

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA GENETIKY A BIOTECHNOLOGIÍ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

ING. ZDENKA ČÍŽKOVÁ

České Budějovice 2024

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorand:	Ing. Zdeňka Čížková
Studijní program:	Biotechnologie
Studijní obor:	Zemědělské biotechnologie
Název práce:	Syntéza analogu nukleosidu kladribinu pomocí rekombinantních enzymů a vývoj lékových forem
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Konzultant práce:	doc. Ing. Vladimír Matřha, DrSc.
Oponenti:	Ing. Jan Čejka, Ph.D. RNDr. Alexandr Jegorov, CSc. prof. Ing. Martin Křížek, CSc.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na nový přístup v přípravě nukleosidového purinového analogu kladribinu, hledání nových polymorfů této účinné látky a jejich následné využití v nových pevných i kapalných lékových formách.

Kladribin byl vyvinut k léčbě rakoviny krve, v současnosti se používá zejména při léčbě neonkologických onemocnění, především roztroušené sklerózy. Z toho důvodu bylo žádoucí vyvinout stabilní robustní finální lékovou formu, která by vykazovala vysokou biologickou dostupnost. Účinná látka je na trh dodávána pouze jako produkt chemické syntézy. Z toho důvodu se tato práce zaměřila na „zelenou enzymatickou syntézu“ s mnoha klady, zejména minimální spotřebou vstupních surovin a energií, nižšími náklady a procesem šetrným k životnímu prostředí. Dosud jsou pospány dvě pevné struktury kladribinu. V na trhu dostupných lékových formách (tablety a infuze) se používá pouze krystalická forma I. V rámci screeningu byl připraven nový polymorf monohydrát kladribinu, u kterého se podařila vyřešit a upřesnit krystalická struktura. Největší výhoda nového polymorfu spočívá v jeho zvýšené rozpustnosti oproti formě I. Vlastnost nového polymorfu se využila při vývoji subkutánní formulace s vysokou koncentrací účinné látky a mikroemulzního prekoncentrátu. Dále byly připraveny dvě pevné disperze, jež mohou být využity jako alternativa k originální formulaci tablet Mavencladu.

Klíčová slova: kladribin, nukleosidový analog, finální lékové formy, biosyntéza

Abstract

This thesis focuses on a new approach in the preparation of the nucleoside purine analogue of cladribine, the search for new polymorphs of this active substance and their subsequent use in new solid and liquid dosage forms.

Cladribine was developed for the treatment of blood cancers and is currently used mainly in the treatment of non-cancer diseases, especially multiple sclerosis. Therefore, it was desirable to develop a stable robust final dosage form that exhibited high bioavailability. The active substance is marketed only as a product of chemical synthesis. Hence, this work focused on "green enzymatic synthesis" with many pros, especially minimal feedstock and energy consumption, lower cost and environmentally friendly process. So far, two solid structures of cladribine have been asleep. Only the crystalline form I is used in the commercially available dosage forms (tablets and infuze). In the screening, a new postlyomorphic monohydrate of cladribine was prepared, for which the crystal structure was solved and refined. The biggest advantage of the new polymorph is its increased solubility compared to form I. The property of the new polymorph was used in the development of a subcutaneous formulation with a high concentration of the active substance and a microemulsion preconcentrate. In addition, two solid dispersions were prepared which can be used as an alternative to the original tablet formulation of Mavenclad.

Keywords: cladribine, nukleoside analogue, final dosage forms, biosynthesis

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Hypotézy a cíle disertační práce.....	7
3	Materiál a metodika.....	8
3.1	Enzymatická syntéza kladribinu	8
3.2	Kladribin	9
3.3	Perorální lékové formy kladribinu	11
3.3.1	Mikroemulze.....	11
3.3.2	Pevné disperze	11
3.4	Parenterální lékové formy kladribinu	12
4	Výsledky a diskuze.....	13
4.1	Enzymatická syntéza a její využití ve výrobě kladribinu	13
4.2	Farmaceutická kompozice obsahující pevnou disperzi amorfního kladribinu a farmaceuticky přijatelný nosič rozpustný ve vodě	13
4.3	Způsob výroby amorfních kladribinových koevaporátů s cyklodextriny	14
4.4	Mikroemulzní prekoncentrát s obsahem kladribinu a způsob jeho přípravy	15
4.5	Kladribin monohydrát, způsob jeho přípravy a farmaceutická subkutánní formulace s vysokým obsahem účinné látky	16
5	Závěr.....	20
6	Seznam literatury.....	22

1 Úvod

Nukleosidové analogy jsou získávány modifikací nukleosidových struktur. Hlavními oblastmi výzkumu je jejich protinádorové a antivirové působení. Společnou charakteristikou analogů je aktivní transport pomocí membránových transportérů, aktivace kinázami, které umožňují zadržování monofosfátu v organismu a tvorbu aktivních trifosfátových metabolitů a defosforylaci nukleotidázou. Nukleosidové analogy obsahují pyrimidinové nebo purinové báze. Předmětem zkoumání této práce je purinový analog 2-chloro-2'-deoxyadenosin neboli kladribin.

Kladribin byl poprvé syntetizován v 70. letech jako lék na léčbu různých druhů rakoviny krve, v současnosti se používá zejména při léčbě neonkologických onemocnění, především roztroušené sklerózy. Z toho důvodu bylo žádoucí vyvinout stabilní robustní finální lékovou formu, která by vykazovala vysokou biologickou dostupnost. Kladribin je na trhu ve formě orálních tablet (Mavenclad) a infuzních roztoků (Litak). Účinná látka je na trh dodávána pouze jako produkt chemické syntézy. Z toho důvodu je žádoucí nahradit chemickou syntézu zelenou enzymatickou syntézou. Rozvoj enzymatického způsobu syntézy by mohl přinést výhody jak z hlediska zlepšení účinnosti a jednoduchosti procesu, tak minimalizaci spotřeby organických rozpouštědel a tím i dopadu na životní prostředí. Využití enzymatické syntézy ve výrobě kladribinu přináší jednoduchý a rychlý způsob výroby této účinné látky ve vysoké čistotě bez vzniku nežádoucích vedlejších produktů.

Jednou z hlavních nevýhod kladribinu jsou jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, vykazuje velmi malou rozpustnost ve vodě, v ethanolu se nerozpouští vůbec. To představuje problém pro formulaci této účinné látky do lékové formy. Jednou z možností, jak zlepšit fyzikálně-chemické vlastnosti, je hledání nových polymorfů, neboť různé krystalové struktury mohou vykazovat různé vlastnosti, zejména rozdíly v rozpustnosti, biologické stabilitě či dostupnosti a ovlivnit tak jejich zpracování do lékové formy. Kladribin se v současných finálních lékových formách používá pouze ve formě krystalické látky formy I.

