β-laktam Antibiyotiklerin Kristalleşmelerinin Kontrolü ve Modellenmesi

ARASTIRMA RAPORU

ARAS. GOR. DR. MUSTAFA FATIH ERGIN

Danisman: Prof. Dr. Martha Grover

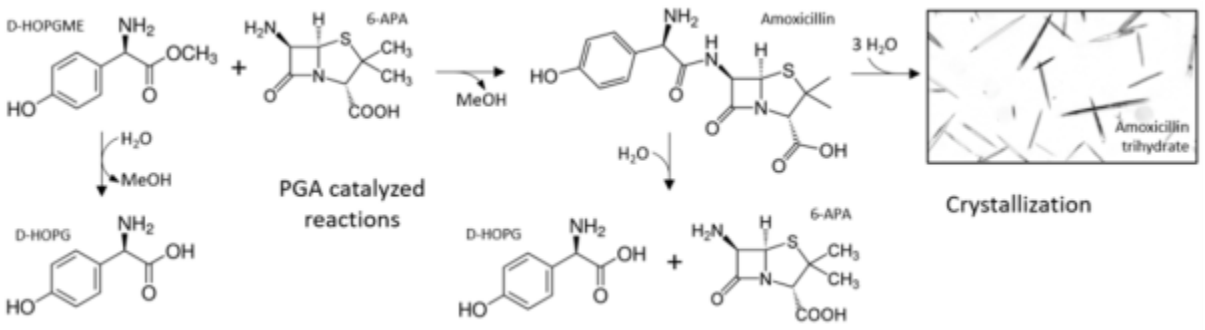
Georgia Institute of Technology

1. GIRIS

İlaç endüstrisi, ilaç üretim aşamalarında sürekli olarak gelişmeyi talep etmektedir. Bu endüstride, kaliteli ürünün hızlı ve düşük maliyetle üretilmesi istenmektedir. İstenilen polimorfik forma, morfolojiye ve boyut dağılımına sahip kaliteli kristaller üretmek için kristalleştirme sürecinin oldukca iyi tasarlanması gerekmektedir, bu da taleplerin karşılanmasını destekleyecektir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, The Food and Drug Administration), kristalizasyon sürecinin tasarımı için proses analitik teknolojisinin (PAT, The Process Analytical Technology) kullanılmasını tasarıma göre kalite yaklaşım (QbD, Quality by Design) yoluyla teşvik eder [1]. Bu yöntem, ürünün kalitesi muhafaza edildiği sürece, kristalizasyon işleminin çalışma koşullarındaki ve proses parametrelerinin değişimi açısından daha esnek olmasını sağlar. Bu projede, kristalizasyon süreçlerinin modellenmesi ve optimizasyonu için gerekli süreç bilgisi ve anlayışını arttırmak adına PAT araçlarının kullanımı ve katı hal analitik (SSA) teknikleri ile birlikte QbD yaklaşımlarından da yararlanılacaktır.

β-laktam antibiyotikler, dünyada en yaygın kullanılan antibiyotik türleridir ve ortalama 28 milyar dolar yıllık satışa sahiptir. Kullanılan tüm ilaç satışlarının %3,3'ünü ve anti-infektiflerin ise %30'unu oluşturmaktadır [2]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), temel anti bakteriyel ilaçların %50'sinden fazlasını içeren 15 β-laktam ilacı, temel ilaçlar olarak listelemektedir [3]. Uzun yıllardan beri bu ilaçlar, toplumlar tarafından sağlık hizmetlerinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır, günümüzde ise talebin oldukça hızla arttığı belirlenmiştir [4]. Artan talebin tahmin edilebilmesinin zorluğu düşünüldüğünde, β-laktam ilaç kıtlığı zaman zaman görülmektedir [5]. Artan talebi karşılamak ve bu temel ilaçlara olan ihtiyacı gidermek için sürekli üretim ve daha fazla kapasite gereklidir.

