

# **Nalezení požadovaného polymorfu významné farmaceutické substance**

Bc. Kateřina Táborská

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav biochemie a analýzy potravin  
akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina TÁBORSKÁ**  
Osobní číslo: **T09564**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Nalezení požadovaného polymorfu významné farmaceutické substance**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární reserši zahrnující krystalografii látek, stručný úvod do farmakologie, výzkumu a vývoje léčiv.
2. Charakterizujte polymorf imatinib mesylát.
3. Připravte žádaný polymorf.
4. Vyhodnoťte výsledky experimentů a sepište diplomovou práci.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] KRATOCHVÍL, B., JENŠOVSKÝ, L. Úvod do krystalochemie. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1987, 240 s.

[2] MUCK, A. Symetrie krystalů a vibrační spektra. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1987, 272 s.

[3] HAMPL, F., RÁDL, S., PALEČEK, J. Farmakochemie. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2007, 450 s.

[4] KUCHAR, M. Vývoj a výzkum léčiv. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008, 168 s.

[5] Využití databází Chemical Abstracts, ScienceDirect a PubMed.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*Hlaváček*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

*Fišera*

Příjmení a jméno: TABORSKA' KATEŽINA

Obor: THEVP

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 17. 5. 2011

Kateřina

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídnou k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce v teoretické části pojednává o krystalické struktuře látek, léčivech a jejich účinku, výzkumu, vývoji a registraci. Posledním tématem tohoto oddílu je aktivní farmaceutická substance – imatinib mesylát. Objev této látky zaznamenal jistý pokrok v terapii nádorových onemocnění.

Praktická část je zaměřena na optimalizaci výroby imatinib mesylátu. V první řadě byly provedeny srovnávací pokusy, kde byly měněny jednotlivé podmínky přípravy. Následně byly provedeny experimenty, jež se soustředily zejména na obsah vody a dobu refluxu. Jako optimální se jevil obsah vody 2,25 % a doba refluxu 18 minut. Taktéž byly provedeny pokusy, které měly za úkol potvrdit nově získané poznatky.

Klíčová slova: polymorfismus, imatinib mesylát, CML, GIST

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deals about crystal structure, drugs and their cause, research, development and registration in theoretical part. Last theme of this part is an active pharmaceutical ingredient – imatinib mesylate. Imatinib mesylate discovery has brought an important progress in malignant diseases therapy.

Practical part is focused on optimizing of imatinib mesylate production. First of all there were done comparative experiments, where particular conditions of process were changed. It was followed by experiments, which was concerned on amount of water and stirring time at reflux after seeding. Amount of water 2,25 % and 18 minutes of stirring time at reflux were seemed as optimal. Of course there were done experiments, which should confirm new data.

Keywords: polymorfism, imatinib mesylate, CML, GIST

V první řadě bych chtěla poděkovat firmě Synthron s.r.o, že mi umožnila provést „výzkum“ na téma imatinib mesylát. Dále bych chtěla poděkovat pánům, Ing. Petrovi Krajčovičovi a Ing. Radomírovi Skoumalovi, za to, že se zasadili o to, aby mi výše zmíněná firma povolila pracovat na dané téma. Můj velký dík patří i Ing. Antonínu Mahovskému, který mi velmi pomohl při vykonávání laboratorní práce. Chci také poděkovat i dalším pracovníkům firmy Synthron s.r.o., kteří mi pomáhali a podporovali mě.

Nesmím opomenout mého vedoucího práce, Ing. Romana Kimmela Ph.D., který mi věnoval spoustu svého času, také mu děkuji za jeho cenné a odborné rady, a také za to, že pomohl mi převést myšlenky na papír. Proto patří můj veliký dík také jemu.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat mým rodičům a všem blízkým, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali.

*Motto: "Dřevěné uhlí a diamant jsou stejným prvkem, a přece jsou tak rozdílné"*

*\*Friedrich Hardenberg von Novalis\**

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1 KRYSTALOGRAFIE</b> .....   | <b>11</b> |
| 1.1 KRYSTALICKÁ STRUKTURA LÁTEK .....                                   | 12        |
| 1.2 MOLEKULOVÉ KRYSTALY .....   | 13        |
| 1.2.1 Polymorfismus .....   | 14        |
| <b>2 LÉČIVA</b> .....   | <b>17</b> |
| 2.1 ORIGINÁLNÍ A GENERICKÁ LÉČIVA .....                                 | 17        |
| 2.2 FARMAKODYNAMIKA .....   | 18        |
| 2.3 FARMAKOKINETIKA .....   | 18        |
| 2.4 VÝVOJ NOVÝCH LÉČIV .....  | 20        |
| 2.4.1 Preklinický výzkum .....  | 21        |
| 2.4.2 Klinické hodnocení léčiv.....                                     | 22        |
| 2.5 REGISTRACE LÉČIV .....  | 24        |
| 2.5.1 Dokumentace potřebná k registraci.....                            | 24        |
| <b>3 IMATINIB MESYLÁT</b> .....   | <b>26</b> |
| 3.1 FORMY IMATINIB MESYLÁTU.....  | 28        |
| 3.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti imatinib mesylátu .....           | 28        |
| 3.1.2 Stručný popis použitých metod využitých pro analýzu produktů..... | 29        |
| 3.2 SYNTÉZA MOLEKULY IMATINIBU.....                                     | 32        |
| 3.3 PŘÍPRAVA MOLEKULY IMATINIB MESYLÁTU.....                            | 34        |
| 3.3.1 Příprava $\alpha$ -polymorfu .....                                | 34        |
| 3.3.2 Příprava $\beta$ -polymorfu .....                                 | 35        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4 STANOVENÍ CÍLŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....                           | <b>37</b> |
| <b>5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....                                      | <b>38</b> |
| 5.1 PŘÍPRAVA $\alpha$ -POLYMERU IMATINIB MESYLÁTU .....                 | 38        |
| 5.2 PŘÍPRAVA OČKOVACÍCH LÁTEK 1, 2, 3 .....                             | 39        |
| <b>6 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....                                       | <b>40</b> |
| <b>ZÁVĚR</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....                                  | <b>53</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....                         | <b>58</b> |
| <b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>SEZNAM SCHÉMÁT</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>SEZNAM TABULEK</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....  | <b>62</b> |



## ÚVOD

Antineoplastické látky se užívají k léčbě maligních nemocí. Ačkoli ne vždy dojde k naprostému vyléčení pacienta, velmi často zpomalí průběh nemoci a zastaví vznik dalších metastáz. V současné době se takovýto proces nazývá chemoterapie.

Imatinib mesylát, který patří do poměrně velké skupiny antineoplastických látek, je poměrně novým léčivem. Byl vyvinut pro terapii chronické myeloidní leukémie. Až pozdější testy zjistily, že úspěchu dosahuje také při léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru nebo akutní lymfoblastické leukémii.

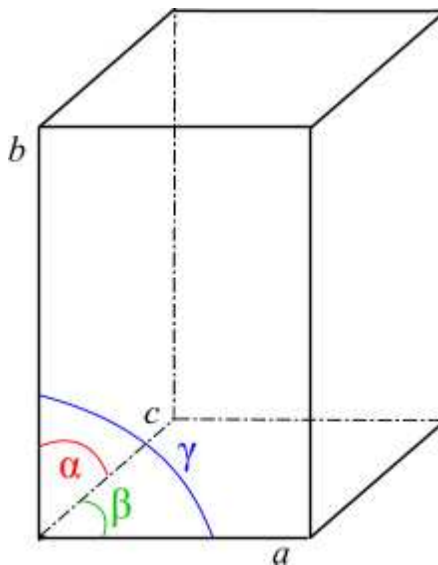
Tato práce se zabývá optimalizací výrobních podmínek mesylátu. Po ukončení vývojové etapy ve farmaceutické firmě Synthon s.r.o., která se zabývá vývojem generických léčiv, byla provedena výroba registračních šarží imatinib mesylátu a proces byl následně schválen. Dále byl výrobní proces přeměrován do jiných laboratoří společnosti Synthon s.r.o. Zde se po úspěšné výrobě ověřovacích šaržích všech syntetických stupňů vyskytly neočekávané problémy, kdy při výrobě validačních šarží finálního stupně (imatinib mesylátu) byly zaznamenány poměrně špatné výsledky při výstupní analýze. Ačkoliv byly výrobní postupy shodné, jedna vyrobená šarže nevyhovovala z hlediska polymorfní struktury (obsahovala více jak 50 % polymorfu beta), u dalších dvou šarží byla limitní hranice polymorfu alfa splněna (min. 50 %), ovšem z hlediska čistoty dané látky byly i tyto výsledky neuspokojivé. Jednou z možných příčin bylo použití již vyrobeného imatinib mesylátu jako očkovací látky, a to i přestože jej XRPD analýza klasifikovala jako čistý alfa polymorf.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KRYSTALOGRAFIE

Krystaly jsou přirozeně vznikající tělesa, která se vyznačují geometrickým tvarem a rovinnými plochami.<sup>1</sup> Rozeznáváme dva typy krystalů, které se označují jako ideální a reálný krystal. Ideální krystal je nekonečný, jeho struktura je zcela pravidelná a bez defektů. Můžeme jej charakterizovat pravidelným opakováním základního motivu tvořeného jedním nebo více atomy v trojrozměrném prostoru.<sup>2</sup> Ideální krystal ovšem jako takový neexistuje, pouze nám pomáhá definovat krystal reálný. Tato reálná struktura je vždy vzhledem k ideální určitým způsobem narušena. Za poruchy můžeme označit jakoukoli odchylku od dokonalé periodičnosti.<sup>5</sup>

Nejmenší geometrický útvar, jehož opakováním lze vytvořit celou krystalovou mřížku, nazýváme základní (elementární) buňkou. Elementární buňka je určena parametry mřížky (**Obrázek 1**), tzn. třemi úseky  $a$ ,  $b$ ,  $c$  na souřadných osách  $x$ ,  $y$ ,  $z$  a třemi úhly  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  mezi souřadnými osami,<sup>3,4</sup> přičemž úhel  $\alpha$  leží mezi hranami  $b$ ,  $c$ , úhel  $\beta$  mezi hranami  $a$ ,  $c$  a úhel  $\gamma$  mezi hranami  $a$ ,  $b$ .<sup>5</sup>



**Obrázek 1.** Parametry mřížky  $a$ ,  $b$ ,  $c$  a jim příslušné úhly  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

Celkem rozlišujeme 7 základních krystalografických soustav (**Tabulka 1**) a v nich celkem 14 typů základních buněk.

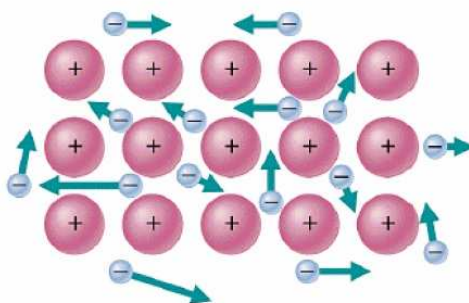
Tabulka 1. Krystalografické soustavy.<sup>3</sup>

| Soustava                     | Elementární buňka   | Příklad                                  |
|------------------------------|---|--|
| triklinická (trojklonná)     | $a \neq b \neq c$<br>$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$    | $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| monoklinická (jednoklonná)   | $a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = 90^\circ \neq \gamma$          | $\text{CaSO}_4$                          |
| ortorombická (kosočtverečná) | $a \neq b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$             | $\text{KNO}_3, \text{K}_2\text{SO}_4$    |
| tetragonální (čtverečná)     | $a = b \neq c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$                | $\text{SnO}_2, \text{TiO}_2$             |
| kubická (čtverečná)          | $a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$                   | $\text{NaCl}$ , diamant                  |
| hexagonální (šesterečná)     | $a = b \neq c$<br>$\alpha = \beta = 90^\circ$<br>$\gamma = 120^\circ$ | zinek, magnesium                         |
| romboedrická (trigonální)    | $a = b = c$<br>$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$                | kalцит, křemen                           |

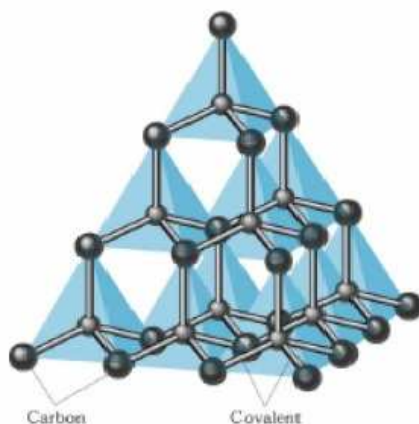
## 1.1 Krystalická struktura látek

Krystalovou strukturou nazýváme pravidelné uspořádání stavebních částic v prostoru.<sup>6</sup> Stabilita jednotlivých krystalů je dána jednotlivými vazbami mezi částicemi. Tyto částice mohou být atomy, ionty nebo molekuly. Na základě vazeb a vazebných částic rozlišujeme<sup>1</sup> pět typů krystalových struktur:

- **molekulové krystaly** – molekuly jsou drženy pohromadě především Van der Waalsovými interakcemi (např. molekuly jodu či krystaly vzácných plynů)
- **iontové krystaly** – kationty a anionty jsou vázány elektrostatickými silami, nevedou elektrický proud (vodivé bývají až v roztocích – např.  $\text{NaCl}$  a  $\text{AgCl}$ )
- **krystaly s kovovou vazbou** – základ je tvořen kationty kovu, mezi kterými se volně pohybují valenční elektrony všech atomů kovů (**Obrázek 2**), např.  $\text{Cu}$ ,  $\text{Mg}$  nebo  $\text{Ca}$

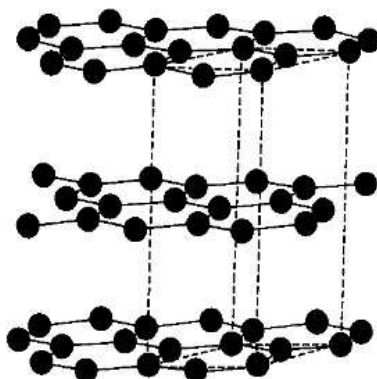
Obrázek 2. Krystaly s kovovou vazbou.<sup>7</sup>

- *atomové krystaly* – obrovské zesíťované makromolekuly, kde jsou jednotlivé atomy vázány kovaletní vazbou (**Obrázek 3**), např. diamant



**Obrázek 3.** Atomové krystaly.<sup>7</sup>

- *vrstevnaté krystaly* – krystaly jsou tvořeny vrstvami atomů, které jsou vázány kovaletními vazbami; vrstvy jsou následně vzájemně poutány Van der Waalsovými silami (**Obrázek 4**), např. grafit



**Obrázek 4.** Vrstevnaté krystaly.<sup>8</sup>

## 1.2 Molekulové krystaly

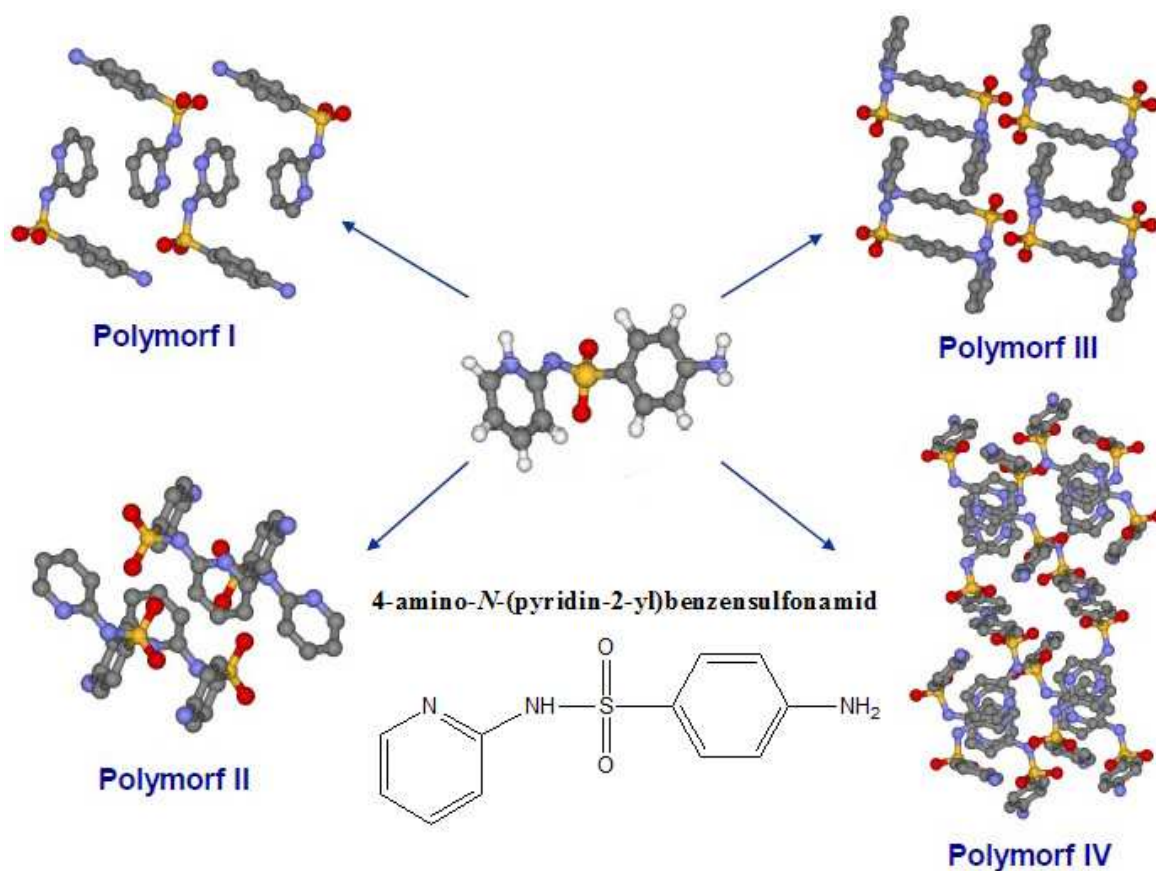
Základními stavebními jednotkami jsou molekuly. Do této skupiny můžeme především zahrnout organické sloučeniny, ale patří zde i několik anorganických složek a sloučenin (např. kyslík, dusík, či sloučeniny dusíku nebo fosforu).<sup>9</sup> Mezi hlavní představitele organických sloučenin patří farmaceutické substance. Tyto molekuly mají složitý a taktéž někdy proměnný tvar. Jejich uspořádání je výsledkem mnoha mezimolekulárních interakcí, proto je jejich krystalizační proces složitý. V rámci jedné

molekuly je uplatňována silná kovaletní vazba, která určuje konstituci a tvar molekuly. Mezimolekulární interakce řídí prostorové uspořádání molekul v celém krystalu.<sup>10</sup>