Problém s rozpustností farmaceuticky účinné látky (API) je řešen i při vývoji nových lékových forem, ve kterých se vlastnosti nového polymorfu využijí. Hlavním cílem je nalézt nové pevné a kapalně orální lékové formy, které by vykazovaly vyšší biologickou dostupnost a nižší cenu konečného léčivého přípravku. Dále je snaha o přípravu alternativní parenterální lékové formy s vyšší koncentrací API a snazší aplikací, než je na trhu dostupná infuze.

2 Hypotézy a cíle disertační práce

Hypotézy

- Lze nalézt levnější a účinnější postupy syntézy molekul analogů nukleosidů?
- Lze zformulovat molekulu III. třídy BCS do hydrofilního prostředí lékové formy?
- Lze zvýšit biologickou dostupnost kladribinu pomocí lékové formy?

Tato práce byla zaměřena na pět hlavních cílů:

1. Návrh nového způsobu výroby analogu nukleosidu kladribinu pomocí enzymatické syntézy.
2. Nalézt vhodnější polymorf pro zlepšení fyzikálně-chemických vlastností a jeho využití pro přípravu koncentrované parenterální lékové formy.
3. Návrh pevných lékových formulací s obsahem kladribinu, které by byly patentově nekolizní.
4. Návrh formulace kladribinu do samoemulgujícího prostředí.
5. Testování navržené lékové formy metodami danými lékopisem.

3 Materiál a metodika

3.1 Enzymatická syntéza kladribinu

První část této práce je zaměřena na vývoj enzymatické syntézy purinového nukleosidového analogu kladribinu využitím nukleosidových fosforyláz. Nukleosidové analogy se syntetizují především chemickými metodami, které vyžadují použití organických rozpouštědel, více reakčních kroků a odstranění chránících skupin, což způsobuje nežádoucí změny v reakci, vznik racemických směsí, které ovlivňují další purifikaci (Ichikawa a Kato, 2001). Použití enzymů pro syntézu těchto nukleosidů se jeví jako skvělá alternativa, zejména díky jejich vysoké katalytické účinnosti, přirozené selektivitě a jednoduchému zpracování. Mezi výhody použití těchto biotechnologických a biokatalytických metody patří mírné reakční podmínky, vysoká účinnost, vysoká regioselektivita, stereoselektivita a použití technologií, jež jsou šetrné k životnímu prostředí (Mikhailopulo a Miroshnikov, 2010). Enzymy, které se nejčastěji používají pro syntézu nukleosidů transglykosylací jsou nukleosidfosforylázy (NP) a N-deoxyribosyltransferázy (NDT), které přenášejí glykosylové zbytky z nukleosidů na různé purinové nebo pyrimidinové báze a analogy na akceptorové báze. NP katalyzují reverzibilní fosforylaci ribo- a deoxyribonukleosidů štěpením N-glykosidických vazeb nukleosidů za vzniku volné báze a pentosy-1-fosfátu. Ta se posléze spojí s požadovanou modifikovanou bází buď stejné nebo jiné nukleosidové fosforylázy za vzniku nukleosidového analogu (Drenichev et al., 2022).

V syntéze kladribinu byly použity purinová nukleosidová fosforyláza (PNP) a uridin fosforyláza (UP). PNP je enzym katalyzující reverzibilní fosforylaci purinových ribonukleosidů a odpovídajících 2-deoxyribonukleosidů na volnou purinovou bázi a 2'-deoxy-ribózu-1-fosfát (Silva et al. 2003). PNP je klíčovým enzymem pro syntézu nukleosidů a jejich derivátů, které vykazují antivirové a protinádorové účinky (Lee et al., 2001). UP štěpí specificky uridinové nukleosidy, degraduje pyrimidinové nukleosidy a katalyzuje reverzibilní fosforolýzu uridinu na uracil a ribózu-1-fosfát. Přítomnost UP byla prokázána u *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. V těchto organismech zastává dvě funkce: podílí se na zpětné syntéze nukleotidů z intermediátů a je nezbytná pro využití nukleosidů jako zdroje uhlíku. (Cao a Pizzorno, 2004; Leer et al., 1977)

Enzymy jsou získávány buď izolací z produkčních buněk, nebo se v enzymatické syntéze používají intaktní buňky mikroorganismů, nebo jsou geneticky modifikované produkční mikroorganismy upravené ke zvýšené expresi příslušného enzymu (rekombinantní enzymy).

Další možností je imobilizace biokatalyzátorů, což stabilizuje a modifikuje selektivitu a tím usnadňuje separaci z reakční směsi a podporuje purifikaci požadovaného produktu (Lapponi et al., 2016; Boryski, 2008).

3.2 Kladribin

Kladribin neboli 2-chlor-2'-deoxyadenosin je purinový nukleosidový analog se selektivní toxicitou vůči lymfocytům a monocytům. Poprvé byl syntetizován koncem 70. let jako lék na různé druhy rakoviny krve. Byl vyvinut k selektivnímu působení na lymfocyty u lymfoproliferativních onemocnění a autoimunitních poruch. Na trh se poprvé dostal v roce 1993 ve formě infuzního roztoku jako Leustatin firmy Janssen Pharmaceuticals v léčbě vlasatobuněčné leukémie (Accessdata.fda.gov, 2019; Tallman a Hakimian, 1995; Schreiber a Sorensen, 2011).

Chemická struktura kladribinu obsahuje oproti výchozímu 2'-deoxyadenosinu chlor v poloze 2 purinového kruhu. Díky této substituci je nukleosidový analog odolný vůči degradaci adenosindeaminázou, enzymem, který metabolizuje a odstraňuje přirozeně se vyskytující deoxynukleosidy. Díky této rezistenci se prodlužuje doba setrvání v intracelulárním prostoru (Havrdová, 2017; Schreiber a Sorensen, 2011; Spurgeon et al., 2009). Nevýhoda účinné látky spočívá v její špatné rozpustnosti ve vodě či jiných běžných organických rozpouštědlech, jako je methanol či ethanol, kde je téměř nerozpustný. Naopak v polárních aprotických rozpouštědlech, jako je DMSO či DMF, je velmi dobře rozpustný (Accessdata.fda.gov, 2019; Selleckchem.com, 2023).

Kladribin je proléčivo, které musí být intracelulárně fosforylováno na aktivní formu, 2-chloro-deoxyadenosintrifosfát (Cd-ATP), aby bylo biologicky účinné. Do buňky vstupuje prostřednictvím nukleosidových transportních proteinů a uvnitř buňky se aktivuje třemi po sobě následujícími fosforylacemi, z nichž první je katalyzována enzymem deoxycytidinkinázou (dCK). Tento enzym je odpovědný za míru konverze proléčiva kladribinu na jeho aktivní trifosfátovou formu (Piřha, 2018; Schreiber a Sorensen, 2011).