Amoksisilin, ampisilin ve sefaleksin gibi yarı sentetik β-laktamların sentezi tipik olarak penisilin G asilaz (PGA) ile katalize edilir. Daha yüksek verimli β-laktam üretiminin önündeki en önemli engel zayıf seçiciliğin yanı sıra kinetik olarak kontrol edilen sentez hem birincil hem de ikincil hidroliz ile rekabet etmesidir (bkz. Şekil 1).



Şekil 1. Amoksilin, kristalizasyon ve yan reaksiyonlar için sentez şeması.

2. PROJENIN GEREKCESI VE ARASTIRMA SORUSU

Günümüzde, amoksilin, ampisilin ve sefaleksin gibi yüksek hacimli β-laktam antibiyotikler genellikle bitkiler vasıtasıyla üretilmekle birlikte ve bunlardan en az birkaç β-laktam ve non-β-laktam ürünler sunulmaktadır [2]. Bununla birlikte, diğer ilaçların β-laktamlar tarafından kolayca kontamine olabilmesi, tek başına β-laktam tesislerinin kurulması yöntemine yol açmıştır [5]. Penisilinler, genellikle yaklaşık %0.01-0.05 oranında ölümcül bir alerjiye neden olan anafilaksiye neden olabilmektedir [6]. Anti β-laktam'larin diğer ilaçlar üzerinde kirletici bir etkiye sahip olmasi nedeniyle bulunduğu bir ortamda, FDA, β-laktam üretiminin farklı bir tesiste gerçekleştirilmesini "güçlü bir şekilde" tavsiye etmistir [7]. Yeni β-laktam özel tesislerin kurulması, kaliteyi urun sağlanmasi, artan talebi karşılanmasi ve yeni yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerin üretimi ile daha verimli süreçlerin uygulanması açısından oldukça iyi bir fırsat sunmaktadır. Mevcut farmasötik üretim ve dağıtım modeli, stoklanan ve yavaşça dağıtılan büyük partilere dayanmaktadır (bazıları sentezlemek için bir yıl almaktadır). Bu yöntem gerçek zamanlı talebi karşılayamamaktadır (hastalık salgını veya arz kesintisine karşılık olarak). Bu ihtiyaç, ilaç endüstrisini, sadece potansiyel maliyet avantajlarından dolayı değil ayni zamanda sürekli üretimin verimliliği artırabileceği ve çevresel ayak izini azaltabileceği için sürekli üretim yönüne yöneltmiştir. Validasyonu yapılmış sürekli bir proses, her bir ilaç molekülü aynı işlemden geçtikten sonra, üretim süresini ve bir partinin standartlara uyma riskini azalttığı için, her parti de kalite testi gerektirmemektir. β-laktam antibiyotikler şu anda partiler halinde üretilmekte, ancak artan talepleri onlara sürekli süreçler için büyük bir aday sınıfı kazandırmaktadır.

Bu proje ile farklı çözücüler ve proses koşulları değiştirilerek çalışılan API'lar için ilaç endüstrisinde kullanılabilecek en verimli kristal elde edebilmek adına en uygun çalışma şartları proses optimizasyonu deneysel tasarım kullanılarak gerçekleştirilecektir.

Tüm bu açıklamalar ışığında, öneride bulunulan bu projenin Ülkemiz ilaç sektöründe üst düzey yöneticilerin fikirleri de alınarak planlandığı için hem literatür olarak hem de endüstrinin sorunlarını ortadan kaldırmak adına gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

3. DENEYSEL CALISMALAR

Malzeme ve Yontem

Amoksisilin trihidrat (AMCT) Alfa Aesar'dan satın alındı ve alındığı şekilde kullanıldı. 4-Hidroksifenilglisin (4HPG, ≥98%) Sigma Aldrich'ten satın alındı ve alındığı gibi kullanıldı. Hidroklorik asit konsantresi (1 L için 1.0 M HCl) Sigma-Aldrich'ten satın alındı ve 1 L'lik bir hacimsel şişeye konuldu; daha sonra işarete kadar HPLC dereceli su ile doldurulduu. Sodyum hidroksit Sigma-Aldrich'ten satın alındı ve 5.0 M'lik bir çözelti hazırlamak için kullanıldı. Potasyum fosfat monobazik (HPLC için ≥% 99.5) ve dibazik (HPLC için ≥% 99.0) Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. Su (H20, HPLC için CHROMASOLV Plus), etanol (HPLC% 99 için etOH, CHROMASOLV) ve asetonitril (ACN, CHLCOMASOLV, HPLC HP% 99) Sigma-Aldrich'ten satın alındı ve alındığı gibi kullanıldı.