Mezimolekulární interakce lze rozdělit na specifické (vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce) a nespecifické (dispersní síly), směrové (dipól-dipól) a nesměrové (coulombické) a v posledním případě na slabé (do  $10^1$  kJmol), středně silné ( $10^1$  do  $10^2$  kJmol), silné (od  $10^2$  kJmol).<sup>10</sup>

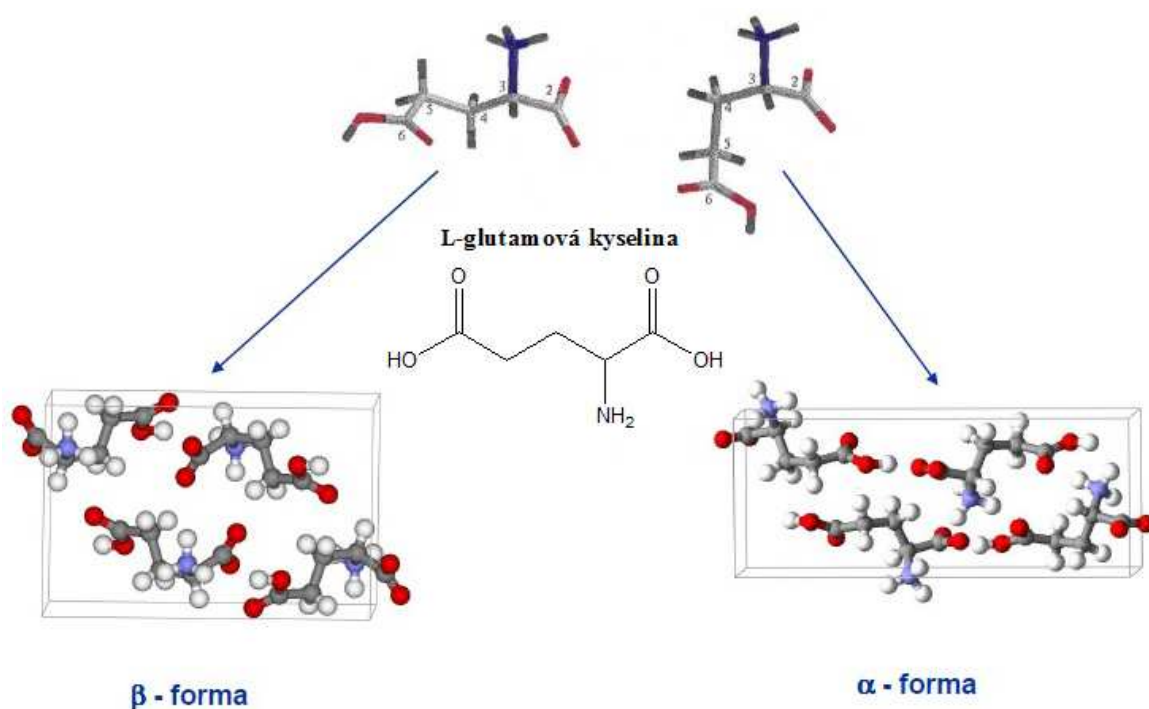
### 1.2.1 Polymorfismus

Definice polymorfismu říká, že jedna a táž molekula, může v závislosti na krystalizačních podmínkách vykristalizovat ve více krystalových strukturách neboli polymorfech.<sup>11</sup> Rozlišujeme dva základní strukturní typy polymorfismu molekulárních krystalů – pakovací a konformační. V prvním případě je molekula rigidní a polymorfy se liší pouze jejím pakováním v krystalu (**Obrázek 5**).



**Obrázek 5.** Pakovací molekuly sulfapyridinu.<sup>12</sup>

U konformačního typu je molekula flexibilní a tvoří konformery (izomery, jejichž atomy, popř. skupiny, mohou volně rotovat kolem svých vazeb), které mohou vykristalizovat v odlišných strukturách. Konformery mohou následně v sebe vzájemně přecházet, přičemž rozdíly jednotlivých energetických stavů jsou velmi malé, a proto je obtížné jejich dělení. Takovým příkladem může být kyselina L-glutamová (**Obrázek 6**).<sup>12</sup>



**Obrázek 6.** Konformery kyseliny L-glutamové.<sup>12</sup>

Počet polymorfů molekulárního krystalu je teoreticky dán počtem možností vytvářet slabé interakce v krystalu.<sup>11</sup> Ke stanovení polymorfů v aktivní substanci a v lékové formě se využívají<sup>11,12</sup> různé analytické techniky:

- rentgenová prášková analýza
- spektroskopie pevného stavu: nukleární magnetická rezonance, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie
- termální analýza
- mikroskopie – optická, termooptická
- mikrometrie – granulometrie, porozita, hustota
- stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti
- (de)sorpce vlhkosti

Zejména ve farmacii hraje polymorfismus důležitou roli, protože polymorfy mohou mít odlišné vlastnosti (např. různá rozpouštěcí rychlost). Vznik polymorfů je ovlivněn<sup>11</sup>:

- teplotou a tlakem při krystalizaci
- rychlostí odpaření rozpouštědla
- rychlostí a stupněm ochlazení roztoku
- obsahem vody
- přítomností nečistot a cizích iontů v roztoku
- dobou krystalizace
- stupněm přesycení roztoku
- dobou stání produktu v matečném louhu
- rozpouštědlem a jeho polaritou
- pH roztoku
- koncentračními a teplotními gradienty v roztoku
- intenzitou míchání roztoku
- ultrazvukem, mikrovlnami či laserovými paprsky

Polymorfnní přeměny mohou být dvojího druhu: vratné (enantiotropní) nebo nevratné (monotropní). Právě nekontrolovatelné polymorfnní přechody bývají označovány jako neštěstí farmacie, proto je důležité se zaměřit i na jednotlivé úseky farmaceutické výroby, kdy by mohlo potenciálně docházet k polymorfnní přeměně.<sup>11,12</sup> Mezi tyto úseky patří:

- finální krystalizace aktivní substance
- dlouhodobé stání produktu v matečném roztoku
- sušení produktu
- mikronizace (homogenizace)
- vlhká granulace
- tabletae

Těmto přechodům lze částečně zabránit jednak výběrem nejstabilnějšího polymorfu či nejstabilnějšího solvátu, dále výběrem solí místo báze v neposlední řadě přísnou technologickou kázní (např. sterilní filtrace).<sup>11</sup>



## 2 LÉČIVA

Za léčiva jsou označovány léčivé látky nebo jejich směsi anebo léčivé přípravky. Léčivé látky (substance) jsou přírodního nebo syntetického původu mající farmakologický či imunologický účinek nebo jsou to látky, které ovlivňují metabolismus. V současnosti se pro tyto substance používá ve farmacii zkratka API, která pochází z anglického Active Pharmaceutical Ingredient. Naproti tomu léčivé přípravky jsou produkty získané technologickým zpracováním léčivých látek a pomocných látek (nemají vlastní léčebný účinek) do lékových forem. Přípravky lze rozdělit do dvou skupin a to na humánní (určeno lidem) a veterinární (určeno zvířatům).<sup>13</sup>

### 2.1 Originální a generická léčiva

Z hlediska původu můžeme léčiva klasifikovat buď jako originální nebo jako generická. Originální léčivo je výsledkem dlouhodobého výzkumu, a proto si je farmaceutické společnosti nechávají patentovat či využívají jiné ochrany. Bývají významným pokrokem v medicínské praxi, ovšem v jejich ceně se často odráží vysoké náklady na výzkum a vývoj. Po uplynutí patentové popř. nějaké další ochrany, je léčivo označeno jako „volné“ a tudíž jej mohou vyrábět i ostatní firmy. Tyto „kopie“ jsou pak označovány jako generická léčiva (generika). Oba druhy léčiv musí vyhovovat přísným pravidlům registračních autorit, které rozhodují o přístupu do klinické praxe. V jednotlivých státech jsou to národní úřady pro registraci léčiv, v Evropské unii, je to mezinárodní organizace EMEA (European Medicinal Association) a v USA registraci léčiv povoluje FDA (Food and Drug Administration). Originální a generická léčiva musí<sup>14</sup> mít shodné následující znaky:

- aktivní substance – identická jak po kvalitativní tak i po kvantitativní stránce
- léková forma – totožné složení, množství API a způsob podání
- biologická dostupnost
- terapeutický účinek

Naopak generická a originální léčiva se liší v těchto bodech:

- náklady na výzkum a vývoj – u originálních léčiv činí částky na výzkum a vývoj stovky milionů US dolarů, v případě generik se částka pohybuje pouze v jednotkách milionů
- vztah k patentové ochraně

- cena API a lékové formy – v prvním roce prodeje je cena generik až o 30 % nižší než u originálních léčiv, v následujících dvou letech klesá cena až na polovinu, další léta se cena těchto léčiv mění jen velmi málo

## 2.2 Farmakodynamika

Farmakodynamika je věda, která se zabývá mechanismem účinku léčiv.<sup>15</sup> Tento účinek je buď důsledkem interakce léčiv se specifickými biopolymery v organismu (tzv. receptory), v případě nespecifického účinku se využívá fyzikálně-chemických vlastností (např. látky upravující pH žaludečních šťáv).

U specifického mechanismu účinku jsou receptory spojeny s efekty, což jsou systémy, které se aktivují po obsazení receptoru specifickou látkou a které zajišťují přenos signálu a jeho transformaci na příslušnou odezvu. Navázání léčiva na receptor je umožněno různými interakcemi, např. elektrostatické síly, vodíkové můstky, hydrofóbní interakce či Van der Waalovy síly. Po navázání receptoru na biopolymer dojde k jeho konformaci a tím i změně vlastností, čímž jsou zahájeny biochemické procesy vedoucí k buněčné odezvě. Účinek léčiva je závislý na mnoha okolnostech. Především po vytvoření komplexu na schopnosti vyvolání odezvy (vnitřní aktivita léčiva). Škála účinku bývá velmi široká, od naprosto identické odezvy jako u přirozených ligandů (hormony, neurotransmitéry, ...), až po případy, kdy vazba na receptor nevyvolá žádnou odezvu. Dalším důležitým faktorem je afinita léčiva k receptoru, tím je určena koncentrace léčiva, která je potřebná k vytvoření dostatečného množství komplexů léčivo-receptor pro dosažení požadované odezvy.<sup>13</sup>

## 2.3 Farmakokinetika

Tato část farmakologie se zabývá popisem osudu léčiv v organismu v čase od podání léku do jeho eliminace v organismu. Vychází z časového průběhu koncentrace léčiv a jejich metabolitů v biologických tekutinách.<sup>16</sup>

Osud léčiva v organismu lze rozdělit do tří fází: farmaceutická, farmakokinetická a farmakodynamická. V první fázi je uvolňována účinná látka z lékové formy, ve druhé je léčivo vystaveno působení organismu a v poslední fázi dochází k interakci mezi léčivem a cílovou strukturou (receptor).<sup>17</sup>

Transport těchto látek je zajišťován krevním oběhem, proto je důležité, aby tyto látky byly buď rozpustné ve vodě, nebo aby byly schopné se navázat na bílkovinu krevní plazmy.

K jednotlivým cílovým strukturám je látka dopravována prostřednictvím pasivní difuze, filtrace, aktivním transportem a pinocytózou (za předpokladu překonávání bariér = biologické membrány).<sup>16</sup>

Absorpcí jsou označovány procesy, které zajišťují transport rozpuštěného léčiva z místa podání do krve. Rychlost a míra absorpce záleží na místě a cestě podání. Rozlišujeme lokální a celkové podání. Lokálně se podávají například emulze, suspenze, masti nebo zásypy, které se aplikují na kůži, sliznici či do tělních dutin. Takto podávaná léčiva mají pouze místní účinek a absorpce dosahuje jen velmi nízkého stupně. Naproti tomu celkové podání je určeno pro systémový účinek buď celého tělesného systému nebo jeho částí. Účinek je dán rychlostí absorpce a podílem podané dávky vstřebeného do oběhu. Do této skupiny se řadí enterální a parenterální cesty.<sup>16</sup>

Dalším důležitým jevem je distribuce léčiva neboli obousměrný transport léčiva mezi krevním řečištěm a tělesnými orgány nebo tkáněmi. Distribuci lze hodnotit ze dvou hledisek a to:

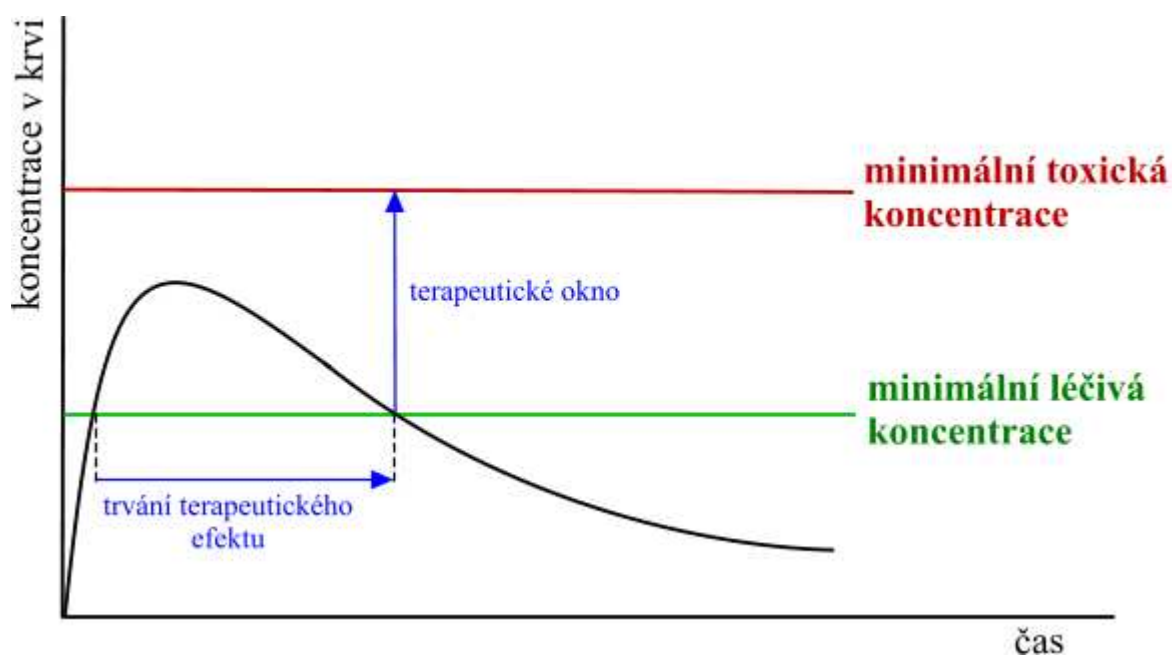
- jako dynamický děj, kdy nás zajímá rychlost, s jakou je léčivo distribuováno do jednotlivých částí organismu
- jako rovnovážný stav tímto dějem vytvořený, tj. rozsah distribuce, který je charakterizovaný rovnovážnými koncentracemi léčiva v různých částech organismu.

O distribuci rozhodují nejen fyzikálně-chemické vlastnosti, ale také rychlost perfuze tkání a orgánů krví.<sup>18,19</sup>

Na léčiva působí v organismu nesčetné množství enzymových reakcí. Dochází k jejich přeměně s cílem vzniku látek lépe rozpustných ve vodě, a tím snáze vylučitelných z organismu.<sup>20</sup> Při biotransformaci také může dojít ke vzniku metabolitu, který vykazuje stejný či podobný účinek jako původní látka. Častějším jevy jsou přeměny vedoucí ke vzniku biologicky neúčinné látky nebo naopak přeměny, kdy se účinek dané látky posílí. Jsou ale také známy i případy, kdy metabolickými přeměnami vznikly látky toxické.<sup>13</sup>

Clearance je veličina vyjadřující schopnost organismu eliminovat příslušnou látku, a je závislá na rychlostní konstantě eliminace příslušné látky ze systému a na distribučním objemu (objem kompartmentu, ve kterém sledujeme příslušnou eliminaci). Kompartement je prostor, v jehož celém objemu jsou pohyb a chování léčiv konstantní<sup>21</sup> (např. plazma). Schopnost eliminace léčiva z organismu může být také označována jako biologický poločas, což je doba, za kterou klesne koncentrace léčiva v oběhu na polovinu počáteční hodnoty.<sup>22</sup>

Úspěch léčby je podmíněn udržením vhodné koncentrace léčiva v krevním oběhu po určitou dobu. Tato koncentrace (**Obrázek 7**) by měla být v rámci možností ustálená, ale hlavně by měla být vyšší než je tzv. minimální efektivní (léčivá) koncentrace a nižší než tzv. minimální toxická koncentrace.