Je rovněž toxickou molekulou, a proto je zejména při léčbě neonkologických indikací (roztroušená skleróza, případně myasthenia gravis, autoimunitní hemolytická anémie, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus, psoriáza) žádoucí vyvinout stabilní robustní finální lékovou formu, která vykazuje vysokou biologickou dostupnost a umožňuje tak minimalizovat dávkování. Kromě léčby vlasatobuněčné leukémie je schválen také pro léčbu

B- buněčné chronické lymfocytární leukémie a vykazuje slibnou účinnost a dobrý bezpečnostní profil u pacientů s roztroušenou sklerózou (Robak et al., 2006; Castelli et al., 2008).

Farmakokinetické vlastnosti byly studovány po perorálním a intravenózním podání u pacientů s roztroušenou sklerózou, u pacientů s malignitami a v systémech *in vitro*. Populační kinetická analýza neprokázala vliv věku ani pohlaví na farmakokinetické vlastnosti kladribinu. Po perorálním podání se kladribin rychle absorbuje. Pokud se podával perorálně nalačno, bylo dosaženo maximální plazmatické koncentrace (t_{max}) již půl hodiny po podání, pokud se podával s jídlem a vyšším obsahem tuku, absorpce se zpozdila na přibližně 1,5 hodiny. Biologická dostupnost 10 mg perorální tablety byla přibližně 40 %, což se vysvětluje především neúplnou absorpcí v důsledku refluxu zprostředkovaného transportními mechanismy. Ani po opakovaném podání nebyla pozorována žádná významná kumulace léčiva v plazmě. Kladribin má potenciál pronikat hematoencefalitickou bariérou a samotný nebo jeho fosforylované metabolity se ve značné míře akumulují a zůstávají v lidských lymfocytech (Pitřha, 2018; Ema.eu-ropa.eu, 2017).

Vzhledem k velikosti molekuly je kladribin ideálním kandidátem pro vývoj lékové formy perorálního přípravku. Tablety kladribinu byly první perorální terapií s omezeným cyklem dávkování schválenou pro pacienty s recidivujícími (relapsujícími) formami roztroušené sklerózy (Castelli et al., 2008; Rammohan et al., 2020; Robak et al., 2006).

3.2.1 Polymorfismus

Kladribin je molekula se třemi stereogenními centry. Jsou možné dva stereoizomery, 9- α a 9- β . API (účinná farmaceutická látka) je 9- β stereoizomer. Jsou známy nejméně dva polymorfy. Vzorky XRPD (rentgenová prášková difrakce) všech dosud vyrobených šarží kladribinu odpovídají stejnému polymorfu. Kromě toho nebyla pozorována žádná interkonverze vyrobené formy na jiný polymorf (Ema.europa.eu, 2017; Tga.gov.au, 2018).

Polymorfismus je typický jev pro většinu farmaceutických molekul. Je to schopnost pevné látky krystalizovat, v závislosti na krystalizačních podmínkách, v různých krystalových strukturách – polymorfech. Molekuly jsou v krystalové struktuře spojeny slabými interakcemi, např. vodíkovými můstky nebo van der Waalsovými silami. Jednotlivé polymorfy se liší konformací, pakováním (rozdílné uspořádání atomů v krystalové struktuře) nebo jejich kombinací. Různé polymorfy se mohou lišit fyzikálně chemickými vlastnostmi, např. rozpouštěcí rychlostí, stabilitou, hustotou nebo hygroskopicitou. Pokud léčivo tvoří více než jeden polymorf, termodynamicky nejstabilnější je charakterizován nejnižší Gibbsovou energií, nejnižší rozpouštěcí rychlostí a nejnižší reaktivitou. Problémem ve farmaceutickém průmyslu

je přechod méně stabilních forem na stabilnější polymorfy. Tento jev je proto pod zvýšeným dohledem regulačních autorit (Brittain, 2016; Řeháčková, 2018; Šesták et al., 2010).

3.3 Perorální lékové formy kladribinu

3.3.1 Mikroemulze

Podle informací dostupných ze souhrnné zprávy je kladribin klasifikován jako látka třídy III podle klasifikačního biofarmaceutického systému BCS, tj. látka s vysokou rozpustností a nízkou permeabilitou. Podle fyzikálně chemické definice rozpustnosti léčiva v USP 38 NF 33 lze kladribin s maximální rozpustností ve vodě 6,35 mg/ml klasifikovat jako lehce rozpustnou molekulu (Ema.europa.eu, 2017; The United States Pharmacopeia, 2015; National Center for Biotechnology Information, 2023).

Jedním z optimálních řešení se zdála být možnost použití tekuté lékové formulace s rychlou rozpustností a schopností chránit degradaci účinné látky nebo alespoň umožnit rychlejší absorpci kladribinu z okamžitě dostupné vyšší koncentrace účinné látky. Vzhledem k tomu, že je kladribin špatně rozpustný ve vodných rozpouštědlech, využívá se ke zmenšení velikost částic a zlepšení rozpustnosti této API technika mikroemulgace (Kamath a Sivakumar, 2017).

Mikroemulze jsou formulace na bázi lipidů. Tyto formulace se obvykle skládají ze čtyř různých složek, lipofilní fáze a hydrofilní fáze, které jsou stabilizovány povrchově aktivní látkou – surfaktantem a kosurfaktantem. Mikroemulze jsou čiré, průhledné, izotropní a termodynamicky stabilní disperze s velikostí částic v rozmezí 100-200 nm (Ghosh a Murthy, 2006; Scriven, 1976).

Výhodou mikroemulzí, jako potenciálních terapeutických systémů pro perorální podání, je jejich specifická struktura, která umožňuje inkorporaci hydrofilních, amfifilních a lipofilních API za účelem zvýšení jejich rozpustnosti, rychlosti a rozsahu absorpce a ochrany labilních účinných látek před prostředím gastrointestinálního traktu (Ameta et al., 2023).

3.3.2 Pevné disperze

Pojem pevná disperze označuje jednu nebo více léčivých látek v inertním nosiči v pevném stavu připravenou metodou tavení, odpařením rozpouštědla nebo jejich kombinací (Tran et al., 2019). Pro formulaci do pevné disperze jsem se rozhodla na základě porovnání s originálním léčivem Mavencladem s obsahem účinné látky kladribinu, jež je připraven metodou lyofilizace, a který byl schválený v indikaci roztroušené sklerózy.

Jedním z charakteristických rysů kladribinu je jeho nestabilita v kyselém prostředí. Vzhledem k tomu, že hlavním místem absorpce léčiv podávaných orální cestou je žaludek s nízkým pH, je absorpce léků citlivých k účinku kyselin žaludku obtížná. Lze použít např. enterosolventní formulace, popř. použití pufru nebo látek snižujících pH žaludku. Bohužel se tyto postupy u kladribinu ukázaly jako neúčinné (Alagga a Gupta, 2023).