Ayirma denemeleri

AMCT'yi saflastirmak icin iki adet deney seti kullanilmistir. Ilk denemede, AMCT ve 4-HPG ile birlikte kristallendirilmistir (urun 1). Ikinci denemede urun 1 tekrar kristallendirilmistir. İlk denemede, 1: 10 ve 1: 5 4-HPG: AMCT'de 1.67 g AMCT ve 4-HPG ağırlık oranları (sırasıyla 0.167 g ve 0.334 g) 100 ml 1 M HCl içinde çözüldü. Çözünmemiş katıları ayirmak için 0,45 µm'lik bir PTFE şırınga filtresi kullanıldı. Çözeltinin pH'ı daha sonra 5 M NaOH kullanılarak ve ardından bir saat bekletilerek 4.7'ye ayarlandı. Kristalleşme, 70: 30 etilen glikol: su banyosu kullanılarak 4

° C'de kontrol edildi. Kristalizasyondan elde edilen katılar toplandı ve 10 ml etil alkol ve su karışımı (saf su - %25 Etanol- %50 Etanol - %75 Etanol – Saf etanol) kullanılarak yıkandı. Elde edilen ürünlerde 4-HPG miktarı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlendi

High-performance liquid chromatography

HPLC cihazı (Agilent 1260 Infinity), bir UV diyot dizi dedektörü (Agilent Technologies G1315D) ile donatılmıştır. Kullanılan kolon, bir Agilent ZORBAX Bonuss-RP 150 x4.6 mm kolon kullanilmistir. Absorbans için maksimum dalga boyu 230 nm'e ayarlandı. Konsantrasyonlar, bir 35 dakikalık gradyan elüsyon programı (Tablo 1) kullanılarak analiz edildi.

Tablo 1: Kullanilan Gradient elusion programi

Zaman (dak)	0	5	25	30	35
%B/(B+A)	0	40	40	0	

A = phosphate buffer solution (0.05 M, pH ca.5.9); B = 3 : 1 methanol : acetonitrile.

Sonuclar

Saf AMCT ve saf 4- HPG iceren ve bes farkli konsantrasyon icin pik - alan oranının doğrusallığı, Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterildiği gibi elde edilmistir, burada 4-HPG için 0.989, AMCT için 0.990 korelasyon katsayısına sahip lineer bir çizgi elde edilmistir.

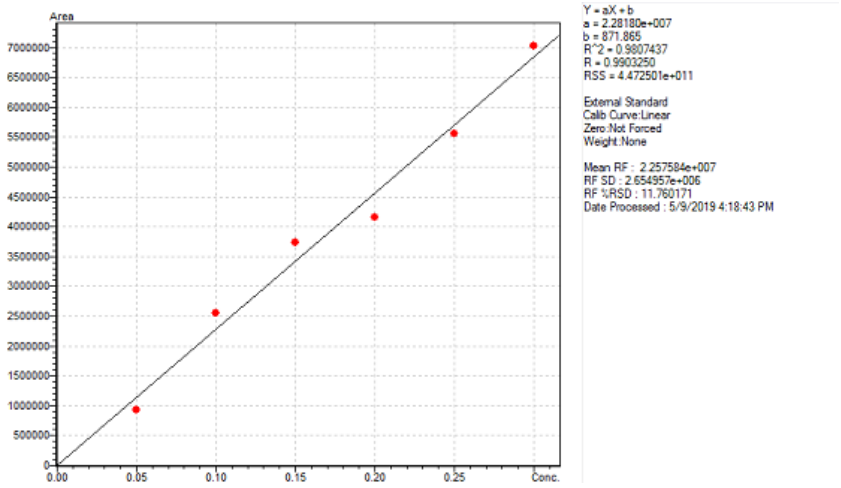


Figure 1: Standard curve for 4-HPG.