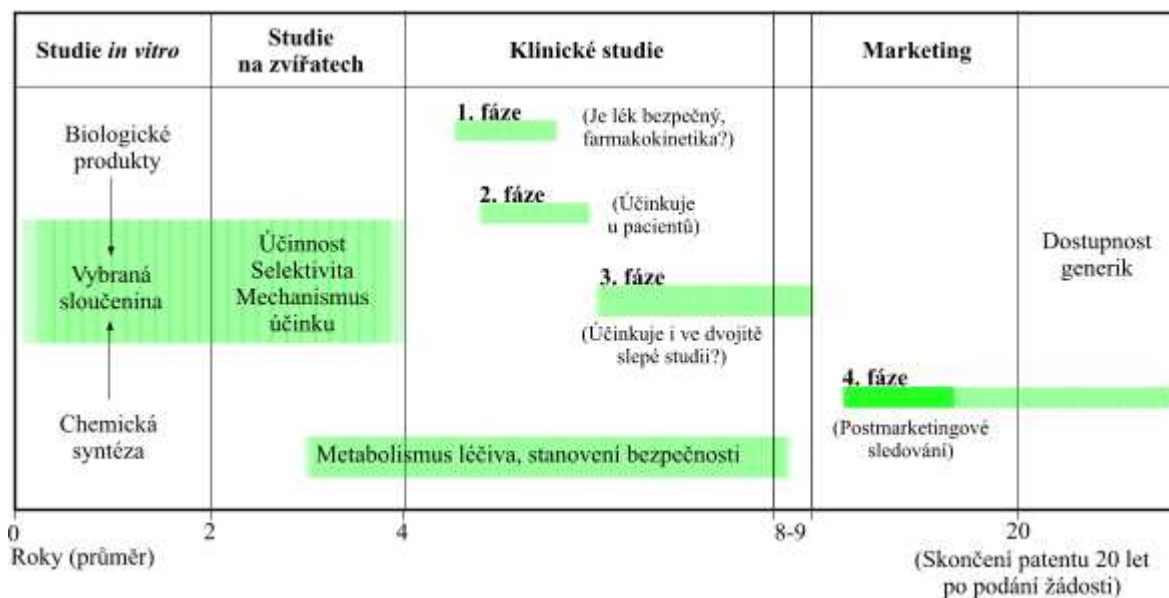
**Obrázek 7.** Farmakokinetický profil léčiva.<sup>11</sup>

Touto částí se zabývá klinická farmakologie, jejímž úkolem je optimalizovat velikost dávek, jejich množství a také časové intervaly mezi jednotlivými dávkami tak, aby bylo dosaženo potřebné a relativně ustálené koncentrace léčiva v oběhu.<sup>13</sup>

## 2.4 Vývoj nových léčiv

Nová léčiva jsou získávána několika postupy. Jedním z nich je syntéza analogů přirozeně se vyskytujících hormonů, mediátorů, popřípadě i dalších aktivních látek. Další

možností jsou strukturální modifikace známých léčiv. V neposlední řadě se léčiva získávají náhodným testováním přirozených látek či vyhledáváním nových účinků již zavedených léčiv. Vývoj lze rozdělit na dvě části, nejprve probíhá preklinický výzkum, na který navazuje klinické hodnocení (**Obrázek 8**).<sup>23</sup>



**Obrázek 8.** Vývoj a vyžadované testování léku před jeho povolením na trh. U některých léků se mohou požadavky lišit.<sup>25</sup>

### 2.4.1 Preklinický výzkum

V této části vývoje se využívají různé testy a metody jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Farmakologické testy jsou zahájeny screeningovými testy všech připravených molekul. Tyto testy bývají relativně jednoduché a zahrnují různé mechanismy účinku. Cílem této fáze výzkumu je stanovení základního farmakologického profilu nadějně substance. Obvykle je v této fázi možno zjistit, zda látka působí na synaptický nervový systém, tlumí CNS, zasahuje do metabolismu lipidů nebo má-li výrazný diuretický účinek. Po orientačních testech následuje rozsáhlý farmakologický výzkum. Při testování se sleduje nejenom hlavní možný terapeutický účinek, ale také se sledují vedlejší účinky, které mohou být nežádoucí a tedy limitující pro klinické použití. Další nedílnou součástí jsou toxikologické testy, jejichž cílem je stanovení letální dávky a mechanismu letálního účinku u různých zvířecích druhů. Základním testem je sledování toxicity při jednorázovém podání tzv. akutní toxicita, dále se monitoruje toxicita látky při opakovaném podávání. Provádějí se také speciální toxikologické testy (např. sledování

reprodukčních funkcí, zkoušky na kancerogenitu nebo mutagenitu), kde se sleduje bezpečnost potenciálního léčiva.<sup>23</sup>

#### **2.4.2 Klinické hodnocení léčiv**

Správná klinická praxe je soubor pravidel pro navrhování, provádění, zpracování a vyhodnocování dokumentace klinického hodnocení léčiv. Základní principy a postupy klinického hodnocení jsou společné a platné prakticky na celém světě. Vlastní klinické hodnocení lze rozdělit do čtyř částí.

##### ***Etapu I***

Etapu zahrnuje první podání léčiva člověku. Hodnocení je prováděno obvykle u zdravých dobrovolníků a léčivo se podává buď jednorázově, nebo opakovaně po dobu několika dní. Účelem této fáze je především získání informací o farmakokinetice, farmakodynamice a primární snášenlivosti hodnoceného léčiva jako podklad pro stanovení dávkovacího schématu pro další fáze hodnocení.<sup>24</sup>

##### ***Etapu II***

V následující etapě dochází k podání hodnoceného léčiva již v předpokládané indikaci pacientům s danou chorobou. Tuto etapu lze rozdělit na dvě části. V první dochází k hodnocení předpokládaných indikací a k vyhledávání nežádoucích účinků. Druhá část zahrnuje některé dílčí studie, které jsou zaměřeny na stanovení farmakodynamiky, farmakokinetiky a biotransformace při opakovaném podávání v základních indikacích. Počet subjektů hodnocení účastnících se této fáze bývá obvykle sto až několik set. Vhodní pacienti jsou vybíráni podle přísných kritérií stanovených protokolem klinické studie na základě získání informovaného souhlasu a nejsou za svou účast v hodnocení placeni.<sup>24</sup>

##### ***Etapu III***

Cílem této etapy je získat průkaznost terapeutické účinnosti léčiva a jeho bezpečnosti ve srovnání s jinými léčivy, které jsou považovány za standardní a neúčinnější pro danou indikaci. Využívá se metoda kontrolovaných klinických studií. Srovnává se skupina pacientů, kteří dostávají nové léčivo, se skupinou pacientů, kteří dostávají standardní terapii.<sup>25</sup> Výběr pacientů bývá randomizovaný, což znamená, že zařazení pacientů do jednotlivých skupin je zcela náhodné. Takto provedený výběr má zajistit rovnováhu mezi jednotlivými studovanými skupinami. Používá se velmi často tzv. "zaslepených" studií. Jedná se o úpravu lékové formy včetně balení, kdy není na první pohled jasné, jestli

se jedná o nové zkoušené léčivo nebo o kontrolní přípravek (popř. placebo). Při jednoduchém zaslepení jsou pacienti seznámeni s průběhem studie, ovšem není jim řečeno, do které skupiny byli zařazeni. Ošetřující lékaři jsou obeznámeni, do které skupiny jejich pacienti patří. Dalším typem je dvojitě slepá studie. V tomto případě neví ani ošetřující lékař, do které skupiny je jeho pacient zařazen. Informaci o zařazení má jiný lékař, který většinou řídí danou studii. Cílem tohoto uspořádání je co největší objektivnost a omezení vlivu předpojatosti.

V průběhu třetí fáze je prováděna celá řada studií, které mohou řešit speciální problémy (např. interakci či kontraindikace). Jsou prováděny studie zaměřené na farmakodynamiku a farmakokinetiku léčiva, případně podávání léku malým dětem či starým lidem, kdy se musí objasnit dávkování pro tyto skupiny. Výsledkem jsou komplexní údaje o léčivu, které je nutno předložit při registraci léčiva a jeho povolení používání v praxi.<sup>23</sup>

#### ***Etapa IV***

Poslední etapa následuje po registraci a týká se bezpečnosti nového léčiva v širší klinické praxi po dobu minimálně pěti let od registrace. Až v této fázi se mohou projevit vzácnější nežádoucí reakce nebo lékové interakce. Upravují se doporučení o indikacích a kontraindikacích a optimalizuje se dávkování.<sup>16</sup>

Nové léčivo je výrobcem aktivně sledováno v běžných klinických podmínkách. Zejména se sledují údaje o výskytu a závažnosti nežádoucích účinků, možných interakcích s jinými léčivy, nebo se ověřuje účinnost v různých věkových skupinách pacientů. Dále dochází k upřesnění pozice nového léčiva ve srovnání se standardními, případně bývají vytvořena nová dávkovací schémata a kombinace. Získané údaje pak slouží k doplnění registračních materiálů a úpravě dalšího používání nového léčiva. Někdy se ovšem také stává, že na základě sledování léčiva v postmarketingových studiích dojde k nutnosti nové léčivo stáhnout z oběhu. Takové rozhodnutí vydává buď samotný výrobce nebo kontrolní úřad.

Naše legislativa vyžaduje, aby veškerá klinická hodnocení Etapy I–III byla povolována Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL), který jako orgán státní správy je naším kontrolním úřadem v oblasti regulace léčiv. Klinické hodnocení v rámci Etapy IV podléhá pouze povinnosti oznámení.<sup>24</sup>

## 2.5 Registrace léčiv

Registrace nového přípravku je proces, kterým státní orgány prověřují vlastnosti léčivého přípravku a který je v příznivém případě ukončený vydáním povolení ke vstupu na trh a do běžného léčebného použití. Takovéto povolení se nazývá rozhodnutí o registraci (Marketing Authorization). V průběhu registračního řízení se prověřuje, jestli podmínky výroby zaručují přípravek se standardním a odpovídajícím způsobem prověřenou kvalitou. Dále se ověřuje, zda bude výroba probíhat za standardních a stabilních podmínek (dle přesně definovaného výrobního procesu). Jednotlivé suroviny musí být taktéž prověřeny a musí u nich být definován původ, vlastnosti a kvalita. Na základě ověřitelných studií se hodnotí účinnost léčiva v deklarovaných indikacích, dávkách a způsobu použití. Taktéž se hodnotí, zdali má přípravek terapeutický, diagnostický či preventivní účinek pro danou skupinu pacientů.<sup>13</sup>

### 2.5.1 Dokumentace potřebná k registraci

Registrační dokumentace humánního léčivého přípravku je rozdělena celkem do 5 částí. Osnovy jednotlivých částí předepisuje vyhláška č. 288/2004 Sb. Takto dané osnovy jsou závazné.

#### *Administrativní údaje*

Tato část dokumentace obsahuje formulář žádosti o registraci a kompletní obsah všech dalších částí dokumentace. Osoby pracující v lékařství zde mohou nalézt informace o:

- indikacích, kontraindikacích a dávkování
- možných interakcích s jinými léčivy
- nežádoucích účincích
- farmakologických a farmaceutických vlastnostech léku

Součástí je i návrh příbalové informace a informací uváděných na obalu. V neposlední řadě se v tomto oddílu nacházejí údaje o odbornících, kteří předkládají své komentáře k dokumentům ve zbylých částech.<sup>13</sup>



## ***Souhrny***

V této části se nacházejí zprávy vytvořené experty. Cílem je shrnout biologické a chemické údaje. Mimo to je zde zahrnut souhrn analýz klinických údajů, výsledky farmakologických a toxikologických studií. Také tato část obsahuje souhrn klinických informací.

### ***Chemické, farmaceutické a biologické informace o přípravcích***

Tento oddíl dokumentace zahrnuje podrobné informace o účinných látkách z následujících oblastí:<sup>13</sup>

- obecné informace (názvosloví, struktura, obecné vlastnosti)
- výroba (popis výrobních postupů, kontrola materiálů, kritických stupňů a meziproductů, validace a vývoj výrobního procesu)
- charakterizace a kontrola (objasnění struktury, nečistoty, specifikace látek a jejich odůvodnění, analytické metody a jejich validace, analýzy šarží)
- referenční standardy, obaly a stabilita

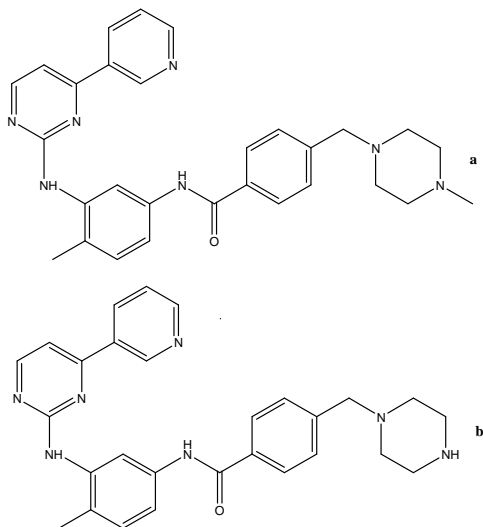
### ***Neklinické zprávy***

V této části se nacházejí výsledky všech provedených preklinických studií *in vitro* i u laboratorních zvířat. Všechny testy musí být důkladně dokumentovány včetně takových podrobností, jako jsou druhy použitých zvířat, způsob jejich chovu nebo krmivo.<sup>23</sup>

### ***Zprávy o klinických studiích***

Poslední část dokumentace zahrnuje zprávy o biologické dostupnosti a bioekvivalenci, výsledky o farmakokinetických a farmakodynamických studiích a zprávy o studiích účinnosti a bezpečnosti.<sup>13</sup>

### 3 IMATINIB MESYLÁT



**Obrázek 9.** Imatinib (a) a jeho hlavní metabolit (b)

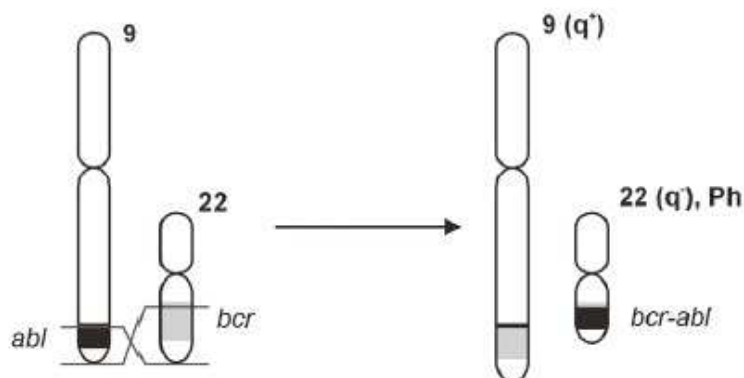
Tyrosinové kinasy jsou kritickými komponenty mnoha signálních nitrobuněčných dějů. Právě jejich abnormální aktivita bývá příčinou vzniku různých rakovin. V lidském genomu je kódováno přibližně 500 kinas. Tyrosinové kinasy se dělí na non-receptorové a receptorové. Vůči působení těchto kinas se stále vyvíjejí nové přípravky, resp. inhibitory. Imatinib mesylát (**Obrázek 9**) je právě jedním z nízkomolekulárních inhibitorů,<sup>26</sup> který působí proti non-receptorovým kinasám.<sup>21</sup> Obchodní název tohoto léku je Gleevec popř. Glivec<sup>27</sup> a jeho komerční podoba je znázorněna na obrázku

(**Obrázek 10**). Imatinib se podává denně orální cestou a vrcholné koncentrace v plazmě je dosaženo během 2–4 hodin. Absorpce imatinibu je velmi vysoká (téměř 100%).<sup>21</sup> Eliminace imatinibu a jeho hlavního metabolitu (*N*-demethylovaný imatinib<sup>28</sup>) je přibližně 18–40 hodin.<sup>29</sup>



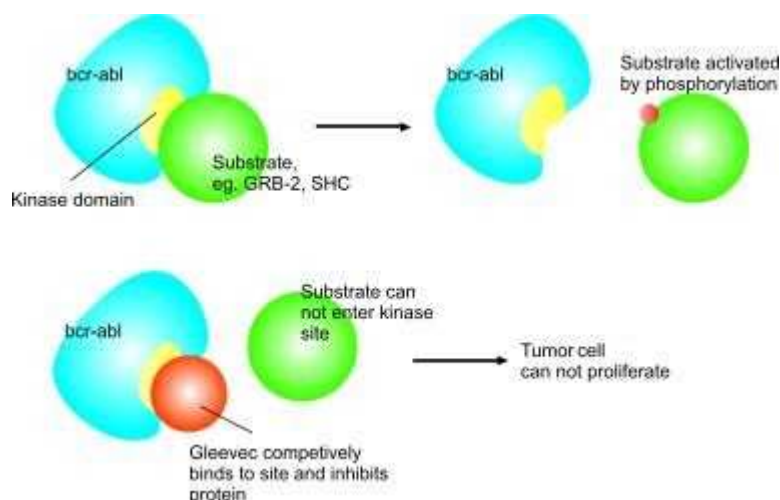
**Obrázek 10.** Léková forma terapeutika Gleevec.<sup>30,31</sup>

Imatinib mesylát je v současné době jednou z nových látek používaných k léčbě chronické myeloidní leukémie (CML).<sup>32</sup> U většiny nemocných s CML nacházíme chromozomální poruchu, která se nazývá Philadelphský chromozóm (**Obrázek 11**).