3.4 Parenterální léčivé formy kladribinu

Kladribin lze užívat perorálně nebo parenterálně stejně jako jiná cytostatika. Kvůli pohodlí pacienta a méně ambulantních příjmů spojených s podáváním parenterální infuze léčiva je trendem přechod na jiné léčivé formy, zejména na perorální (Spurná et al., 2009). Avšak v případě kladribinu není perorální podání optimální hned ze dvou důvodů. První důvod spočívá v jeho nízké biologické dostupnosti a za druhé je to interakce hydroxypropyl- β -cyklodextrinu použitého pro přípravu orální formulace s jinými léčivy. Zatímco parenterální aplikace kladribinu dosahuje 100% biologické dostupnosti, u perorálních tablet je biologická dostupnost přibližně 40 % vlivem dekompozice účinné látky v kyselém prostředí žaludku (Ema.europa.eu, 2017; Medronho et al., 2018; Savic et al., 2017).

Zmíněné nedostatky parenterálních infuzí lze vyřešit formou subkutánní aplikace. Podávání do podkožní tkáně je typickou cestou zejména u těch léků, které nelze podávat ústy, protože by se např. nevstřebaly z gastrointestinálního traktu nebo jsou rychle metabolizovány např. v kyselém prostředí žaludku. Subkutánní injekce mohou být také použity, pokud je preferována zvýšená biologická dostupnost a rychlejší účinky oproti perorálnímu podávání. Subkutánní injekce se vstřebává pomaleji než látka podaná intravenózně nebo do svalu, ale rychleji než lék podaný ústy. Všeobecně platí, že maximální objem pro subkutánní injekce je 1 ml. Větší objemy jsou spojené s bolestivostí injekce a nežádoucími účinky v místě vpichu (Usach et al., 2019).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Enzymatická syntéza a její využití ve výrobě kladribinu

Nejprve jsem se zabývala tématem enzymatické syntézy a jejím využitím ve výrobě kladribinu. Pro vývoj enzymatické syntézy jsem se rozhodla z důvodu poskytnutí rychlé, ekonomicky výhodné a z hlediska ochrany životního prostředí šetrnější syntézy kladribinu, která by v kvalitě API odpovídající požadavkům evropského nebo amerického lékopisu (EP, USP). V současnosti je na trhu dostupná a využívána pouze chemicky vyrobená API. Syntéza účinné látky kladribinu je založena na použití vysoké koncentrace volně rozpustných transglykosidáz ve vodném roztoku pufru, zcela bez obsahu organických rozpouštědel. Vstupními surovinami jsou 2- chloradenin, 2'-deoxyuridin a enzymy UP a PNP v koncentraci minimálně 20 000 U/l. Kladribin je z reakční směsi získáván pouhou precipitací ze zakonzentrovaného média ve výtěžku 5 a více gramů/litr/hod. Výsledný precipitát (1. krystal) obsahuje min. 98 % kladribinu. Tento první krystal se může přechistit pod refluxem do čistoty min. 99,9 %. Vzhledem k polymorfismu u kladribinu byly jak precipitát (1. krystal), tak přečištěný krystal pod refluxem charakterizovány RTG práškovou difrakcí, kterou byla potvrzena přítomnost krystalické formy.

4.2 Farmaceutická kompozice obsahující pevnou disperzi amorfního kladribinu a farmaceuticky přijatelný nosič rozpustný ve vodě

V publikaci jsem se zabývala přípravou amorfního koevaporátu kladribinu s maltodextrinem z hrachu (Linecaps), jež obsahuje vysoký podíl amylózy. Tento nosič nabízí nový technický přístup při přípravě stabilní pevné disperze s obsahem kladribinu, který by byl vhodný pro přípravu finální orální lékové formy, neboť pevná disperze zlepšuje uvolňování léčivé látky z nosiče. Experimenty bylo zjištěno, že Linecaps v přítomnosti hydroalkoholického roztoku neočekávaně zlepšil rozpustnost a tedy i množství potřebného nosiče k rozpuštění a stabilizaci kladribinu v roztoku. Optimální hmotnostní poměr kladribin: Linecaps byl 1:10. Struktura získané amorfni pevné disperze byla potvrzena RTG práškovou difrakcí.

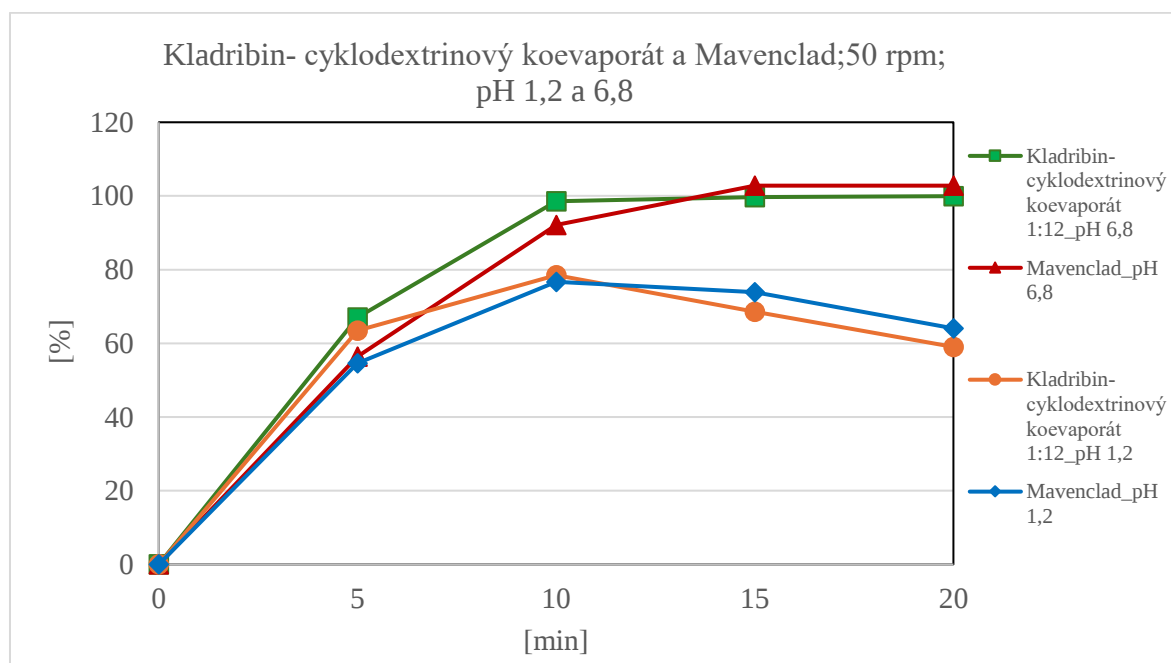
Vyrobena amorfni pevná disperze byla použita ve finální lékové formulaci, orálních tabletách. Kladribinové tablety o celkové váze 200 mg obsahovaly 110 mg pevné disperze (hmotnostní poměr kladribin:Linecaps 1:10), a jako pomocné látky byly zvoleny mikrokystalická celulóza, kroskarmelóza sodná a magnesium stearát. Formulace byla následně testována disolucí. Disoluční médium mělo pH 4,5 a míchalo se rychlostí 50 otáček/ min. Stejně chování vykazovala formulace i při pH 6,8 a stejné intenzitě míchání.

