hlavní nevýhodou i u zjednodušeného postupu výroby dilevalolu byla skutečnost, že se nepodařilo eliminovat klasickou optickou rezolucí. I když regenerace dibenzoylvinové kyseliny a racemizace (*S,R*)-diastereomeru na směs (*S,R*) + (*R,R*) umožnila dosažení vcelku příznivých nákladů, vývojoví pracovníci předpokládali, že by bylo mnohem elegantnější a nákladově výhodnější nahradit optickou rezolucí stereospecifickou syntézou probíhající s vysokým optickým výtěžkem.

Jednou z potenciálních možností asymetrické syntézy byla reakce:



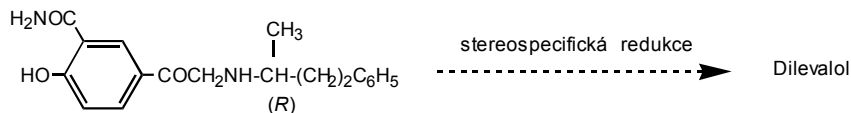
Epoxid byl připraven ve výborném výtěžku, pro přípravu produktu s požadovanou konfigurací (ee > 98%) však bylo třeba používat drahé reagenty, čímž by byly znehodnoceny výhody přímé syntézy. Postup proto byl považován za neperspektivní a další práce na jeho vývoji byly zastaveny.

Další potenciální přímá asymetrická syntéza vycházela z aldehydu. Enzymem oxynitrilasou katalyzovaná adice kyanovodíku měla poskytnout (*R*)-kyanohydrin, který by byl v dalším stupni redukován na amin, z toho připravena Schiffova báze a ta redukována na dilevalol.



Při modelových experimentech narazili vývojoví pracovníci na nečekaný problém s redukcí kyanhydrinu. Pokud byla hydroxylová skupina chráněna *tert*-butyldimethylsilylací probíhala redukce na amin dobře. V případě, že však zůstala volná, byl produktem redukce derivát benzylalkoholu. Důvodem patrně bylo, že kyanohydrin byl v tomto případě v rovnováze s aldehydem, který pak byl redukován. Vzhledem k nutnosti chránit hydroxylovou skupinu přestala být tato cesta zajímavá a nebyla dále propracována.

Jako jediná schůdná alternativa se proto jevila možnost postupovat v prvním stupni shodně s (*R*)-procesem, ale pak provést redukci ketoskupiny stereospecificky tak, aby přímo rezultoval (*R,R*)-diastereomer.



Redukce využívající Itsunoův postup (redukce chirálními komplexy boranu, např. komplexu (*R*)-difenylvalinolu s boranem) by nebyla ekonomická, protože komplexu by musel být použit velký přebytek. Navíc redukce zprvu dobře neprobíhala. Pozornost vývojových pracovníků se proto soustředila na možnost biotransformace.

Pro biotransformaci bylo vyzkoušeno několik kmenů bakterií a plísní, o nichž bylo známo, že jsou schopné redukovat ketoskupinu na chirální alkohol. Práce s běžnými kmeny ze sbírek mikroorganismů nebyla úspěšná, podařilo se však izolovat plíseň *Aspergillus niveus*, která byla schopna ketoester redukovat. Jako zajímavost lze uvést, že izolát byl získán ze vzorku zeminy ze čtyřmetrového výkopu. Použití izolované plísně a pak i některých podobných kmenů *Aspergillus* ke stereospecifické redukci bylo zapatentováno.

Biologická redukce byla prováděna inkubací ketoesteru s kulturou plísně při 26-35°C a neutrálním pH po dobu 80-110 hodin, pak byl vzniklý dilevalol nasorbován na iontoměnič, desorbován, extrahován do methylisobutylketonu a přidávkem kyseliny solné byl vysrážen dilevalol hydrochlorid. Celkový výtěžek činil 68-70%. To bylo velmi příznivé, na druhé straně se však při využití mikrobiální redukce poněkud změnil profil nečistot. S ohledem na požadavky FDA bylo nutné zařadit do izolačního procesu ultrafiltraci, aby bylo zaručeno že, se do konečného produktu nemohou dostat citrinin a některé alergenní proteiny.

V této fázi práce však byl další vývoj zastaven, protože vedení fy Schering-Plough rozhodlo o stažení dilevalolu z trhu.

9. Stažení hydrochloridu dilevalolu z trhu

Dilevalol hydrochlorid byl klinicky zkoušen u cca 10 tis. pacientů a při klinických zkouškách nebyly zaznamenány v podstatě žádné výrazné vedlejší účinky, i když přitom byla mj. věnována značná pozornost hepatotoxicitě přípravku. Na základě výsledků klinických zkoušek byla v řadě zemí podána žádost o registraci a povolení dilevalol hydrochloridu

První země, které povolily uvedení přípravku na trh byly Japonsko a Portugalsko. Tam byl dilevalol hydrochlorid předepsán celkem 176 tis. pacientů. V průběhu farmakovigilance, sledování nežádoucích účinků, bylo během prvního roku zaznamenáno 34 případů poškození jater pacientů projevujících se žloutenkou, tmavým zbarvením moči, nevolností a zvracením a únavou. Ve většině případů bylo poškození jater reversibilní a po vysazení přípravku se funkce jater normalizovala, u dvou pacientů však došlo k úplnému selhání jater a smrti.

Dilevalol byl srovnáván s labetalolem, který obsahuje 25% dilevalolu a u něhož byly k dispozici několikaleté výsledky. U labetalolu bylo za 7 let zaznamenáno celkem 80 jaterních příhod, z toho žádná s fatálními dopady. Obě látky tedy vykazovaly odlišnou hepatotoxicitu, přičemž vedlejší účinek optického isomeru byl výrazně vyšší než účinek racemátu. Na základě porovnání vedlejších účinků obou přípravků rozhodlo vedení fy Schering-Plough o stažení dilevalol hydrochloridu z japonského a portugalského trhu a stažení žádostí o registraci přípravku v dalších zemích s tím, že na trhu zůstane nadále jen labetalol.

U mnoha racemických léčiv, jejichž optické isomery jsou účinnější než racemát dochází k náhradě racemátu za chirální produkt („racemic switch“). Pomineme-li patentoprávní aspekty, pak hlavním důvodem této náhrady je vyšší účinnost. Ta umožňuje snížit dávku léčiva a tím omezit vedlejší účinky. Stažení dilevalol hydrochloridu je jediným známým případem, kdy cíleně připravovaný chirální produkt vykazoval naopak vyšší toxicitu, což vedlo k tomu, že přednost byla dána racemátu.