**Obrázek 11.** Mechanismus vzniku onkogeny Bcr-Abl translokací.<sup>37</sup>

Tato porucha vede k tvorbě abnormální bílkoviny Bcr-Abl (dochází k translokaci částí mezi 9 a 22 chromozomem<sup>33</sup>), což způsobuje produkci abnormálních bílých krvinek.<sup>34</sup> Proto byl tento inhibitor postaven tak, aby bránil vzniku této bílkoviny (**Obrázek 12**).<sup>35</sup>



**Obrázek 12.** Mechanismus účinku imatinib mesylátu.<sup>36</sup>

Počáteční odpověď je při terapii poměrně vysoká, ale po dvanácti měsících užívání tohoto léku se u 90 % pacientů s CML objeví rezistentní klony (např. Bcr-Abl 1).<sup>21</sup>

Důležitou vlastností této látky je její selektivita, tzn. že jako inhibitor neovlivňuje, až na výjimky, aktivitu žádných dalších proteinkinas. Pozdější biochemické testy prokázaly schopnost imatinibu interagovat s kinasami Kit a PDGFR.<sup>37</sup> Tyto bílkoviny mají podobnou úlohu v nádorovém růstu jako Bcr-Abl u CML, jsou příčinnou

gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST). Mimo CML<sup>38</sup> a GIST<sup>39,40</sup> se imatinib dále užívá při terapii akutní lymfoblastické leukémie.<sup>33</sup>

Ve srovnání s jinými běžnými chemoterapeutiky má imatinib poměrně nízkou toxicitu.<sup>35</sup> V posledních letech se mluví o jeho kardiotoxickém potenciálu.<sup>33</sup> Mezi jeho další nepříznivé efekty<sup>21</sup> patří nevolnost, zvracení, leukopenie či hepatitida. Také se mohou projevovat různé kožní vyrážky nebo okrajové edemy.<sup>41</sup>

### 3.1 Formy imatinib mesylátu

Polymorfy těže substance mají různé charakteristiky a vlastnosti, jako např. tvar krystalů, barva, hustota apod. Většinou je ve farmaceutickém průmyslu preferována jedna polymorfní forma před ostatními. Jedním z prvních kroků při vývoji dané látky je výzkum zaměřen to, zdali existují i jiné polymorfní formy, které by nabízely výhody pro eventuální farmaceutickou aplikaci. V případě imatinib mesylátu je  $\beta$ -forma komerčně nabízena pod obchodním názvem Gleevec (Glivec).<sup>42</sup> Vedle  $\beta$ -formy, existují i další krystalické formy jako např. alfa, F, G, H, I a K,<sup>43</sup> nebo delta a epsilon,<sup>44</sup> ale jsou také známy i formy amorfní.<sup>45</sup>

Obecně je známo, že polymorfní formy těže látky mohou mít podstatné rozdíly v některých důležitých farmaceutických vlastnostech. Nalezení nových polymorfních forem farmaceuticky významné substance poskytuje tedy jistou možnost ke zlepšení funkčních vlastností terapeutika, a proto vědečtí pracovníci pohybující se v této oblasti stále hledají nejrůznější nové formy daných látek a syntetické přístupy k nim.

#### 3.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti imatinib mesylátu

Chemická látka *N*-(4-methyl-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]fenyl)-4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamid mesylát, se sumárním vzorcem  $C_{29}H_{31}N_7O \cdot CH_3SO_3H$ , je bílý až nažloutlý prášek, jehož molekulová hmotnost je 589,7 g/mol. Rozpustnost této látky je různá v závislosti na pH a na povaze rozpouštědla (**Tabulka 2**).<sup>46</sup>

**Tabulka 2.** Rozpustnost  $\beta$ -polymorfu imatinib mesylátu.

| Vodné roztoky                     |                              | Organická rozpouštědla          |  |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--|
| rozpustnost                       | pH                           | rozpustnost                     | rozpouštědlo                             |
| rozpustný                         | do pH 5,5                    | částečně rozpustný až rozpustný | dimethyl sulfoxid<br>methanol<br>ethanol |
| částečně rozpustný až nerozpustný | neutrální pH<br>alkalické pH | nerozpustný                     | aceton<br>acetonitril<br>n-oktan         |

Větší pozornost je v této kapitole upřena k  $\alpha$ -formě a  $\beta$ -formě, které jsou předmětem praktické části této diplomové práce. Pod mikroskopem se  $\alpha$ -forma jeví v podobě tyčinkovitých krystalků (viz **Příloha II**), kdežto u  $\beta$ -formy se shledáváme s tvarem destiček. Bod tání se  $\alpha$ -polymorfu pohybuje v rozmezí 217–227 °C, u  $\beta$ -polymorfu 216–221 °C<sup>47</sup> (jiný zdroj uvádí b.t. 223–227 °C pro  $\alpha$ -polymorf a 215–217 °C pro  $\beta$ -polymorf<sup>43</sup>).

### 3.1.2 Stručný popis použitých metod využitých pro analýzu produktů

#### *Rentgenová prášková difrakční analýza*

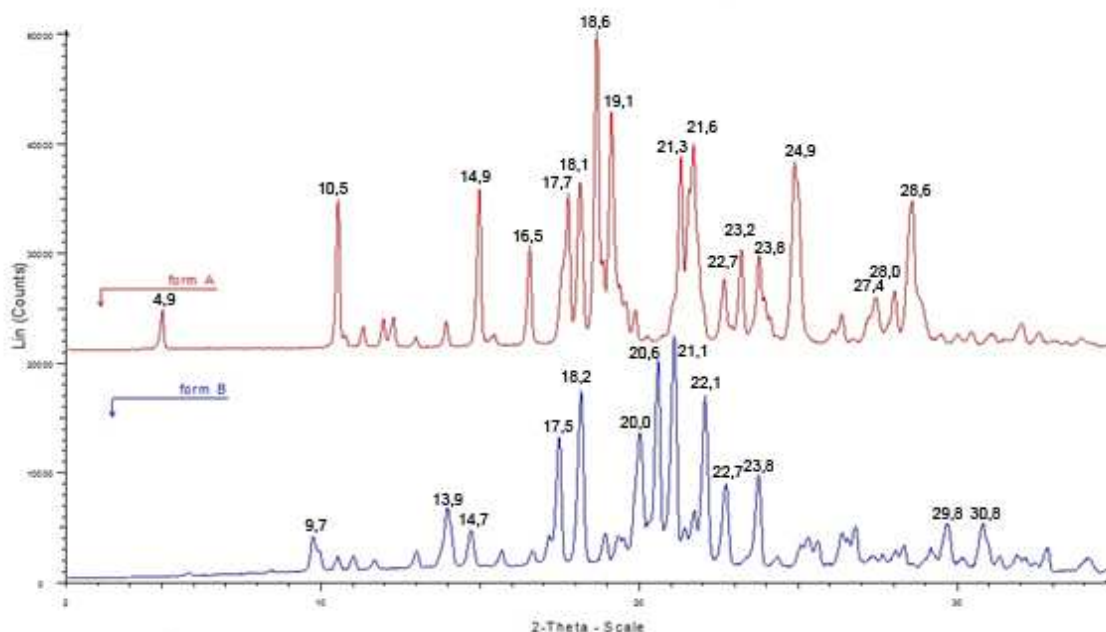
Metody rentgenové práškové difrakční analýzy (XRPD z angl. X-Ray Powder Diffraction) využívají krátkovlnné elektromagnetické spektrum z oblasti  $0,1 \cdot 10^{-10}$ – $100 \cdot 10^{-10}$  m ke studiu uspořádání stavebních částic v pevných látkách. Vlnová délka tohoto ionizujícího záření (označuje se jako „Röntgenovo“) odpovídá meziatomovým vzdálenostem ve většině struktur pevných látek, a tak může při jeho dopadu docházet k difrakci na elektronech jednotlivých atomů. Analýzou difraktovaného záření lze následně stanovit některé strukturální charakteristiky a případně rozmístění stavebních částic v krystalové mřížce studované pevné fáze.<sup>48</sup>

Obecně každá látka, ale i různé polymorfní formy tytéž sloučeniny vykazují v rentgenové práškové difrakční analýze „unikátní“ píky, které mohou být využity k jejich identifikaci a kvantifikaci.<sup>47</sup> V **Tabulce 3** jsou uvedeny charakteristické píky, podle kterých je možné odlišit<sup>49</sup>  $\alpha$ -polymorf IM od  $\beta$ -polymorfu a jejich celé spektrum získané

metodou XRPD je znázorněno na **Obrázku 13**, ve kterém jsou uvedeny hodnoty píků z **Tabulky 3** pro lepší přehlednost a rychlou orientaci.

**Tabulka 3.** Hodnoty charakteristických píků jednotlivých polymorfních forem imatinib mesylátu (XRPD).

| XRPD 2-Theta ( $\pm 0,2$ stupně 2-Theta) |  |
|--|--|
| alfa                                     | 4,9 10,5 14,9 16,5 17,7 18,1 18,6 19,1 21,3 21,6<br>22,7 23,2 23,8 24,9 27,4 28,0 28,6 |
| beta                                     | 9,7 13,9 14,7 17,5 18,2 20,0 20,6 21,1 22,1 22,7<br>23,8 29,8 30,8                     |



**Obrázek 13.** XRPD analyza  $\alpha$ -formy a  $\beta$ -formy imatinib mesylátu.

### **Infračervená spektroskopie**

Principem infračervené spektroskopie (IČ) je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné. V infračervené spektroskopii se většinou místo vlnové délky ( $\lambda$ ) využívá vlnočtu ( $\nu$ ). Z hlediska používaných vlnových délek záření můžeme infračervenou oblast rozdělit<sup>50</sup> na:

- dalekou:  $\lambda = 50\text{--}100 \mu\text{m}$ ;  $\nu = 200\text{--}10 \text{ cm}^{-1}$
- střední:  $\lambda = 2,5\text{--}50 \mu\text{m}$ ;  $\nu = 4000\text{--}200 \text{ cm}^{-1}$

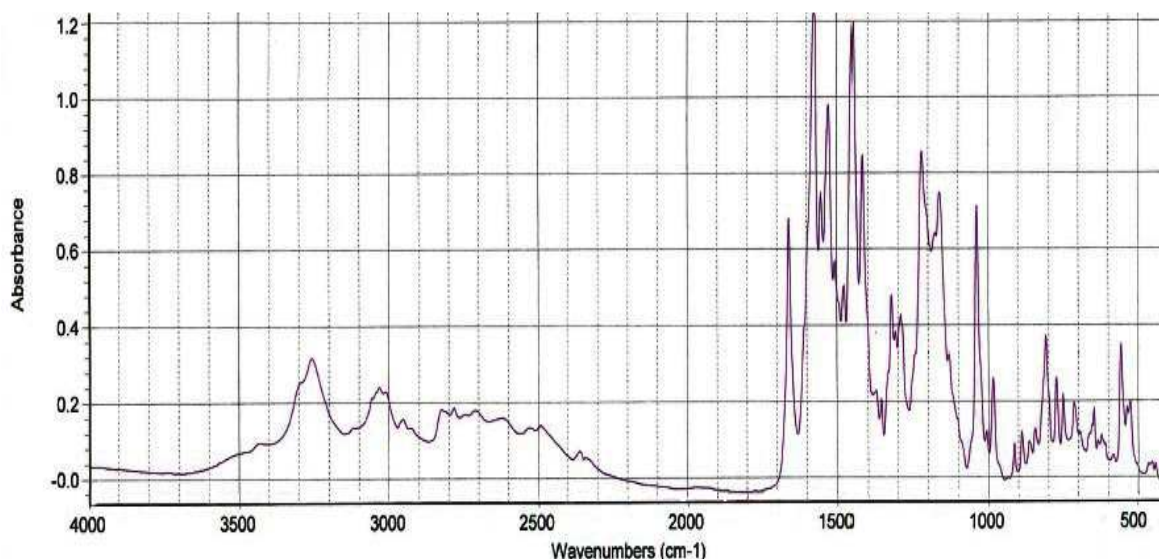
- blízkou:  $\lambda = 0,78\text{--}2,5 \mu\text{m}$ ;  $\nu = 12800\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$

Pro identifikaci a určování chemické struktury má největší význam střední infračervená oblast. Používá se zejména jako doplňková metoda k identifikaci organických i anorganických sloučenin.<sup>50</sup>

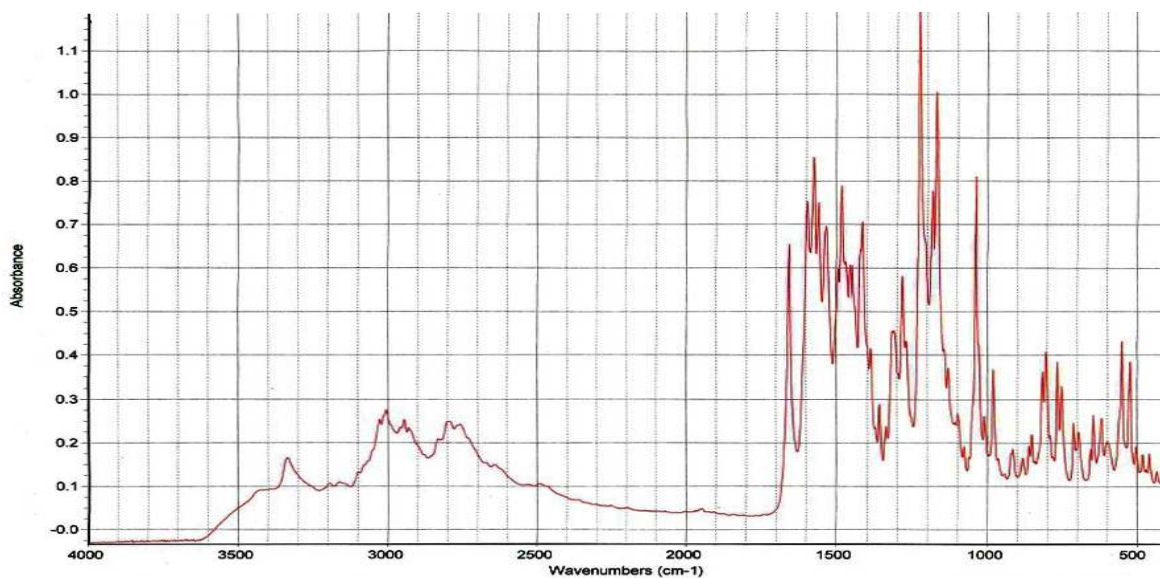
Infračervené spektrum lze rozdělit na dvě oblasti:

- V oblasti skupinových nebo-li charakteristických vibrací ( $\nu = 4000\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ ) se nacházejí absorpční pásy vibrací různých funkčních skupin, proto se tato oblast využívá pro identifikaci těchto skupin v molekule organické látky.
- V oblasti otisku prstů ( $\nu = 1500\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ ) nacházíme pásy deformačních vibrací skupin, které jsou velmi silně ovlivněny vazbami a celkovou strukturou molekuly. Protože jsou tyto vibrace určeny vibračním chováním celého skeletu molekuly. V této oblasti otisku prstů nenajdeme dvě látky, které by měly svá spektra shodné.

Na **Obrázcích 14 a 15** jsou znázorněna IČ spektra 100% čistého  $\alpha$ -polymorfu a  $\beta$ -polymorfu imatinib mesylátu. V **Příloze II** je uvedeno IČ spektrum pro směs těchto dvou polymorfů.



**Obrázek 14.** IČ spektrum  $\alpha$ -formy imatinib mesylátu.



Obrázek 15. IČ spektrum  $\beta$ -formy imatinib mesylátu.

### *Plynová chromatografie*

Název „chromatografie“ zahrnuje v současné velkou skupinu separačních technik a plynová chromatografie je jednou z nich. Tato metoda využívá rozdíl koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází, kterou zde tvoří plyn. Nosný plyn by se měl svým chováním blížit tomu ideálnímu, hodně blízko k ideálnímu plynu má helium (je ovšem dosti drahý). Nejčastěji používanými nosnými plyny jsou dusík, argon, vodík a helium. Zdrojem pohybu mobilní fáze je tlakový spád a stacionární fáze je uspořádána v koloně.<sup>51</sup> Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedené analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze.

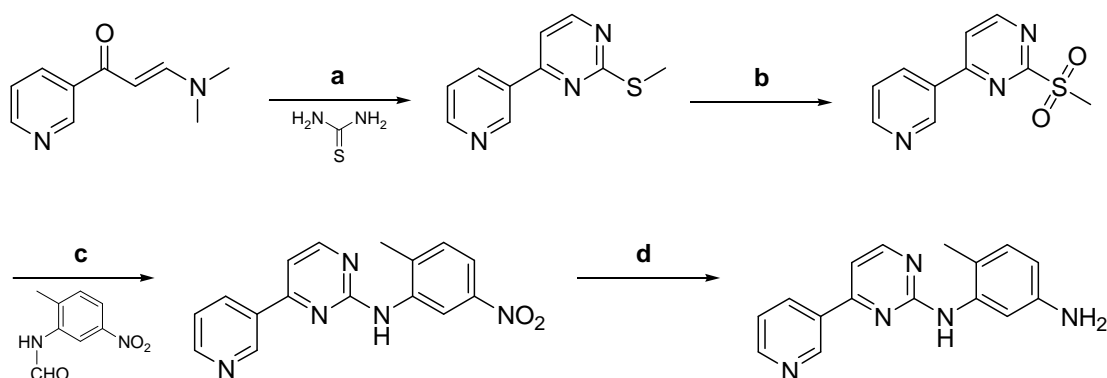
Plynový chromatograf je složen ze zdroje a regulátoru proudu nosného plynu, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, termostatů pro injektor, kolony a detektoru a v poslední řadě vyhodnocovacího zařízení.<sup>52</sup> Detektory jsou části chromatografu, kde se fyzikálně chemické vlastnosti převádějí na měřitelný, zpravidla elektrický signál. Detektorů je celá řada, některé využívají tepelné vodivosti (detektor tepelné vodivosti), jiné ionizační účinnosti (detektory termoionizační, chemoionizační či plamenoionizační) nebo fotoemise (plamenově fotometrický detektor).<sup>51</sup>

## 3.2 Syntéza molekuly imatinibu

Většina známých cest pro přípravu imatinibu má problémy buď s nízkou reprodukovatelností, nebo čistotou látky, popř. jsou finančně náročné. Níže uvedený postup je jeden z těch, které jsou vhodné pro přípravu imatinibu ve větším měřítku. Jelikož

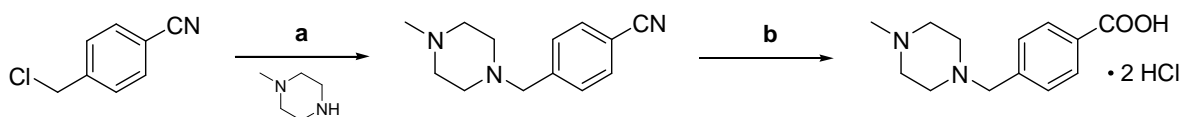


jsem se v této práci samotnou přípravou imatinibu nezabývala, ale pouze jeho přeměnou na mesylát, je vybraná syntéza v této kapitole znázorněná jen schématicky bez uvedení reakčních podmínek, které publikoval<sup>54</sup> H.Liu et al. Syntéza v první řadě zahrnuje přípravu klíčových reaktantů, 6-methyl-*N'*-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diaminu (**Schéma 1**) a 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzoová kyselina dihydrochlorid (**Schéma 2**). Z těchto dvou připravených reaktantů je následně provedena syntéza imatinibu (**Schéma 3**).<sup>53</sup>