4.3 Způsob výroby amorfních kladribinových koevaporátů s cyklodextriny

Kromě kladribinového koevaporátu s obsahem maltodextrinu z hrachu jsem chtěla překonat nevýhody dosavadních způsobů výroby cyklodextrin-kladribinového komplexu a poskytnout robustní, nákladově efektivní a snadno aplikovatelnou technologii, která poskytne produkt o stejných fyzikálně chemických vlastnostech jako komplex připravený lyofilizací.

Během experimentů jsem překvapivě zjistila, že za použití hydroalkoholického roztoku se snižuje objem rozpouštědel nutných pro rozpuštění API a výrazně se zkracuje doba nutná k rozpuštění kladribinu v roztoku cyklodextrinu. Po rozpuštění obou složek v hydroalkoholickém roztoku je tento roztok odpařen pomocí vakuové odparky do vzniku bílého až poloprůhledného mléčného materiálu. Koevaporát obsahující kladribin, cyklodextrin a zbytkové množství organického rozpouštědla byl charakterizován RTG práškovou difrakcí. Takto připravená směs nevykazovala charakteristické rysy krystalické struktury.

Připravený amorfní koevaporát vykazoval shodné fyzikálně chemické vlastnosti jako vzorek připravený lyofilizací. Avšak doba přípravy amorfního koevaporátu, stejně jako náklady na jeho přípravu, byly řádově nižší než příprava kladribinového komplexu metodou lyofilizace. Finální léková forma – tablety, obsahující kladribin-cyklodextrinový koevaporát, poskytovala stejný disoluční profil v rozmezí pH 1,0 až 6,8 jako originální léčivý přípravek Mavenclad (graf 1).



Graf 1: Srovnání disolučních profilů kladribin-cyklodextrinového koevaporátu s originálním přípravkem Mavenclad při 50 ot. a pH disolučního pufru 1,2 a 6,8

4.4 Mikroemulzní prekoncentrát s obsahem kladribinu a způsob jeho přípravy

Předmětem práce je nová perorální léková forma, jež umožňuje ochranu molekuly kladribinu před degradací v nízkém pH žaludku. A zároveň zvyšuje rozpustnost a v daném okamžiku tak, aby převažoval kladribin nad jeho degradačním metabolitem 2-chloradeninem.

Největší výzvou při formulaci do mikroemulzního systému byla rozpustnost kladribinu. Rozhodla jsem se pro použití aprotického polárního rozpouštědla, konkrétně DMSO v kombinaci s jedním pomocným organickým rozpouštědlem, Transcutolem HP nebo ethanolem, díky jejich přijatelné afinitě k vodě. DMSO jsem zvolila z důvodu vysoké koncentrace rozpuštěného kladribinu. Dalšími složkami prekoncentrátu byla neionogenní povrchově aktivní látka, polyoxyl hydrogenovaný ricinový olej (Cremophor RH 40) v kombinaci s lipofilní složkou propylenglykol monokaprylát (Capryol), glycerol monooleát (Peceol), oleoyl polyoxyl-6-glycerid (Labrafil) nebo glycerol monolinoleát (Maisine). Mikroemulzní systém byl navržen na základě předběžných experimentů s jednotlivými pomocnými látkami a binárními/ternárními směsmi po-mocných látek a API. Pomocí prekoncentrátů s různými poměry jednotlivých složek byl sestrojen ternární fázový diagram hydrofilní fáze (DMSO, Transcutol HP), Cremophoru a Labrafilu (popř. Maisinu, Peceolu, Capryolu).

Finální formulace byla vybrána tak, aby splňovala podmínky polydisperzity a velikosti částic mikroemulze ve vodném prostředí. Nejvýhodnější chování vykazovala formulace obsahující 12,5 % Maisinu a 45 % Cremophoru. Tato formulace ve vodném prostředí spontánně tvoří transparentní disperzi neionogenních povrchově aktivních částic obsahující rozpuštěné molekuly kladribinu s velikostí částic pod 20 nm.

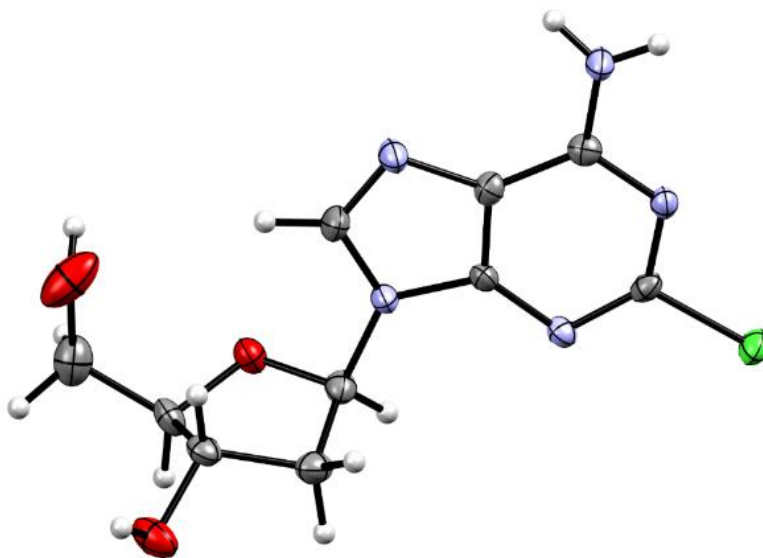
Formulace obsahující 12,5 % Maisinu byla testována v disolučním médiu o pH 1,2, kde dosáhla maximálního rozpuštění kladribinu v 5. minutě, ve 20. minutě se v roztoku stále nacházelo 72 % rozpuštěného kladribinu. Pro porovnání jsem zvolila originální tabletu Mavenclad, která dosáhla maximální koncentrace rozpuštěného kladribinu v 10. minutě, a to 78 %. Oproti kapalné formulaci obsahující Maisin je hodnota rozpuštěného kladribinu v tabletě ve 20. minutě přibližně o 20 % nižší. V souvislosti s disolucí jsem porovnávala hodnotu AUC (plocha pod koncentrační křivkou) mikroemulzního prekoncentrátu s obsahem Maisinu, která byla přibližně o 25 % vyšší než u komerčně dostupné tablety Mavencladu.