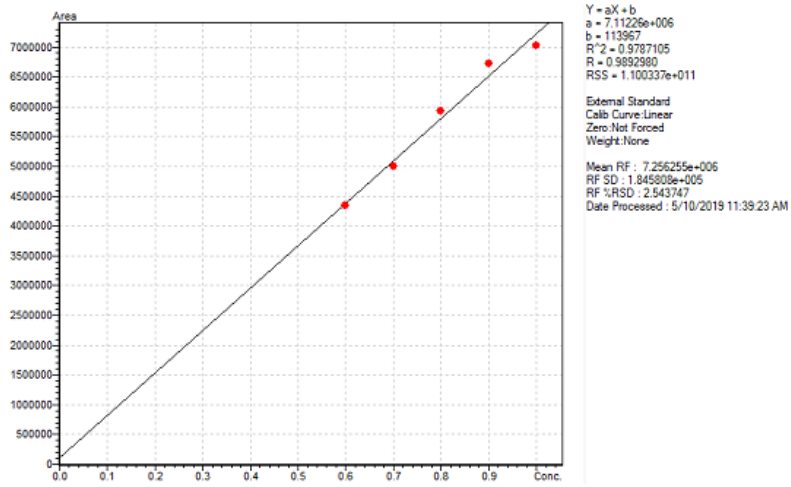


Figure 2: Standard curve for AMCT

Amoksisilin trihidrat (AMCT) suda hafifçe çözünür ve etanolde çok az çözünür. AMCT'nin çözünürlüğü, Şekil 3'de görülebileceği gibi, cozucu karisimlari içinde artan sıcaklıkla artar. Ayrıca, çözücü karışımındaki etanol miktarı arttıkça, AMCT'nin çözünürlüğü azalmistir.

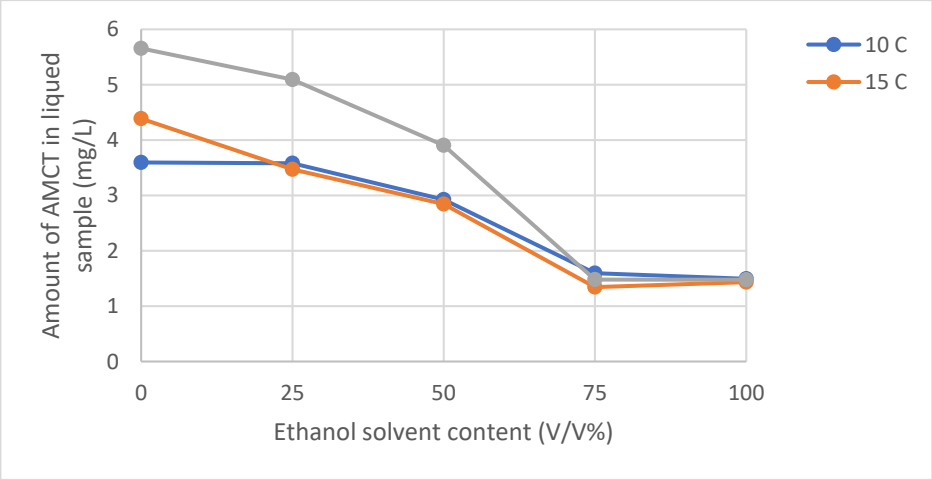


Figure 3: Etanol solvent karisimi icerisinde AMCT cozunurlugu.

Safsizlik olarak kullanilan 4-HPG çözünürlüğü, cozuculerin farkli karisimlari icin artan sıcaklıkla arttigi belirlenmistir. 4-HPG'nin saf sudaki çözünürlüğü ise diger karisimlara gore daha düşük olduğu ve etanol içindeki 4-HPG'nin çözünürlüğünün en büyük oldugu gorulmustur.