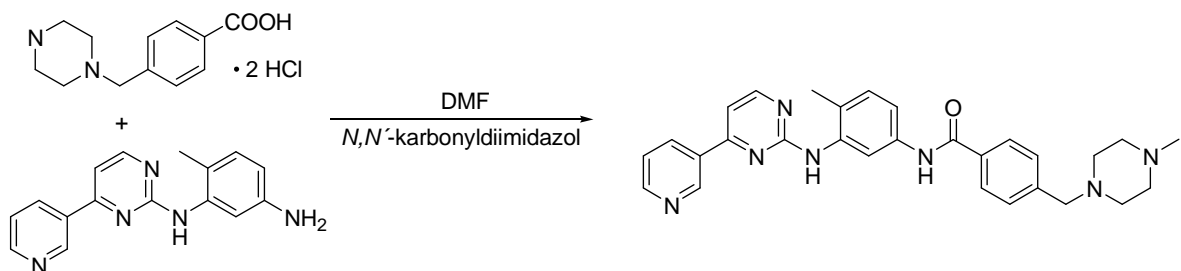
reakční činidla: **a)** Na, EtOH **b)** MeI, NaOH **c)** Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO **d)** H<sub>2</sub>N-NH<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, MeOH

**Schéma 1.** Příprava 6-methyl-*N'*-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzen-1,3-diaminu.



reakční činidla: **a)** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH **b)** HCl<sub>(konc)</sub>

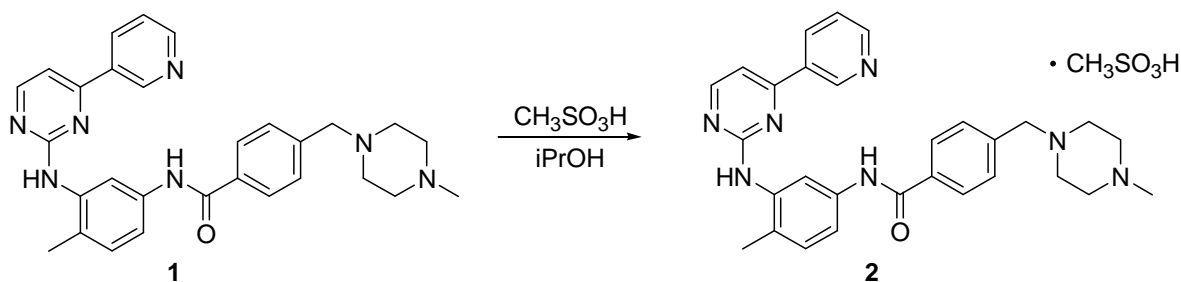
**Schéma 2.** Příprava dichloridu 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzoové kyseliny.



**Schéma 3.** Příprava farmaceuticky významné látky imatinibu.

### 3.3 Příprava molekuly imatinib mesylátu

Syntéza této látky byla prvně provedena v roce 1993.<sup>54,55</sup> V současné době je několik technologických postupů pro přípravu IM, nicméně je vždy základními surovinami báze **1** a kyselina methansulfonová (**Schéma 4**).<sup>53</sup> Jednotlivé postupy se liší zejména použitým rozpouštědlem, ale můžeme také najít odlišnosti i v samotném postupu.



**Schéma 4.** Schéma syntézy imatinib mesylátu.<sup>56</sup>

#### 3.3.1 Příprava $\alpha$ -polymorfu

Jednou z možností, jak připravit  $\alpha$ -polymorf imatinib mesylátu je využití ethanolu jako rozpouštědla. Tento proces zahrnuje několik reakčním kroků, je pracný a výsledky jsou nereprodukovatelné. Takto připravená molekula je poměrně nestabilní při pokojové teplotě, protože je krystal hygroskopický.<sup>57</sup>

Druhou variantou je využití organických rozpouštědel typu ketonů, nitrilů a cykloalkanů, kdy při jejich použití vzniká stabilní  $\alpha$ -forma.<sup>58</sup>

Další možností je využití rozpouštědla isopropanolu. Výsledkem je  $\alpha$ -polymorf imatinib mesylátu, který je stabilní při pokojové teplotě a taktéž i při teplotách kolem  $120\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>59</sup> Technologie zahrnuje smíchání báze s isopropanolem a následný přídavek kyseliny methansulfonové. Reakční směs je refluxována, následuje její zchlazení a filtrace produktu. Obdobný postup byl využit v praktické části této práce.

Pokud bychom při výrobě získali převážně nežádoucí  $\beta$ -polymorf, je možné jej převést na  $\alpha$ -polymorf.<sup>59</sup> V první řadě se smíchá  $\beta$ -polymorf imatinib mesylátu s vodou a organickým rozpouštědlem (např. methanol), poté se azeotropickou destilací odstraní voda a zbylá směs se ochladí a transformovaný  $\alpha$ -polymorf se odfiltruje.

### 3.3.2 Příprava $\beta$ -polymorfu

$\beta$ -polymorf imatinib mesylátu byl jako jeden z prvních podáváný k léčbě maligních nemocí. Tato forma je stabilní, čímž je myšleno, že možnost polymorfní změny je menší než 2 % hmotnosti. Jednou z cest jak lze  $\beta$ -formu připravit je použití acetonu jako rozpouštědla.<sup>43</sup> V první řadě se smíchá báze **1** s acetonem. Následuje převedení směsi k refluxu a var je udržován 30 minut. Posléze se směs ochladí na pokojovou teplotu a přefiltruje. Takto získaný materiál se suší při teplotě 65 °C.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

#### 4 STANOVENÍ CÍLŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce byly definovány jejím zadáním. Základním úkolem bylo vypracovat literární rešerši stručně pojednávající o krystalografii sloučenin, farmakologii, výzkumu a vývoji léčiv. Následně zpracovat kapitulu, ve které bude charakterizován polymorf imatinib mesylátu, schématický přehled jeho běžné přípravy a okrajově přiblížit čtenáři princip používaných metod pro stanovení čistoty požadovaného produktu.

Dalším úkolem a cílem, již v praktické části této práce, bylo provést základní experimenty pro přípravu  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu, které měly za úkol předběžně zjistit za jakých podmínek v reakční směsi vzniká nežádoucí  $\beta$ -polymorf. Na základě takto získaných výsledků vyhodnotit možné příčiny vzniku nežádoucího polymorfu a pokusit se je potlačit tak, aby při konverzi imatinibu na jeho methansulfonát selektivně vznikal pouze požadovaný  $\alpha$ -polymorf.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části budou uvedeny pouze syntetické postupy vedoucí k přípravě  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu a očkovacích látek 1, 2, 3. Jelikož byly XRPD a IČ analýzy měřeny na pracovišti firmy Synthos s.r.o. se sídlem v Holandsku a jejich výsledky byly zasílány pouze v podobě grafických spekter, bez přesných hodnot jednotlivých píků, netroufala jsem si je z takto získaných grafů odečíst. Proto, jak je tomu zvykem, nejsou jejich výčty v experimentální části uvedeny a jsou pouze součástí příloh (**Přílohy III a IV**).

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet Avatar 320 technikou KBr tablet. Rentgenová prášková difrakční analýza byla provedena na difraktometru Bruker AXS D8 Advance s Cu-trubicí ( $\lambda_{\text{Cu}}=1,5418\text{\AA}$ ). Parametry scanování  $0,02^\circ 2\text{ Theta}/0,3\text{ sec}$ . Pro kvantitativní analýzu isopropanolu byla použita technika Headspace Tekmar HT3 a plynový chromatograf Agilent 6890 (FID detektor) s kolonou (30 m; 0,53 mm) IDx5 $\mu\text{m}$  (5% Fenylmethylpolysiloxan). Jako nosný plyn bylo použito helium s konstantním průtokem 33 cm/s. Teplota nástřiku: 200 °C. Teplotní program: 40°C/10 min, 120 °C/min a 220 °C/2 min.

### 5.1 Příprava $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu

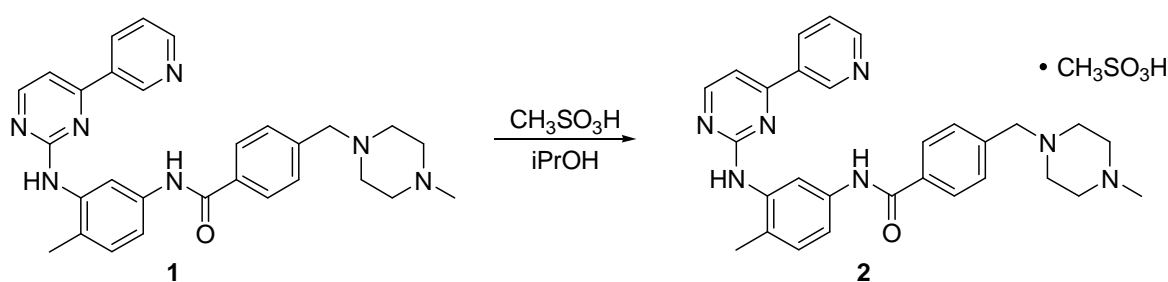
Titulní sloučenina, imatinib mesylát, byla připravena mírně modifikovaným literárním postupem.<sup>59</sup> V trojhrdlé baňce o objemu 250 cm<sup>3</sup>, opatřené Dimrothovým chladičem, byla suspenze imatinibu **1** (10 g; 20,3 mmol) ve 100 ml isopropanolu míchána mechanickým míchadlem (100 ot/min, 220 ot/min, 400 ot/min) a přivedena k refluxu. Ke vroucí suspenzi byl jednorázově přidán roztok kyseliny methansulfonové (1,95 g; 20,3 mmol) ve vodě (1,1–3,1 % vůči množství iPrOH, tj. 1,1–3,1 ml), čímž došlo k částečnému rozpuštění pevné fáze. Následně byla za horka reakční směs zaočkována komerčním  $\alpha$ -polymorfem IM nebo dříve připravenou šarží  $\alpha$ -polymorfu IM a vzniklá směs byla dále refluxována po dobu uvedenou v **Tabulkách 4–6 a 8–12**. Po ukončení reakce byla směs ochlazená na 10 °C, čímž vznikla hustá mírně nažloutlá suspenze, která byla přefiltrována přes Büchnerovu nálevku, pevný produkt byl promyt 20 ml isopropanolu a sušen 3 hodiny při teplotě 70 °C.

## 5.2 Příprava očkovacích látek 1, 2, 3

V trojhrdlé baňce o objemu 250 cm<sup>3</sup>, opatřené Dimrothovým chladičem, byla suspenze imatinibu **1** (10 g; 20,3 mmol) ve 100 ml isopropanolu míchána mechanickým míchadlem (220 ot/min) a přivedena k refluxu. Ke vroucí suspenzi byla jednorázově přidána kyselina methansulfonová (1,95 g; 20,3 mmol), čímž došlo k částečnému rozpuštění pevné fáze. Vzniklá směs byla dále refluxována po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byla směs ochlazená na 10 °C, čímž vznikla hustá mírně nažloutlá suspenze, která byla přefiltrována přes Büchnerovu nálevku, pevný produkt byl promyt 20 ml isopropanolu a sušen 3 hodiny při teplotě 70 °C.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve farmaceutické firmě Synthron s.r.o. při výrobě  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu (IM) v posledním reakčním kroku, tj. při konverzi báze **1** na její methansulfonovou sůl **2**, nastaly problémy s polymorfní čistotou požadovaného produktu. Jimi připravené šarže aktivní substance obsahovaly mimo  $\alpha$ -formu IM také nežádoucí  $\beta$ -formu. Hlavním cílem tohoto výzkumu bylo zjistit příčinu zmiňovaných neúspěšných výsledků (Tabulky 4–6) a následně se pokusit upravit reakční podmínky (Tabulky 8–10) tak, aby bylo možné získat  $\alpha$ -polymorf s co největší čistotou.



**Schéma 4.** Syntéza imatinib mesylátu (**2**).

Dle „normy“<sup>60</sup> je maximální mezní hodnota pro isopropanol 5000 ppm, což je 0,5 %, a vhodná aktivní substance musí obsahovat minimálně 50 %  $\alpha$ -polymorfu. V celé práci jsou obecně nevyhovující výsledky, popř. výsledky blízké se výše zmíněným hodnotám zaznamenány červeně a naopak výsledky, které byly analýzami potvrzeny jako nejlepší, jsou uvedeny tučně. Za důležité považuji také zdůraznit, že metoda XRPD analýzy měří s 98% přesností, a aby bylo možné naměřit v produktu  $\beta$ -polymorf je nutné, aby jeho obsah ve směsi byl minimálně 5 %.

V první řadě byly provedeny srovnávací experimenty (Tabulka 4), u nichž byly jednotlivé parametry zvoleny na základě výsledků vývojové etapy IM, která byla pracovníky farmaceutické firmy Synthron s.r.o. provedena již dříve. Z této vývojové etapy vyplynulo, že optimální obsah vody v reakční směsi (vztaženo k množství isopropanolu) je 2,5 %<sub>obj.</sub> a doba refluxu 20 minut. Pro účely srovnávacích experimentů byl vybrán obsah vody 2,5 a 3,1 %<sub>obj.</sub> a doba refluxu v rozmezí 1–60 minut. Rychlost otáček míchadla, které zajišťovalo dostatečné mísení výchozích látek, byla nastavena přibližně na 220 ot/min. Teplota reakční směsi byla udržována při konstantní teplotě 80 °C. Jako očkovací látka, kterou je nutné pro vyloučení  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu přidávat do reakční směsi,



byla použita již dříve vyrobená šarže (č. 4)  $\alpha$ -polymorfu. Je nutno zdůraznit, že XRPD analýza potvrdila, že se jedná o 100%  $\alpha$ -formu imatinib mesylátu.

**Tabulka 4.** Úvodní srovnávací pokusy.

| Exp. | Množství vody <sup>a</sup> [%obj.] | Doba refluxu [min] | Teplota reakční směsi [°C] | Polymorf [%] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|------|------------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------|-----------|---|
|      |                                    |                    |                            | $\alpha^b$   | $\beta^b$ |   |
| 1    | 2,5                                | 1                  | 80                         | 95           | 5         | <b>0,97</b>                                     |
| 2    | <b>2,5</b>                         | <b>15</b>          | <b>80</b>                  | <b>69</b>    | <b>31</b> | <b>0,31</b>                                     |
| 3    | 2,5                                | 30                 | 80                         | 66           | 34        | 0,31  |
| 4    | 2,5                                | 60                 | 80                         | <b>40</b>    | 60        | 0,21  |
| 5    | 3,1                                | 3                  | 80                         | <b>60</b>    | 40        | <b>1,1</b>                                      |
| 6    | 3,1                                | 18                 | 80                         | <b>14</b>    | 86        | 0,3   |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Tučně červeně:** nevyhovující složení produktu; **Červeně:** blíží se limitním hodnotám

Výsledky experimentů uvedených v **Tabulce 1** potvrdily problematičnost přípravy  $\alpha$ -formy imatinib mesylátu. Ani v jednom ze šesti případů se nepodařilo syntetizovat 100%  $\alpha$ -polymorf. Z tohoto hlediska dopadl nejlépe **Exp. 1**, ovšem obsah zbytkových rozpouštědel téměř dvojnásobně překračoval povolené množství. Experimenty, ze kterých nejlépe vyšel **Exp. 2**, s násadou vody 2,5 %obj. a době refluxu 15 nebo 30 minut byly jako jediné z hlediska požadavků na čistotu IM přijatelné. Pokusy, u kterých bylo zvýšeno množství vody až na 3,1 %obj., nesplňovaly žádané nároky na složení a to buď překračovaly limitní množství zbytkového rozpouštědla, nebo vznikající  $\beta$ -polymorf mnohonásobně převyšoval  $\alpha$ -polymorf. Již po 3 minutách refluxu se snížil obsah  $\alpha$ -polymorfu na 60 %, po 18 minutách poklesl až na pouhých 14 %.

Při aplikaci reakčních podmínek, které firma Synthron s.r.o. deklarovala jako optimální, pro přípravu  $\alpha$ -polymorfu IM bylo zjištěno, že v žádném z provedených základních screeningových testů nebyla báze **1** selektivně převedena na  $\alpha$ -polymorf IM. Proto jsem se pokusila tyto podmínky optimalizovat tak, že byly postupně pozměňovány jednotlivé faktory, které by mohly do jisté míry reakci ovlivňovat. Měněno bylo množství vody, doba refluxu, charakter očkovací látky, teplota lázně a rychlost otáček.

Vzhledem k tomu, že u prvních experimentů uvedených v **Tabulce 1** byl obsah vody 3,1 %obj. kritický, pro následující řadu pokusů byl volen obsah vody 2 a 2,5 %obj.. Reakční

směs byla refluxována 10 nebo 20 minut. Zvolené doby refluxu vychází opět z první řady experimentů, ve kterých příliš krátký čas ohřevu měl negativní vliv na obsah zbytkového rozpouštědla, a dlouhá doba měla negativní vliv na polymorfii produktu. Teplota reakční směsi byla opět 80 °C. Otáčky míchadla byly ponechány na konstantní hodnotě, tj. na cca 220 ot/min. K očkovaní byl použit komerční preparát  $\alpha$ -polymorfu IM, u kterého LC Laboratories garantuje >99% čistotu.

**Tabulka 5.** Příprava IM s použitím komerčního preparátu, jako očkovací látky.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [%obj.] | Doba refluxu [min] | Teplota reakční směsi [°C] | Polymorf [%] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|------------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------|-----------|---|
|           |                                    |                    |                            | $\alpha^b$   | $\beta^b$ |   |
| 7         | 2                                  | 10                 | 80                         | 100          | 0         | 0,30  |
| 8         | 2                                  | 20                 | 80                         | 100          | 0         | 0,36  |
| 9         | 2,5                                | 10                 | 80                         | 100          | 0         | 0,33  |
| <b>10</b> | <b>2,5</b>                         | <b>20</b>          | <b>80</b>                  | <b>100</b>   | <b>0</b>  | <b>0,28</b>                                     |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů

Všechny výsledky této části (**Tabulka 5**) byly vyhovující jak ze strany čistoty polymorfu, tak i ze strany množství zbytkového rozpouštědla. Nejlepší výsledky byly u **Exp. 10**, kdy byl obsah  $\alpha$ -polymorfu 100 % a zbytkové množství iPrOH pouze 0,28 %.