Z rozdílu mezi hodnotami AUC jednotlivých prekoncentrátů bylo zjevné, že použití lipidického vehikula výrazně zvyšuje rychlost uvolňování kladribinu z kapalné lékové formy na bázi mikroemulzního prekoncentrátu a pozitivně ovlivňuje disoluční profil v kyselém pH.

4.5 Kladribin monohydrát, způsob jeho přípravy a farmaceutická subkutánní formulace s vysokým obsahem účinné látky

Nový polymorf kladribinu, monohydrát kladribinu (obrázek 1), byl charakterizován monokrystalovou rentgenovou difrakcí, která byla doplněna práškovou rentgenovou difrakcí. Dále byla struktura zanalyzována termogravimetricky ve spojení s diferenční skenovací kalorimetrií (TG-DSC).

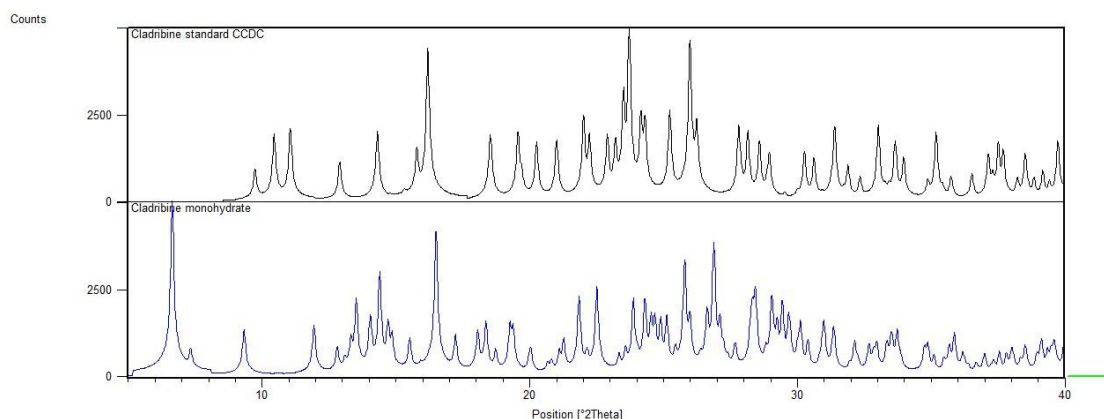
Absolutní struktura monohydrátu kladribinu byla charakterizována monokrystalovou strukturní analýzou pomocí Cu K α záření při teplotě sběru dat 200 K. Monohydrát kladribinu se sumárním vzorcem C₁₀H₁₂ClN₅O₃ krystalizuje v rombské soustavě a prostorové grupě, *P*2₁2₁2₁. V elementární buňce se nachází osm molekul kladribinu a osm molekul vody. Základní mřížkové parametry jsou uvedeny v tabulce 1. Porovnání RTG práškových difraktogramů monohydrátu s formou I kladribinu je zobrazeno na obrázku 2. Záznam formy I je získaný z databáze CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre).



Obrázek 1: ORTEP model monohydrátu kladribinu (elipsoidy zobrazené s 50% pravděpodobností)

Tabulka 1: Základní mřížkové parametry struktury monohydrátu kladribinu

a	7.1448(2) Å
b	13.4926(4) Å
c	26.5439(6) Å
α, β, γ	90°
V	2558.88(12) Å ³
Z (počet jednotek v buňce)	8
R-faktor (faktor upřesnění struktury)	0.0395
Hustota	1.577 (g/cm ³)



Obrázek 2: Porovnání rentgenových práškových difraktogramů monohydrátu kladribinu a formy I kladribinu

Každá krystalová forma má své individuální charakteristické píky. Jak je vidět na obr. 2. charakteristické píky monohydrátu kladribinu byly detekovány při 6.7°, 12.5°, 13.4°, 14.2°, 18.0°, 26.6° a 28.1° (2 θ) s tolerancí ± 10 %, zatímco píky formy I kladribinu jsou charakteristické při 10.9°, 11.5°, 23.9° a 24.8° (2 θ) s tolerancí ± 10 %. XRPD záznamy obou forem lze snadno rozlišit a experimentální vzorky se shodují se simulovanými záznamy vypočítanými z monokrystalové struktury. Velmi snadno lze vzorky odlišit i podle jejich morfologie, zatímco anhydrát formy I krystalizuje do tvaru kvádrů, monohydrát krystalizuje do tvaru tenkých jehliček.

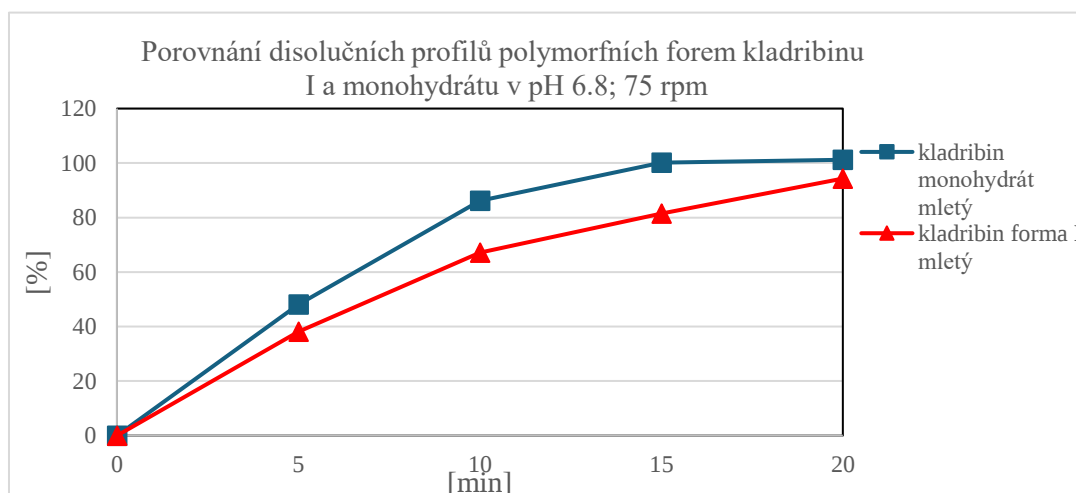
U nové formy – monohydrátu byly zkoumány farmaceuticky významné vlastnosti, jako je rozpustnost ve vodě či chování při rozpouštění. Monohydrát vykazuje lepší rozpustnost ve vodě a jiných organických rozpouštědlech než kladribin forma I, což je výhodné zejména při vývoji nových lékových forem. V tabulce 2 je srovnání rozpustností obou polymorfů kladribinu ve

vodě. Z tabulky je patrné, že rozpustnost monohydrátu při teplotě 25 °C byla přibližně 5krát vyšší a při teplotě 60 °C přibližně 2krát vyšší než u známého polymorfu.

Tabulka 2: Porovnání rozpustností API ve vodě při teplotě 25 °C a 60 °C

	Rozpustnost ve vodě [mg/ml], 25 °C	Rozpustnost ve vodě [mg/ml], 60 °C
Kladribin forma I	1	6
Kladribin monohydrát	5	14

Na grafu 2 je srovnání profilů rozpouštění polymorfů kladribinu v disolučním pufru o pH 6,8 a intenzitě míchání 75 otáček/ minutu. Srovnávací profil rozpouštění obou API ukazuje lepší chování monohydrátu než u známého polymorfu formy I. Zatímco pomletý monohydrát dosáhl 100 % za 15 minut, pomletý kladribin dosáhl za 15 minut 81 %.



Graf 2: Porovnání disolučních profilů dvou polymorfů kladribinu

Nový polymorf byl následně použit pro přípravu subkutánní formulace. Hlavním problémem v přípravě koncentrovaného parenterálního roztoku s obsahem kladribinu pro subkutánní aplikaci je jeho nízká rozpustnost a dlouhodobá stabilita ve vodných roztocích. Složení a příprava subkutánní formulace je zmíněná v patentové přihlášce PV 2022-519. Subkutánní léčková formulace využívá jako zdroj kladribinu kladribin monohydrát, zejména

díky jeho lepší rozpustnosti. Kladribin monohydrát byl spolu s cukerným nosičem na bázi cyklických oligosacharidů rozpuštěn ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědle, vodě pro injekce doplněné izotonickým činidlem a činidlem upravující pH, v rozmezí koncentrací 5 až 10 mg/ml. Nejvýhodnější se, na základě předběžných výsledků stabilitních zkoušek, jeví koncentrace 5 mg/ml. Poměr kladribinu a cukerného nosiče byl v rozmezí 1:5 až 1:20, přičemž nejvhodnější se jeví poměr 1:15. Celkový objem injekční dávky subkutánní formulace je 1 ml. V současnosti stále probíhají stabilitní zkoušky subkutánní formulace.

Dosud není na světovém trhu žádný aplikátor pro subkutánní podávání kladribinu. Bylo navrženo použití předplněné injekční stříkačky, která poskytuje větší bezpečnost pro pacienta tím, že snižuje možnost neúmyslného píchnutí jehlou a vystavení toxickým produktům, ke kterým by mohlo dojít při odebírání dávky léčiva ze zásobní lahvičky. Zároveň by použití těchto předplněných injekčních stříkaček s předem odměřenou dávkou mohlo snížit chyby při dávkování a zvýšit komplianci pacienta. Jejich výhoda spočívá zejména v pohodlí, cenové dostupnosti, přesnosti, sterilitě a bezpečnosti (Makwana et al., 2011).

5 Závěr

Disertační práce se zabývala nukleosidovým analogem kladribinem. Cílem práce bylo navrhnout nový přístup ve výrobě účinné látky, a to nahrazením dostupné chemické syntézy enzymatickou cestou. Dále práce směřovala na hledání nových polymorfů, jejich využití v lékových formách a následné testování metodami danými lékopisem.

Nejprve byl proveden průzkum možností enzymatické syntézy nukleosidových analogů. Kladribin je komerčně dostupný pouze jako produkt chemické syntézy. Za použití kombinace rekombinantních enzymů UP a PNP v *E. coli* a dvou vstupních surovin, 2-chloradeninu a 2'-deoxyuridinu, byl po optimalizaci nalezen ideální poměr vstupních surovin. Reakce probíhala ve vodném prostředí bez použití organických rozpouštědel. Vzhledem k vysoké koncentraci použitých volných enzymů byla reakční rychlost natolik vysoká, že se produkce kladribinu pohybovala okolo 5 g/l/hod. Díky těmto podmínkám klesla cena biotechnologicky připraveného kladribinu na přibližně 1/5 ceny chemicky vyrobené API.

Hledání nových polymorfů bylo pro kladribin zásadní zejména kvůli jeho špatné rozpustnosti v přijatelných rozpouštědlech, jež jsou dané lékopisem. Byla připravena struktura monohydrátu kladribinu, u kterého byla monokrystalovou rtg difrakcí vyřešena struktura. Monohydrát vykazuje přibližně 5krát lepší rozpustnost ve vodě při 25 °C než u známého polymorfu – formy I, při teplotě 60 °C byla rozpustnost monohydrátu ve vodě přibližně 2krát vyšší.

Nový polymorf byl použit při přípravě koncentrovaného roztoku subkutánní lékové formy. Cílem bylo nalézt vhodnou formulaci, která by splňovala požadavky na dlouhodobou stabilitu. Kladribin monohydrát byl rozpuštěn ve vodě pro injekce společně s cukerným nosičem na bázi cyklického oligosacharidu v různých poměrech a s dalšími pomocnými látkami. Nejvhodnější se z hlediska stabilitních zkoušek a finálního objemu subkutánní dávky jevila koncentrace API 10 mg/ml, poměr kladribinu a cukerného nosiče byl nejvýhodnější 1:15. Největší výhoda subkutánní formulace spočívala ve 100% biologické dostupnosti účinné látky.

Dále byly vyvinuty dvě nové pevné lékové formy s obsahem kladribinu. Ve formulacích byly využity cukerné nosiče, maltodextrin z hrachu (Linecaps) a cyklodextrin, ve formě pevné disperze. V obou případech se jednalo o amorfní koevaporát, jež zlepšoval uvolňování účinné látky z nosiče. Tento způsob přípravy nabízí levnější způsob výroby kladribinových tablet oproti originálnímu přípravku Mavenclad. Tablety s obsahem cyklodextrinu byly testovány *in vivo* i *in vitro*. Disoluční testování vyvinutých formulací je srovnatelné s originálním léčivem,

zatímco testování *in vivo* na živých organismech nevychází podle předpokladů, biologická účinnost byla nižší než uváděných 40 %.

Poslední vyvinutou formulací byl mikroemulzní prekoncentrát. Kladribin byl rozpuštěn ve směsi organického rozpouštědla spolu s kosolventem v nejmenším možném množství. Tento roztok byl smíchán se směsí modifikovaných lipidů o různých hodnotách HLB tak, aby výsledný prekoncentrát tvořil ve vodném prostředí homogenní a transparentní mikroemulzi o velikosti částic menších než 50 nm. Problémem se jevila přítomnost rozpouštědla DMSO, které patří do rozpouštědel kategorie III. s denním limitem 50 mg/člověka. Nicméně testování *in vivo* i *in vitro* vychází ve prospěch této formulace. V kyselém prostředí žaludku (simulace disolucí) je rozpad účinné látky zpomalen, *in vivo* testování na živých organismech taktéž vypovídá ve prospěch mikroemulzního prekoncentrátu, biologická účinnost byla přibližně 80%.