V následující řadě experimentů (**Tabulka 6**) byl sledován možný vliv teploty lázně, která byla nastavena na 70, 95 a 150 °C. Doba refluxu byla prakticky ve všech případech 20 minut, protože u experimentů provedených dříve, poskytovaly reakce při tomto čase nejlepší výsledky a to jak z hlediska polymorfní čistoty, tak i z hlediska zbytkového množství iPrOH. Vzorčky byly očkovány buď komerčním preparátem  $\alpha$ -formy IM (b. $\alpha$ ) nebo validačními šaržemi (šarže 1, 3, 4, 5), které byly pracovníky firmy Synthron s.r.o. vyrobeny již dříve. Všechny použité šarže byly pomocí XRPD analýzy vyhodnoceny jako 100%  $\alpha$ -polymorfy IM. Pro doplnění série byly u dvou experimentů očkovaných komerčním produktem pozměněny následující parametry – doba refluxu byla zvolena u **Exp. 11** na 10 minut, u **Exp. 18** na 40 minut, u **Exp. 21** byl obsah vody 3,1 %obj. (vztaženo k násadě iPrOH).

Pokud se jako očkovací materiál použil komerční preparát  $\alpha$ -polymorfu IM, bylo dosaženo výborných výsledků z hlediska polymorfní struktury a taktéž množství

zbytkového rozpouštědla bylo v rámci stanoveného limitu. Nejlepší výsledek byl zaznamenán u **Exp. 22**, kdy obsah vody byl 3,1 %. Dále bylo zjištěno, že vyšší teplota lázně a ani prodloužená doba refluxu (40 min) neměly vliv na čistotu připravované látky. Ovšem stále se zde musí přihlížet k tomu, že pro očkování byl použit zakoupený komerční IM, což se velkovýrobě nepoužívá.

**Tabulka 6.** Příprava IM v závislosti na teplotě a použité očkovací látce.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [%obj.] | Doba refluxu [min] | Teplota lázně (tepl. reakční směsi) [°C] | Očkovací látka                | Polymorf [%] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|------------------------------------|--------------------|--|-------------------------------|--------------|-----------|---|
|           |                                    |                    |  |                               | $\alpha^b$   | $\beta^b$ |   |
| 11        | 2,5                                | 10                 | 70 (70)                                  | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,45  |
| 12        | 2,5                                | 20                 | 70 (70)                                  | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,48  |
| 13        | 2,5                                | 20                 | 95 (80)                                  | šarže 1                       | 76,7         | 23,3      | neanalyzováno                                   |
| 14        | 2,5                                | 20                 | 95 (80)                                  | šarže 3                       | 84           | 16        | neanalyzováno                                   |
| 15        | 2,5                                | 20                 | 95 (80)                                  | šarže 5                       | 94,6         | 5,4       | neanalyzováno                                   |
| 16        | 2,5                                | 20                 | 95 (80)                                  | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,22  |
| 17        | 2,5                                | 20                 | 95 (80)                                  | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,27  |
| 18        | 2,5                                | 40                 | 95 (80)                                  | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,24  |
| 19        | 2,5                                | 20                 | 150 (80)                                 | b. $\alpha$                   | 100          | 0         | 0,23  |
| 20        | 2,5                                | 20                 | 150 (80)                                 | šarže 4                       | 65           | 35        | 0,2   |
| <b>21</b> | <b>3,1</b>                         | <b>20</b>          | <b>95 (80)</b>                           | <b>b. <math>\alpha</math></b> | <b>100</b>   | <b>0</b>  | <b>0,13</b>                                     |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažený na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Červeně:** blíží se limitním hodnotám

Všechny výsledky získané v této sérii (**Tabulka 6**) byly opět vyhovující. Slovem „vyhovující“ je myšleno to, že splňují stanovené<sup>60</sup> požadavky na  $\alpha$ -formu IM (tzn. obsah  $\alpha$ -polymorfu více jak 50 % a množství zbytkového isopropanolu do 0,5 %). Pokud se jako očkovací materiál použil komerční preparát  $\alpha$ -polymorfu IM, bylo dosaženo výborných výsledků z hlediska polymorfni struktury a taktéž množství zbytkového rozpouštědla bylo v rámci stanoveného limitu. Definitivně bylo potvrzeno, že při očkování reakční směsi vyrobenými šaržemi IM prakticky nelze připravit čistý  $\alpha$ -polymorf, i když bylo výše zmíněno, že polymorfni čistota všech použitých šarží byla dle XRPD analýzy 100%. U experimentů **Exp. 13–15** nebyla provedena analýza zbytkového množství isopropanolu, protože se primárně jednalo o polymorfni čistotu vzniklého produktu.

Mimo jiné byl také zkoumán vliv teploty lázně na přípravu  $\alpha$ -polymorfu IM. Prokázalo se, že snížením teploty na 70 °C, má nepříznivý vliv na obsah zbytkového rozpouštědla. U obou dvou experimentů (**Exp. 11** a **Exp. 12**) bylo množství zbytkového isopropanolu (0,45 a 0,48 %) těsně pod hranicí povoleného limitu (mez = 0,5 % iPrOH). V opačném případě **Exp. 13–21**, kdy byla teplota lázně zvýšena na 95 °C nebo na 150 °C, nedocházelo téměř k žádným změnám, a ani v případě kde byl prodloužený reakční čas na 40 minut (**Exp. 18**). Je ale obdivuhodné, že zvýšením množství vody v reakční směsi na 3,1 %<sub>obj.</sub> při teplotě lázně 95 °C došlo k markantnímu snížení množství zbytkového isopropanolu až na hodnotu 0,13 %. Ovšem stále zde musíme přihlížet k tomu, že pro očkování byl použit zakoupený komerční IM, který se samozřejmě pro svou vysokou cenu (1 g = 129 \$) ve velkovýrobě nepoužívá.

Jak vyplývá z dosavadních výsledků experimentů zkoumaných parametrů (**Tabulka 4–6**), které přímo ovlivňují vznik  $\beta$ -formy imatinib mesylátu či přeměnu  $\alpha$ -polymorfu na  $\beta$ -polymorf, je několik. Mezi ty nejzásadnější můžeme zahrnout polymorfní čistotu použité očkovací látky a množství vody, která se přidává ve směsi s kyselinou methansulfonovou. Podstatnou roli také hraje teplota a doba refluxu reakční směsi po naočkování. Samozřejmě, že jistý vliv také mohou mít použité suroviny, resp. jejich kvalita, a to platí jak pro výchozí bázi, tak i pro kyselinu methansulfonovou.

Nejprve byly vyrobeny tři očkovací látky, jejichž podmínky přípravy jsou uvedeny v **Tabulce 7**. Při jejich přípravě byl obsah vody nulový. To proto, aby se co nejvíce omezila možnost vzniku nežádoucího  $\beta$ -polymorfu. Pro omezení transformace na nežádoucí polymorf byla zvolena doba refluxu pouze 5 minut. Na druhou stranu oba tyto parametry (nulový obsah vody a krátká doba refluxu) by měly nepříznivě ovlivnit obsah zbytkového isopropanolu. Je také důležité upozornit na skutečnost, že v tomto případě je míněno dobou refluxu čas, který následoval po přidání kyseliny methansulfonové. Zde se očkování neprovádělo. Teplota byla nastavena na 80 °C a rychlost otáček přibližně na 220 ot/min.

**Tabulka 7.** Parametry reakce pro přípravu očkovacích látek a jejich analýzy.

| Očkovací látka | Množství vody <sup>a</sup> [%obj.] | Teplota [°C] | Doba refluxu [min] | Polymorf [%] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|----------------|------------------------------------|--------------|--------------------|--------------|-----------|---|
|                |                                    |              |                    | $\alpha^b$   | $\beta^b$ |   |
| 1              | 0                                  | 80           | 5                  | 100          | 0         | 0,62  |
| 2              | 0                                  | 80           | 5                  | 100          | 0         | 0,63  |
| 3              | 0                                  | 80           | 5                  | 100          | 0         | 0,52  |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Tučně červeně:** nevyhovující složení produktu

Rentgenová prášková difrakční analýza potvrdila, že všechny tři připravené očkovací látky jsou 100%  $\alpha$ -polymorfy. Jak již bylo výše zmíněno, nastavené parametry jsou nevyhovující pro obsah zbytkového isopropanolu. V tomto ohledu dopadla nejlépe **Očkovací látka 3**, kdy zbytkový iPrOH byl „pouze“ 0,52 %, což překračovalo povolený limit „jen“ o 0,02 %. U zbylých dvou **Očkovacích látek 1 a 2** bylo překročeno povolené množství 0,5 % iPrOH o více jak 0,1 %. Očkovací látka je při výrobě  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu používána jen v malém množství. Proto se dá předpokládat, že by takovéto množství nemělo negativně ovlivnit zbytkový obsah isopropanolu. Tento předpoklad by měl být potvrzen či vyvrácen v následujících sériích pokusů (**Tabulka 8–10**).

Následně pro přípravu  $\alpha$ -polymorfu IM (**Tabulka 8**) byla použita **Očkovací látka 1** (analyzována byla jako 100%  $\alpha$ -forma se zbytkovým množstvím iPrOH 0,62 %). Obsah vody v reakční směsi se pohyboval v rozmezí 1,1–3,1 % a doba refluxu byla 25–35 minut. Teplota reakční směsi byla nastavena na 80 °C a rychlost otáček přibližně na 220 ot/min.

**Tabulka 8.** Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 1.

| Exp. | Množství vody <sup>a</sup> [% <sub>obj.</sub> ] | Doba refluxu [min] | Polymorf [%] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|------|---|--------------------|--------------|-----------|---|
|      |   |                    | $\alpha^b$   | $\beta^b$ |   |
| 22   | 1,1   | 30                 | 100          | 0         | 0,59  |
| 23   | 1,5   | 30                 | 100          | 0         | 0,47  |
| 24   | 2,1   | 35                 | 91,3         | 8,7       | 0,33  |
| 25   | 2,5   | 25                 | 100          | 0         | 0,36  |
| 26   | 2,5   | 30                 | 96,2         | 3,8       | 0,27  |
| 27   | 3,1   | 25                 | 80,1         | 19,9      | neanalyzováno                                   |
| 28   | 3,1   | 30                 | 82,6         | 17,4      | 0,23  |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Tučně červeně:** nevyhovující složení produktu; **Červeně:** blízkí se limitním hodnotám

S využitím **Očkovací látky 1** se podařilo pouze ve třech případech (**Exp. 22, 23** a **25**) připravit čistý  $\alpha$ -polymorf IM, ze kterých nejvíce svým složením vyhovoval **Exp. 25**, kdy mimo 100% polymorfni čistotu látky, bylo zbytkové množství iPrOH pouze 0,36 %, ve srovnání s **Exp. 22** (0,59 % zbytkového iPrOH) a **Exp. 24** (0,47 % zbytkového iPrOH). Samozřejmě i **Exp. 23** by vyhovoval stanoveným požadavkům na konečný produkt, ale zbytkové množství by mohlo při velkovýrobě stoupnout nad povolený limit<sup>60</sup> (0,5 % zbytkového iPrOH). Jak lze vyčíst z **Tabulky 8** obsah použité vody pod 2 % se jeví jako kritičtější (z hlediska zbytkového množství rozpouštědla).

Ostatní experimenty (**Exp. 24, 26, 27** a **28**) dopadly s ohledem na polymorfii hůře. Je zřetelné, že při obsahu vody 3,1 % zaznamenala XRPD analýza téměř 20% nárůst  $\beta$ -polymorfu. Příčina by pravděpodobně mohla být v očkovací látce. Kdy ani XRPD analýza nemusela zaznamenat stopové množství  $\beta$ -formy imatinib mesylátu.

Pro další sérii experimentů (**Tabulka 9**) byla použita **Očkovací látka 2**, jejíž analýza byla následující: zbytkové množství isopropanolu činilo 0,63 % a polymorfni čistota 100 %  $\alpha$ -formy. V návaznosti na výsledky série experimentů uvedených v **Tabulce 8**, byly vypuštěny pokusy s velmi nízkými hodnotami obsahu vody (1,1 %<sub>obj.</sub> a 1,5 %<sub>obj.</sub>), které byly nahrazeny hodnotou 1,75 %<sub>obj.</sub>. Toto množství vody je sice pod 2% hranicí, ale na druhou stranu je větší jako u **Exp. 23**, který nárokům na čistotu vyhovoval. S ohledem na dobu refluxu, byly voleny kratší časy, které by mohly negativně ovlivnit

množství zbytkového rozpouštědla, ale na druhou stranu jsou výhodnější pro přípravu požadovaného polymorfu. Celková snaha byla najít nejmenší množství vody a co nejkratší čas tak, aby byly vznikající produkty vyhovující jak z hlediska množství rozpouštědla, tak i z hlediska polymorfní čistoty produktu. Zbylé parametry syntézy byly nastaveny analogicky s předchozími pokusy, tj. teplota reakční směsi byla udržována na 80 °C a rychlost otáček přibližně 220 ot/min.

**Tabulka 9.** Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 2.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [% <sub>obj.</sub> ] | Doba refluxu [min] | Polymorf [% ] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|---|--------------------|---------------|-----------|---|
|           |   |                    | $\alpha^b$    | $\beta^b$ |   |
| 29        | 1,75  | 11                 | 100           | 0         | 0,474   |
| 30        | 1,75  | 18                 | 100           | 0         | 0,465   |
| 31        | 1,75  | 25                 | 100           | 0         | 0,479   |
| 32        | 2,00  | 11                 | 100           | 0         | 0,432   |
| 33        | 2,00  | 18                 | 100           | 0         | 0,417   |
| 34        | 2,00  | 25                 | 100           | 0         | 0,445   |
| 35        | 2,25  | 11                 | 100           | 0         | 0,389   |
| 36        | 2,25  | 18                 | 100           | 0         | 0,407   |
| 37        | 2,25  | 25                 | 100           | 0         | 0,408   |
| 38        | 2,50  | 11                 | 100           | 0         | 0,473   |
| 39        | 2,50  | 18                 | 100           | 0         | 0,383   |
| 40        | 2,50  | 25                 | 100           | 0         | 0,337   |
| 41        | 3,10  | 11                 | 100           | 0         | 0,283   |
| 42        | 3,10  | 18                 | 100           | 0         | 0,306   |
| <b>43</b> | <b>3,10</b>                                     | <b>25</b>          | <b>100</b>    | <b>0</b>  | <b>0,267</b>                                    |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Červeně:** blíží se limitním hodnotám

Množství  $\alpha$ -polymorfu u všech experimentů uvedených v **Tabulce 6** bylo 100 %. Z pohledu obsahu zbytkového rozpouštědla byly naměřené hodnoty v rámci povoleného limitu, ale opět se potvrdilo, že násada vody  $\leq 2$  %<sub>obj.</sub> přináší velmi vysoké hodnoty zbytkového isopropanolu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u **Exp. 43**.

Pro poslední řadu experimentů (**Tabulka 10**), která se snaží optimalizovat výrobní podmínky imatinib mesylátu, bylo pro naočkování reakční směsi použito

**Očkovací látka 3.** Analýza této očkovací látky byla ze všech tří mnou vyrobených (Tabulka 7) nejlepší a konkrétně se jednalo o 100%  $\alpha$ -polymorf s obsahem 0,52 % zbytkového iPrOH.

**Tabulka 10.** Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 3.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [%obj.] | Doba refluxu [min] | Polymorf [% ] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|------------------------------------|--------------------|---------------|-----------|---|
|           |                                    |                    | $\alpha^b$    | $\beta^b$ |   |
| 44        | 1,50                               | 18                 | 100           | 0         | 0,47  |
| 45        | 2,25                               | 5                  | 100           | 0         | 0,42  |
| 46        | 2,25                               | 18                 | 100           | 0         | 0,27  |
| 47        | 2,25                               | 45                 | 100           | 0         | 0,40  |
| <b>48</b> | <b>3,00</b>                        | <b>18</b>          | <b>100</b>    | <b>0</b>  | <b>0,26</b>                                     |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů; **Červeně:** blíží se limitním hodnotám

Všechny experimenty provedené v této sérii opět vyhovovaly požadavkům na  $\alpha$ -polymorf imatinib mesylátu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u experimentu **Exp. 48**, kdy hodnota zbytkového rozpouštědla byla pouhých 0,26 %.

Z výše uvedených experimentů uvedených v **Tabulkách 8–10** se jako optimální jevila doba refluxu 18 minut. Tato hodnota se nejvíce blížila nastavené hodnotě doby refluxu z původního vývojového reportu, což bylo 20 minut. Množství vody okolo 3 %<sub>obj.</sub> by bylo pro přípravu imatinib mesylátu ideální, za předpokladu, že by polymorfní čistota použité očkovací látky byla stoprocentní. Tento fakt by ovšem nemusela prokázat ani provedená XRPD analýza. Tudiž byla nutnost volit obsah vody co nejnižší (ale nad 2% hranici). Nejlepší výsledek byl pro dobu refluxu 18 minut zaznamenán u **Exp. 46**, kdy při použitém množství vody 2,25 %<sub>obj.</sub> byl obsah zbytkového rozpouštědla 0,27 % iPrOH.

Dále následovaly série experimentů, které měly za úkol prověřit, zdali jsou vyvozené závěry (viz odstavec výše) parametrů přípravy  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu správné (**Tabulka 11 a Tabulka 12**). U těchto experimentů bylo množství vody v násadě 2,25 %<sub>obj.</sub> a doba refluxu 18 minut. Teplota směsi byla 80 °C.