6 Seznam literatury

- Accessdata.fda.gov (2019). *Product quality review cladribine*. [online] [cit. 14.8.2023]. Dostupné z https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/022561Orig1s000ChemR.pdf
- Alagga, A.A., Gupta, V. (2023). *Drug Absorption*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bo-oks/NBK557405>.
- Ameta, R.K.; Soni, K.; Bhattarai, A. (2023). Recent Advances in Improving the Bioavailability of Hydrophobic/Lipophilic Drugs and Their Delivery via Self-Emulsifying Formulations. *Colloids Interfaces*, 7(1), 16.
- Boryski, J. (2008). Reactions of Transglycosylation in the Nucleoside Chemistry. *Current Organic Chemistry*, 12(4), 309–325.
- Brittain, H.G., *Polymorphism in Pharmaceutical Solids, Second Edition*. 2016: CRC Press
- Cao, D., Pizzorno, G. (2004). Uridine phosphorylase: An important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. *Drugs of today*, 40. 431–43.
- Castelli Van A., V., Trivieri, G., et al. (2008). Characterisation of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(9), 3897–3906.
- Drenichev, M.S.; Oslovsky, V.E.; Zenchenko, A.A.; Danilova, C.V.; Varga, M.A.; Esipov, R.S.; Lykoshin, D.D.; Alexeev, C.S. (2022). Comparative Analysis of Enzymatic Transglycosylation Using E. coli Nucleoside Phosphorylases: A Synthetic Concept for the Preparation of Purine Modified 2'-Deoxyribonucleosides from Ribonucleosides. *Int. J. Mol. Sci*, 2022, 23, 2795.
- Ema.europa.eu (2017). *Mavenclad assessment report*. [online] [cit. 17.5.2021]. Dostupné z https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/mavenclad-epar-public-assessment-report_en.pdf
- Ghosh P.K., Murthy R.S.R. (2006). Microemulsion potential drug delivery system, *Current drug delivery*, 3, 167–180.
- Havrdová (2017). Kladribin – mechanismus účinku. *Neurol. Praxi*, 18, 5–8.

- Ichikawa, E., Kato, K. (2001). Sugar-modified nucleosides in past 10 years, a re-view. *Current medicinal chemistry*, 8(4), 385–423.
- Kamath, H.; Sivakumar, A. (2017). Microemulsion based formulation as drug delivery system for gliclazide. *Int J Pharm Edu Res*, 51: 571–9.
- Lapponi, M. J., Rivero, C. W., Zinni, M. A., Britos, C. N., & Trelles, J. A. (2016). New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 218–233.
- Lee, J., Filosa, S., Bonvin, J., Guyon, S., Aponte, R. A., & Turnbull, J. L. (2001). Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Purine Nucleoside Phosphorylase from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 22(2), 180–188.
- Leer, J. C., Hammer-Jesperen, K., & Schwartz, M. (1977). Uridine Phosphorylase from *Escherichia coli*. *Physical and Chemical Characterization. European Journal of Biochemistry*, 75(1), 217–224.
- Makwana S., Basu B., Makasana Y., Dharamsi A. (2011). Prefilled syringes: An innovation in parenteral packaging. *Int J Pharm Investig*. 1(4):200–206.
- Medronho, B. F. F., Gonçalves, S., Rodríguez-Solana, R., Valente, A. J. M., & Romano, A. (2018). Interactions between Bio-Based Compounds and Cyclodextrins. *Cyclodextrin - A Versatile Ingredient*, chapter 3, 70–94.
- Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I. (2010). New trends in nucleoside biotechnology. *Acta Naturae*, 2(2):36–59.
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 20279, Cladribine. [online] [cit. 14.8.2023]. Dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cladribine>
- Piřha J. (2018) Kladribin – nová alternativa v léčbě vysoce aktivní relabující remitující roztroušené sklerózy. *Remedia*; 28, 49–59.
- Rammohan K., Coyle P.K., Sylvester E., Galazka A., Dangond F., Grosso M., Leist T.P. (2020). The Development of Cladribine Tablets for the Treatment of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Drugs*, 80(18), 1901–1928.

- Robak, T., Wierzbowska, A., & Robak, E. (2006). Recent Clinical Trials of Cladribine in Hematological Malignancies and Autoimmune Disorders. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 1(1), 15–34.
- Řeháčková, Z. (2018). *Příprava a charakterizace nových multikomponentních forem lenalidomidu a levetiracetamu*. Diplomová práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie.
- Savic, R. M., Novakovic, A. M., Ekblom, M., Munafo, A., & Karlsson, M. O. (2017). Population Pharmacokinetics of Cladribine in Patients with Multiple Sclerosis. *Clinical Pharmacokinetics*, 56(10), 1245–1253.
- Scriven L. (1976). Equilibrium bicontinuous structures. *Nature*, 263, 123–125.
- Selleckchem.com (2023). *Cladribine Datasheet*. [online] [cit. 14.8.2023]. Dostupné z <https://www.selleckchem.com/products/Cladribine.html>.
- Schreiber K., Sorensen P. S. (2011). Cladribine in the treatment of multiple sclerosis, *Clin. Invest.* 1(2), 317–326.
- Silva, R.G. et al. (2003). Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein expression and purification*, 27,1, 158–64.
- Spurgeon, S., Yu, M., Phillips, J. D., & Epner, E. M. (2009). Cladribine: not just another purine analogue? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(8), 1169–1181.
- Spurná Z., Brančíková D., Katolická J. (2009). Kvalita života pacienta při podávání perorální onkologické léčby. *Onkologie*, 3(2), 101–105.
- Šesták, J., J.J. Mareš, and P. Hubík, *Glassy, Amorphous and Nano-Crystalline Materials: Thermal Physics, Analysis, Structure and Properties*. 2010: Springer Netherlands.
- Tallman, M. S. and Hakimian, D. (1995). Purine nucleoside analogs: Emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders, *Blood*, 86,2463–2474.
- The United States pharmacopeia. The National formulary. (2015). *USP 38, NF 33*. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland. ISBN: 9781936424443.
- Tran P., Pyo Y. C., Kim D. H., Lee S. E., Kim J. K., Park J. S. (2019). Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs. *Pharmaceutics*, 11(3):132.

Usach I., Martinez R., Festini T., Peris J.E. (2019). Subcutaneous Injection of Drugs: Literature Review of Factors Influencing Pain Sensation at the Injection Site. *Adv Ther.* 36(11), 2986–2996.