Cílem experimentů uvedených v **Tabulce 11** bylo prověřit, má-li rychlost otáček a množství použité očkovací látky vliv na syntézu IM. Reakční směs byla očkovaná vyrobenou **Očkovací látkou 3** (viz **Tabulka 7**). Pro **Exp. 49** byly sníženy otáčky



míchadla na hodnotu 100 ot/min, kdežto u **Exp. 50** naopak zvýšeny na hodnotu 400 ot/min. Množství použité očkovací látky bylo u **Exp. 51** o polovinu sníženo, a pro tento experiment byla zvolena standardní rychlost otáček, tj. 220 ot/min.

**Tabulka 11.** Příprava imatinib mesylátu v závislosti na změně rychlosti otáček nebo množství očkovací látky.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [% <sub>obj.</sub> ] | Doba refluxu [min] | Polymorf [% ]         |                      | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|---|--------------------|-----------------------|----------------------|---|
|           |   |                    | $\alpha$ <sup>b</sup> | $\beta$ <sup>b</sup> |   |
| <b>49</b> | <b>2,25</b>                                     | <b>18</b>          | <b>100</b>            | <b>0</b>             | <b>0,30</b>                                     |
| 50        | 2,25  | 18                 | 100                   | 0                    | 0,33  |
| 51        | 2,25  | 18                 | 100                   | 0                    | 0,34  |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů

Z těchto výsledků vyplývá, že snížená či zvýšená rychlost otáček při přípravě  $\alpha$ -formy imatinib mesylátu a ani výrazněji menší dávka očkovací látky nemají pozorovatelný vliv na složení produktu. Všechny experimenty obsahovaly  $\alpha$ -polymorf v 100% množství, přičemž nejlepší výsledek vzhledem ke zbytkovému množství rozpouštědla byl zaznamenán u **Exp. 49**.

V poslední sérii experimentů (**Tabulka 12**) byl prověřen vliv posloupného očkování, kdy v jednotlivých experimentech byly vzorky vždy očkovány předcházejícím vyrobeným vzorkem, např. **Exp. 53** byl očkován **Exp. 52**. Pro naočkování prvního experimentu **Exp. 52** byla zvolena látka získaná z **Exp. 36** (**Tabulka 9**), u jejíž přípravy byly nastaveny optimální vstupní parametry reakce, tj. obsah vody 2,25 %<sub>obj.</sub> a reflux byl prováděn 18 minut.

**Tabulka 12.** Příprava imatinib mesylátu v závislosti na posloupné řadě očkování.

| Exp.      | Množství vody <sup>a</sup> [% <sub>obj.</sub> ] | Doba refluxu [min] | Očkovací látka | Polymorf [% ] |           | Zbytkové množství rozpouštědla <sup>c</sup> [%] |
|-----------|---|--------------------|----------------|---------------|-----------|---|
|           |   |                    |                | $\alpha^b$    | $\beta^b$ |   |
| 52        | 2,25  | 18                 | 40             | 100           | 0         | 0,358   |
| 53        | 2,25  | 18                 | 59             | 100           | 0         | 0,364   |
| 54        | 2,25  | 18                 | 60             | 100           | 0         | 0,384   |
| 55        | 2,25  | 18                 | 61             | 98            | 2         | 0,368   |
| 56        | 2,25  | 18                 | 62             | 100           | 0         | 0,350   |
| <b>57</b> | <b>2,25</b>                                     | <b>18</b>          | <b>63</b>      | <b>100</b>    | <b>0</b>  | <b>0,333</b>                                    |

<sup>a</sup> Objem vody v % vztažené na objem použitého iPrOH; <sup>b</sup> Stanoveno pomocí XRPD; <sup>c</sup> Stanoveno pomocí GC; **Tučně černě:** nejlepší výsledek z této série experimentů

Posloupnost očkování je ve velkovýrobě běžně používána, a proto byly výsledky zejména této série velmi důležité (**Tabulka 12**). Pouze v jednom ze šesti provedených pokusů (**Exp. 55**) bylo pomocí XRPD analýzy zjištěno, že nevznikl naprosto čistý  $\alpha$ -polymorf IM. Lze předpokládat, že v tomto případě došlo k chybě při analýze vzorku pomocí rentgenové práškové difrakční analýzy. Pokud by produkt z **Exp. 55** opravdu obsahoval 2 %  $\beta$ -polymorfu s největší pravděpodobností by následující dva experimenty (**Exp. 56 a 57**) nebyly vyhodnoceny jako 100%  $\alpha$ -polymorfy. Pro vyhodnocení experimentů této série byla také použita metoda infračervené spektroskopie. Analýza potvrdila (viz **Příloha IV**), že veškeré vzorky z této řady jsou  $\alpha$ -polymorfy.

## ZÁVĚR

Úvodní pokusy přípravy  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu potvrdily, že očkovaním vyrobenými šaržemi imatinib mesylátu nelze připravit čistý  $\alpha$ -polymorf. I když byly použité šarže k očkování analyzovány pomocí rentgenové práškové difrakční analýzy jako stoprocentní  $\alpha$ -polymorfy, existuje zde pravděpodobnost, že obsahují i nepatrné množství  $\beta$ -polymorfu, protože metoda neměří se stoprocentní jistotou. XRPD analýza měří pouze s 98% jistotou a přesné stanovení nežádoucího  $\beta$ -polymorfu lze určit až při jeho obsahu v reakční směsi nad 5 %. Ovšem i nepatrné množství  $\beta$ -polymorfu může být příčinou vzniku většího podílu této nežádoucí látky. Z poznatků vyplývá, že výroba  $\alpha$ -formy imatinib mesylátu, při jejíž přípravě se k očkování používají předešlé vyrobené šarže, je problematická.

Mezi faktory ovlivňující vznik  $\alpha$ -formy nebo  $\beta$ -formy imatinib mesylátu se také ukázalo, že vyjma polymorfní čistoty očkovacích látek, hrají také důležité role množství použité vody v nasadě, teplota vyhřívací lázně a doba refluxu.

Množství vody usnadňuje vznik nežádoucího  $\beta$ -polymorfu, a pokud je tato polymorfní forma přítomna, byť i ve stopovém množství v očkovací látce její vliv značně stoupá. Pokud je jako očkovací látka použit a komerčně zakoupená  $\alpha$ -forma je tento vliv do jisté míry omezen.

Snížením teploty nebo výraznějším zkrácením doby refluxu pod hranici 20 minut nebyl zjištěn negativní vliv při přípravě  $\alpha$ -formy imatinib mesylátu. Ovšem takto zvolené parametry způsobily to, že se obsah zbytkového isopropanolu zvýšil nad maximální přípustnou hodnotu 0,5 %, popř. se této hodnotě výrazně blížil.

Byly tedy navrženy dva případné postupy, které by měly omezit vznik  $\beta$ -polymorfu. Prvním byla příprava očkovacích látek, při jejichž přípravě byl volen nulový obsah vody. Druhým možným řešením bylo upravení obsahu vody a nalezení optimální doby refluxu reakční směsi po jejím naočkování. U experimentů se změnou těchto parametrů byl jako optimální zjištěn obsah vody 2,25 % a jako ideální se jevila doba refluxu 18 minut. Při nižším obsahu vody, a to zejména pod 2 %, by mohlo dojít ke zvýšení hladiny zbytkového isopropanolu nad povolenou hodnotu 0,5 %, a naopak při vyšším obsahu vody je zbytečně podstupováno riziko přeměny  $\alpha$ -polymorfu na  $\beta$ -polymorf. Doba refluxu 18 minut se nejvíce blížila nastavené hodnotě doby refluxu z původního vývojového reportu společnosti, což bylo 20 minut. Takto vybrané parametry byly následně několika

experimenty ověřeny a potvrzeny. Prokázalo se, že na polymorfní čistotu produktu mají pozitivní vliv speciálně připravené očkovací látky.

Závěrem lze říci, že příprava očkovací látky imatinib mesylátu v bezvodém isopropanolu zaručuje výborné výsledky z hlediska získání  $\alpha$ -polymorfu. Ovšem v praxi je výhodnější a používanější očkování předchozími vyrobenými šaržemi, což bylo také po optimalizaci reakčních podmínek vyzkoušeno a výsledky z těchto experimentů poskytovaly rovněž vhodné složení, které odpovídalo požadavkům na produkt.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> VACÍK, J. *Obecná chemie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 303 s.
- <sup>2</sup> VALVODA, V., POLCAROVÁ, M., LUKÁČ, P. *Základy strukturní analýzy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1992, 492 s.
- <sup>3</sup> MUCK, A. *Symetrie krystalů a vibrační spektra*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 272 s.
- <sup>4</sup> *Studijní opora Ing. Lubomír Kratochvíl, CSc - VUT Brno* [online]. [cit. 6.10.2009]. Dostupný z WWW: <<http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/bum/03-Krystalografie%20studijni%20opora.pdf>>
- <sup>5</sup> KRATOCHVÍL, B., JENŠOVSKÝ, L. *Úvod do krystalochemie*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 239 s.
- <sup>6</sup> ŽÚRKOVÁ, L. *Všeobecná chémie*. 1. vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladatelství, 1985, 327 s.
- <sup>7</sup> *Základy chemie – Přírodovědecká fakulta UP* [online]. [cit.10.4.2011]. Dostupný z WWW: <<http://ekologie.upol.cz/ku/ekozcho/ZakladychemieII.pdf>>
- <sup>8</sup> *Strukturní typy – Přírodovědecká fakulta MU* [online]. [cit. 10.4.2011]. Dostupný z WWW: <<http://chemi.muni.cz/~lobl/Projekt/Projekt.html>>
- <sup>9</sup> KITAJGORODSKIJ, A. I. *Molecular Crystals and Molecules*. New York: ACADEMIC PRESS, 1973, 553 s.
- <sup>10</sup> *Přednáška Ing. Petr Holý, CSc - VŠCHT Praha* [online]. [cit. 25.9.2010]. Dostupný z WWW: <[http://www.vscht.cz/min/prednasky/chfpl/Molekularni\\_krystal\\_Holy.pdf](http://www.vscht.cz/min/prednasky/chfpl/Molekularni_krystal_Holy.pdf)>
- <sup>11</sup> *Přednášky Prof. RNDr. Bohumil Kratochvíl, DSc - VŠCHT Praha* [online]. [cit. 25.9.2010]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/min/prednasky/chfpl>>
- <sup>12</sup> *Přednáška Josef Jampílek - VFU Praha* [online]. [cit. 20.10.2010]. Dostupný z WWW: <[http://faf.vfu.cz/export/struktura-fakulty/sekce\\_ustavy/ustav\\_chemickyh\\_leciv/vyuka/molekularni-zaklady-vyvoje-leciv/Polymorfismus.pdf](http://faf.vfu.cz/export/struktura-fakulty/sekce_ustavy/ustav_chemickyh_leciv/vyuka/molekularni-zaklady-vyvoje-leciv/Polymorfismus.pdf)>
- <sup>13</sup> HAMPL, F., RÁDL, S., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 2. rozš. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2007, 448 s. ISBN 978-80-7080-639-5

- <sup>14</sup> KUCHAR, M. *Vývoj a výzkum léčiv*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2008, 168 s. ISBN 978-80-7080-677-7
- <sup>15</sup> BAUER, L. A. *Applied Clinical Pharmacokinetics*. 2.vyd. United States: The McGraw-Hill Companies, 2008, 826 s. ISBN 0-07-147628-8
- <sup>16</sup> MARTÍNKOVÁ, J., CHLÁDEK, J., MIČUDA, S., CHLÁDKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd, Praha: Grada Publishing a.s., 2007, 379 s. ISBN 978-80-247-1356-4
- <sup>17</sup> HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. 2. přeprac. vyd. Praha: Triton, 2009, 520 s. ISBN 80-7254-181-1
- <sup>18</sup> LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. české vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1
- <sup>19</sup> DIPIRO, J. T., SPRUILL, W. J., WADE, W. E., BLOUIN, R. A., PRUEMER, J. M. *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. 4. vyd. Wisconsin: American Society of Health-System Pharmacists, 2005, 241 s. ISBN 1-58528-124-7
- <sup>20</sup> LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L., BIEGER, D. *Color Atlas of Pharmacology*. 2. vyd. New York: Thieme, 2000, 402 s. ISBN 0-86577-843-4
- <sup>21</sup> RITTER, J. M., LEWIS L. D., MANT, T., FERRO, A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 5.vyd. London: Hodden Education, 2008, 465 s. ISBN 978-0-340-90046-8
- <sup>22</sup> KATZUNG, B. G. *Základní a klinická farmakologie*. 18.vyd., 2. české. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o., 2006, 1106 s. ISBN 80-7319-056-7
- <sup>23</sup> LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. doplň. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0
- <sup>24</sup> *Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci - Lékařská fakulta MU Brno* [online]. [cit. 1.2.2011]. Dostupný z WWW: <<http://portal.med.muni.cz/clanek-367-vyzkum-novych-leciv-od-zrodu-k-registraci.html>>
- <sup>25</sup> PERLÍK, F. *Základy farmakologie. Klinická a speciální farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén, Karolinum, 2005, 190 s. ISBN 80-7262-374-5
- <sup>26</sup> MASOPUST, L. *Labor Aktuell*. 4, 4 – 10 (2006)
- <sup>27</sup> DIETRICH, J., HULME, C., HURLEY, L. H. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 5738 – 5748 (2010)

- <sup>28</sup> SZCZEPEK, J. W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 1682 – 1691 (2007)
- <sup>29</sup> BRUNTON, L., PARKER, K., BLUMENTHAL, D., BUXTON, I. *The Goodman & Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 11. vyd. United States: McGraw-Hill Companies, 2008, 1219 s. ISBN 0-07-146891-9
- <sup>30</sup> *Gleevec balení (obrázek)* [online]. [cit. 1.4.2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.pediatricgist.org/PediatricGIST/Treatment/Gleevec/tabid/69/Default.aspx>>
- <sup>31</sup> *Gleevec tablety (obrázek)* [online]. [cit. 1.4.2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.revolutionhealth.com/drugs-treatments/gleevec>>
- <sup>32</sup> *Chronická myeloidní leukémie – informace pro pacienty a jejich blízké* [online]. [cit. 9.3.2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.linkos.cz/pacienti/brozury/5.pdf>>
- <sup>33</sup> OFFERMANS, S., ROSENTHAL, W. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. 2. vyd. New York: Springer-Verlag, 2008, 1497 s. ISBN 978-3-540-38921-7
- <sup>34</sup> *Komplexní onkologické centrum - Glivec (Imatinib mesylát)* [online]. [cit. 9.3.2011]. Dostupný z WWW: <[http://old.koc.cz/pro\\_verejnost/glivec.html](http://old.koc.cz/pro_verejnost/glivec.html)>
- <sup>35</sup> SCHWAB, M. *Encyclopedia of Cancer*. 2. vyd. New York: Springer-Verlag, 2008, 3306 s. ISBN 978-3-540-47649-8
- <sup>36</sup> *How it works: Gleevec* [online]. [cit. 4.4.2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemistrydaily.com/chemistry/Imatinib>>
- <sup>37</sup> KRYŠTOF, V. *Chem. Listy* 102, 795-800 (2008)
- <sup>38</sup> MARTINELLI, G., IACOBUCCI, I., SOVERINI, S., CILLONI, D., SAGLIO, G., PANE, F., BACCARANI, M. *Hematol. Oncol.* 24, 196 – 2004 (2006)
- <sup>39</sup> DENNIS, K. L., DANJANOV, I. *The Open Pathology Journal*. 3, 53 – 57 (2009)
- <sup>40</sup> WONG, D. W. Y., LUPTON, S. C., BHATT, L., GROSS, L. *J. Clin. Oncol.* 20, 517 – 522 (2008)
- <sup>41</sup> BERGHOFF, A. T., ENGLISH, J. C. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63 (1), 14 – 16 (2010)
- <sup>42</sup> KOMPELLA, A.K., ADIBHALTA KALI SATYA, B.R., PODILI, K., VENKAIAH CHOWDARY, N. PCT Intl. Publ. No. WO 2006/054314.A1, 25 May 2006
- <sup>43</sup> MUTZ, M. PCT Intl. Publ. No. WO 2007/059963 A1, 31 May 2007
- <sup>44</sup> MUTZ, M. PCT Intl. Publ. No. WO 2007/023182 A1, 1 March 2007

- <sup>45</sup> JEGOROV, A., CHUDIK, M., ARONHIME, J., GAVENDA, A., FAUSTMANN, J. PCT Intl. Publ. No. WO 2007/136510 A2, 29 Nov 2007
- <sup>46</sup> *Full prescribing information* [online]. [cit. 5.3.2011]. Dostupný z WWW: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=93ddb778-854f-4486-adca-4c5f9071a741>>
- <sup>47</sup> ALAN, M. S., PATEL, S. B., BANSAL, A. K. *The AAPS Journal*. 10 (S2), 23 (2008)
- <sup>48</sup> *XRPD – Přírodovědecká fakulta MU* [online]. [cit. 1.4.2011]. Dostupný z WWW: <[http://sci.muni.cz/chemsekce/c8870/pdf/Uloha10\\_RTG.pdf](http://sci.muni.cz/chemsekce/c8870/pdf/Uloha10_RTG.pdf)>
- <sup>49</sup> JEGOROV, A., CHUDIK, M., ARONHIME, J., GAVENDA, A., FAUSTMANN, J. Pat. Appl. Publ. US 2009/0264438 A1, 22 Oct 2009
- <sup>50</sup> KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. uprav. a doplň. vyd. Ostrava: Klouda, 2003, 132 str. ISBN 80-86369-07-2
- <sup>51</sup> ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- <sup>52</sup> *Plynová chromatografie – Chemistry Department MU* [online]. [cit. 15.5.2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>
- <sup>53</sup> XING, L., XUNGUI, H., WANG, Y., BEKHAZI, M., KRIVONOS, S., DANON, E. Pat. Appl. Publ. US 2008/0275055 A1, 6 Nov 2008
- <sup>54</sup> LIU, H., XIA, W., LUO, Y., LU, W. *Monatsh. Chem.* 141, 907-911 (2010)
- <sup>55</sup> ZIMMERMANN, J. EP Patent 0564409 B1, 25 March 1993
- <sup>56</sup> KADABOINA, R., NARIYAM, M. S., PATEL, V.B. PCT Intl. Publ. No. WO 2009/151889, 17 Dec 2009
- <sup>57</sup> ZIMMERMANN, J. US Patent No. 2005/6894051, 17 May 2005
- <sup>58</sup> ADIN, I., IUSTAIN, C., DAVIDI, G., BENTOLIA, M., MEYER, E., KASPI, J. Pat. Appl. Publ. US 2006/0223816 A1, 10 May 2006
- <sup>59</sup> AMALA, K., SRINIVASA RAO, T., ADIBHATLA KALI SATYA, B.R., RACHAKONDA, S., VENKAIHAH CHOWDARY, N., PODILI, K. Intl. Publ. No. WO 2005/077933 A1, 25 Aug 2005



<sup>60</sup> *European Medicines Agency*. Impurities: Guideline for Residual Solvents. ICH Topic Q3C (R4)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|             |   |
|-------------|---|
| $\lambda$   | vlnová délka                            |
| v           | vlnočet                                 |
| Abl         | Abelson gene                            |
| API         | Active Pharmaceutical Ingredient        |
| b. $\alpha$ | koupený imatinib mesylát – alfa forma   |
| Bcr         | Breakpoint cluster region               |
| b.t.        | bod tání                                |
| CML         | chronická myeloidní leukémie            |
| CNS         | centrální nervový systém                |
| DMF         | <i>N,N</i> -dimethylformamid            |
| EMA         | European Medicinal Association          |
| Et          | ethyl                                   |
| FDA         | Food and Drug Administration            |
| GIST        | gastrointestinální stromální tumor      |
| IČ          | infračervená spektrometrie              |
| IM          | imatinib mesylát                        |
| iPrOH       | isopropanol                             |
| Me          | methyl                                  |
| PDGFR       | Platelet-Derived Growth Factor Receptor |
| SÚKL        | Státní ústav pro kontrolu léčiv         |
| XRPD        | prášková rentgenová analýza             |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|  |    |
|--|----|
| <b>Obrázek 1.</b> Parametry mřížky $a$ , $b$ , $c$ a jim příslušné úhly $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ .....                        | 11 |
| <b>Obrázek 2.</b> Krystaly s kovovou vazbou.....   | 12 |
| <b>Obrázek 3.</b> Atomové krystaly.....  | 13 |
| <b>Obrázek 4.</b> Vrstevnaté krystaly. ....  | 13 |
| <b>Obrázek 5.</b> Pakovací molekuly sulfapyridinu. ....  | 14 |
| <b>Obrázek 6.</b> Konformery kyseliny L-glutamové. ....  | 15 |
| <b>Obrázek 7.</b> Farmakokinetický profil léčiva. ....   | 20 |
| <b>Obrázek 8.</b> Vývoj a vyžadované testování léku před jeho povolením na trh. U<br>některých léků se mohou požadavky lišit. .... | 21 |
| <b>Obrázek 9.</b> Imatinib ( <b>a</b> ) a jeho hlavní metabolit ( <b>b</b> ).....  | 26 |
| <b>Obrázek 10.</b> Léková forma terapeutika Gleevec.' ....   | 26 |
| <b>Obrázek 11.</b> Mechanismus vzniku onkogenu Bcr-Abl translokací. ....   | 27 |
| <b>Obrázek 12.</b> Mechanismus účinku imatinib mesylátu.....   | 27 |
| <b>Obrázek 13.</b> XRPD analýza $\alpha$ -formy a $\beta$ -formy imatinib mesylátu.....  | 30 |
| <b>Obrázek 14.</b> IČ spektrum $\alpha$ -formy imatinib mesylátu.....  | 31 |
| <b>Obrázek 15.</b> IČ spektrum $\beta$ -formy imatinib mesylátu.....   | 32 |

**SEZNAM SCHÉMÁT**

|  |    |
|--|----|
| <b>Schéma 1.</b> Příprava 6-methyl- <i>N</i> <sup>1</sup> -[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin2-yl]benzen-1,3-diaminu. .... | 33 |
| <b>Schéma 2.</b> Příprava dichloridu 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzoové kyseliny .....                     | 33 |
| <b>Schéma 3.</b> Příprava farmaceuticky významné látky imatinibu.....  | 33 |
| <b>Schéma 4.</b> Schéma syntézy imatinib mesylátu. ....  | 34 |

**SEZNAM TABULEK**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabulka 1.</b> Krystalografické soustavy.....  | 12 |
| <b>Tabulka 2.</b> Rozpuštnost $\beta$ -polymorfu imatinib mesylátu.....   | 29 |
| <b>Tabulka 3.</b> Hodnoty charakteristických píků jednotlivých polymorfních forem<br>imatinib mesylátu (XRPD).....        | 30 |
| <b>Tabulka 4.</b> Úvodní srovnávací pokusy.....   | 41 |
| <b>Tabulka 5.</b> Příprava IM s použitím komerčního preparátu, jako očkovací látky.....                                   | 42 |
| <b>Tabulka 6.</b> Příprava IM v závislosti na teplotě a použité očkovací látce.....                                       | 43 |
| <b>Tabulka 7.</b> Parametry reakce pro přípravu očkovacích látek a jejich analýzy.....                                    | 45 |
| <b>Tabulka 8.</b> Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 1.....   | 46 |
| <b>Tabulka 9.</b> Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 2.....   | 47 |
| <b>Tabulka 10.</b> Příprava imatinib mesylátu za použití očkovací látky 3.....  | 48 |
| <b>Tabulka 11.</b> Příprava imatinib mesylátu v závislosti na změně rychlosti otáček nebo<br>množství očkovací látky..... | 49 |
| <b>Tabulka 12.</b> Příprava imatinib mesylátu v závislosti na posloupné řadě očkování.....                                | 50 |

## **SEZNAM PŘÍLOH**

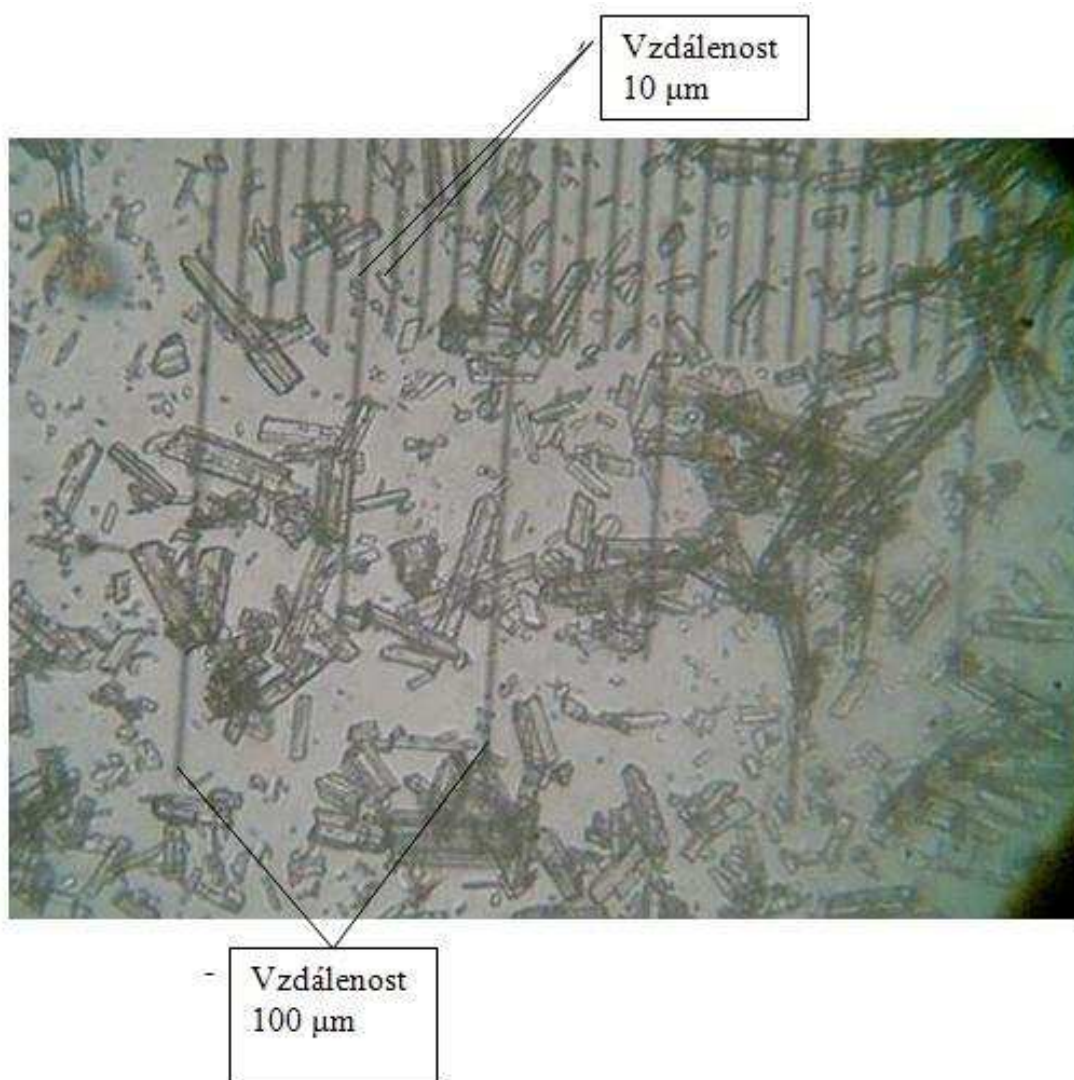
**Příloha I. Krystalky  $\alpha$ -polymorfu imatinib mesylátu.**

**Příloha II. IČ – rozlušení směsi polymorfů a čistého  $\alpha$ -polymorfu.**

**Příloha III. XRPD analýza Experimentu 57.**

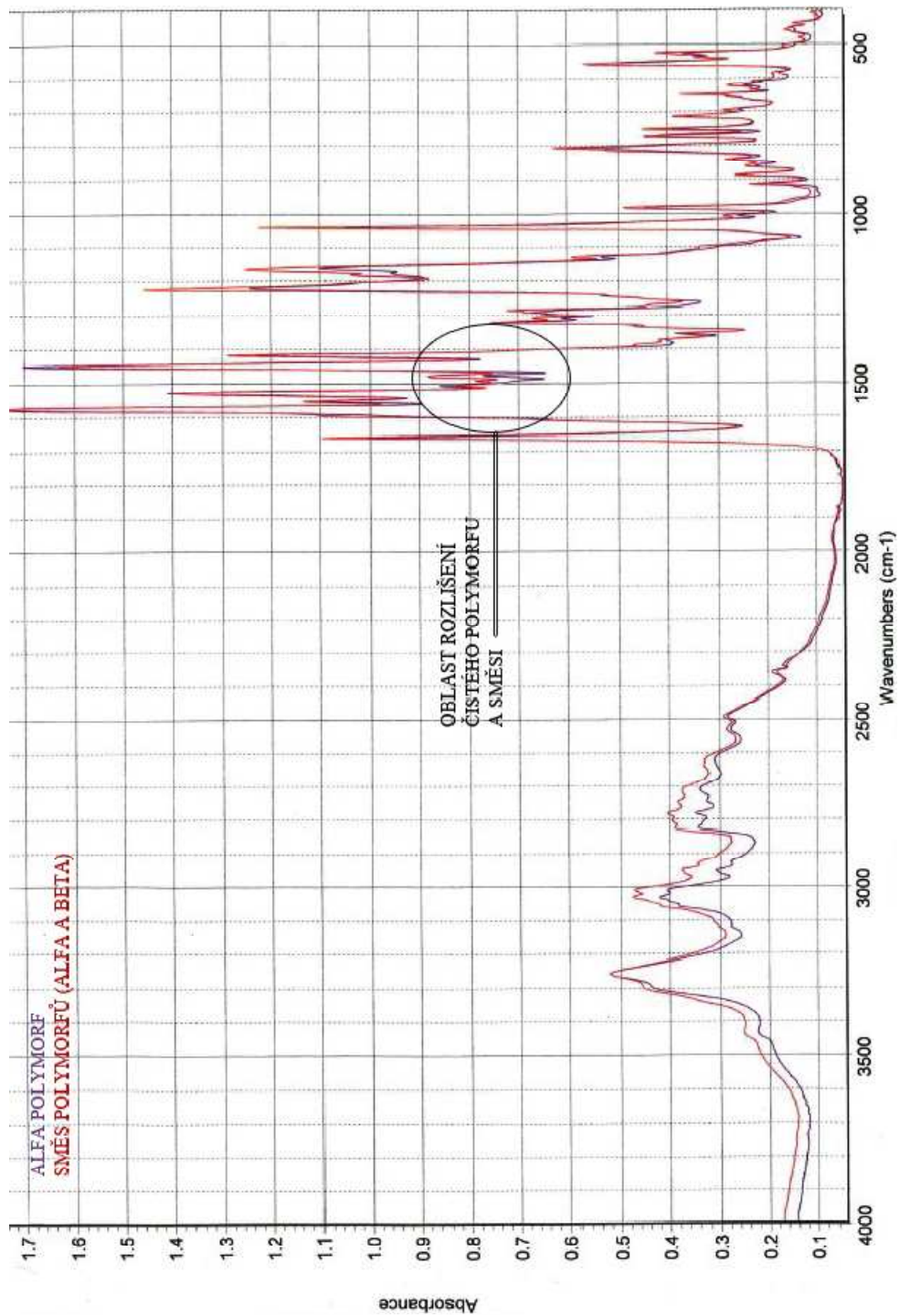
**Příloha IV. IČ analýza Experimentu 55.**

**PŘÍLOHA I. KRYSTALKY  $\alpha$ -POLYMORFU IMATINIB MESYLÁTU.**



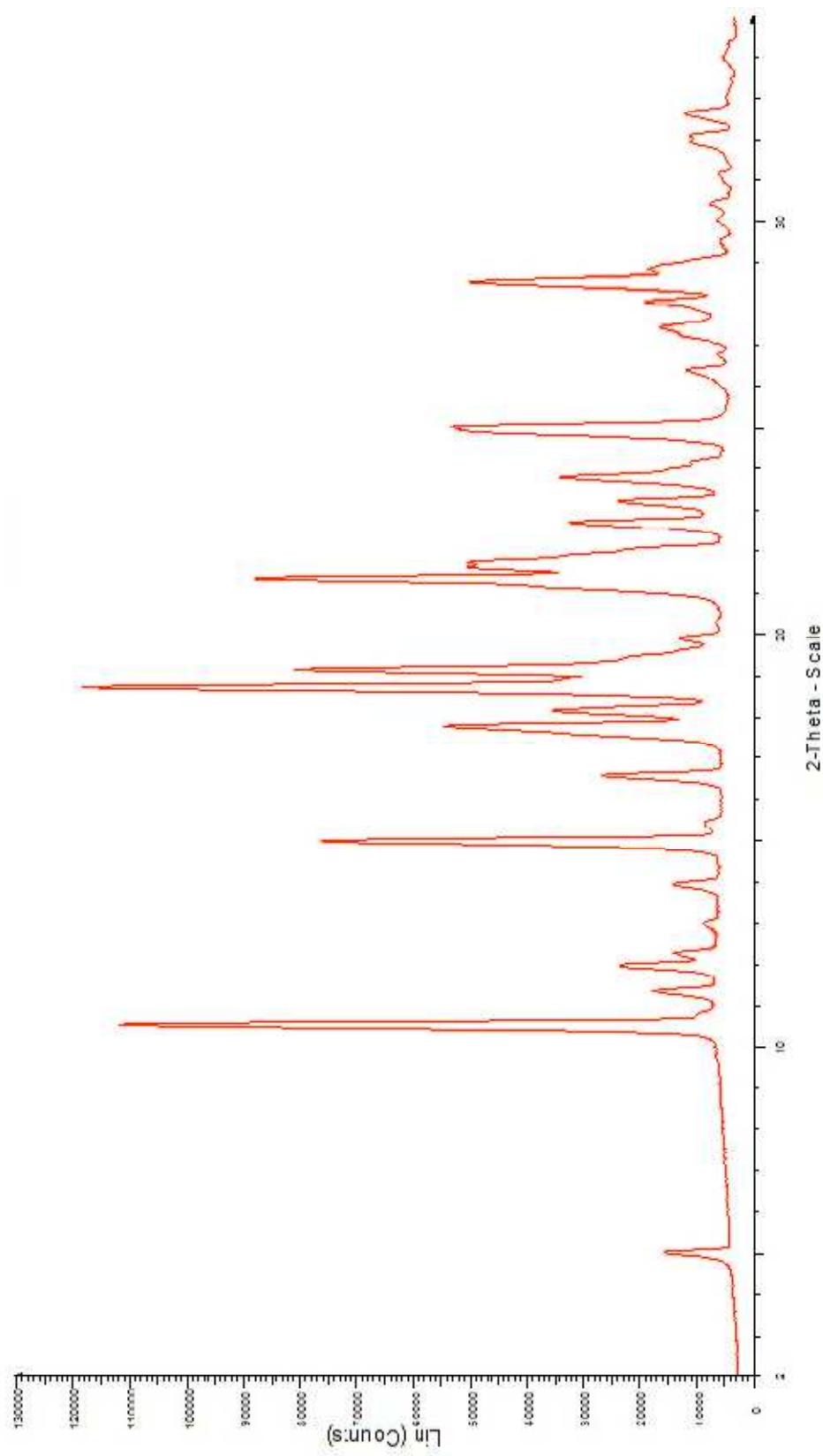
- Zvětšeno 400x

PŘÍLOHA II. IČ – ROZLIŠENÍ SMĚSI POLYMORFŮ A ČISTÉHO  $\alpha$ -POLYMORFU.





### PŘÍLOHA III. XRPD ANALÝZA EXPERIMENTU 57.



**PŘÍLOHA IV. IČ ANALÝZA EXPERIMENTU 55.**