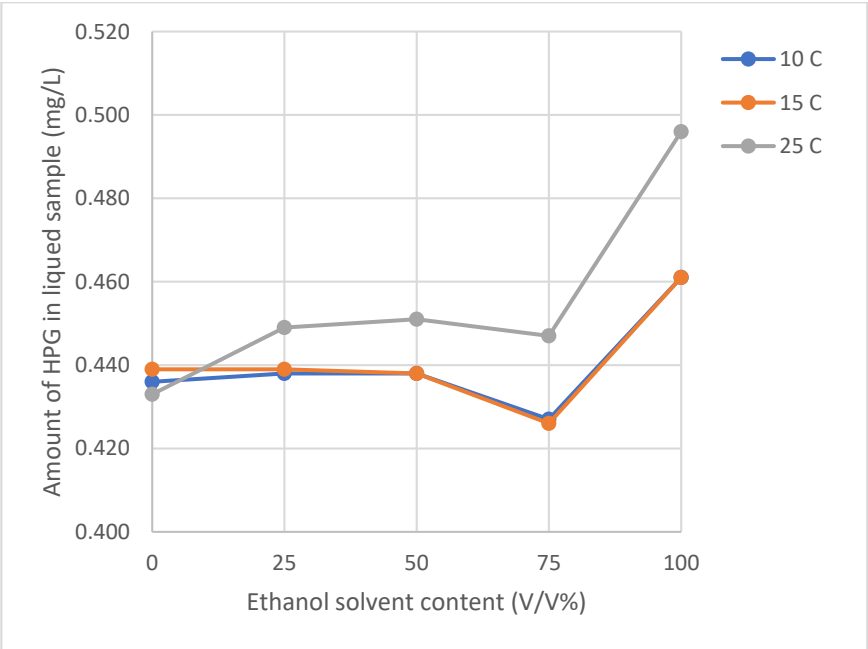


Figure 4: Etanol solvent karisimi icerisinde 4-HPG cozunurlugu

Elde edilen kristaller etanol ve su karisimi ile yikandiktan sonra farkli sicakliklar icin AMCT miktari Sekil 5 ve 6'da verilmistir. Sicaklik degisiminin genel olarak AMCT miktarini etkilemedigi Sekil 5'de anlasilmaktadir. Yine solvent degisiminin kristal yapi icerisinde bulunan

AMCT'yi etkilemedigini soylebiliriz. Sekil 6 incelendiginde ise safsizlik olarak kullanilan 4-HPG'nin sicakliga karsi daha hassas oldugunu soyleyebiliriz. Ancak Sekil 4 ve 6 birlikte incelendiginde sicaklik artisi ile birlikte safsizligin uzaklastirildigi gorulmektedir. Yine solvent acisindan incelendiginde solvent icerisinde etanol miktari arttikca 4-HPG miktari azalmaktadir.

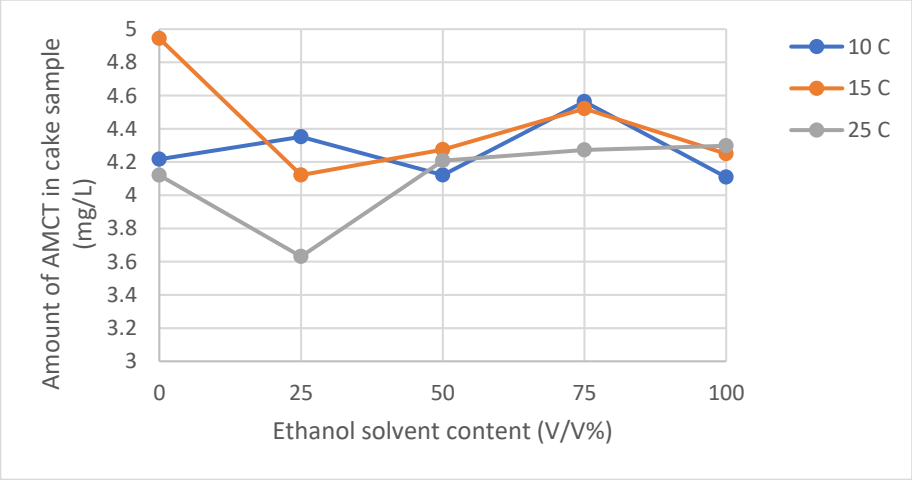


Figure 5: Kristal icerisindeki AMCT miktari

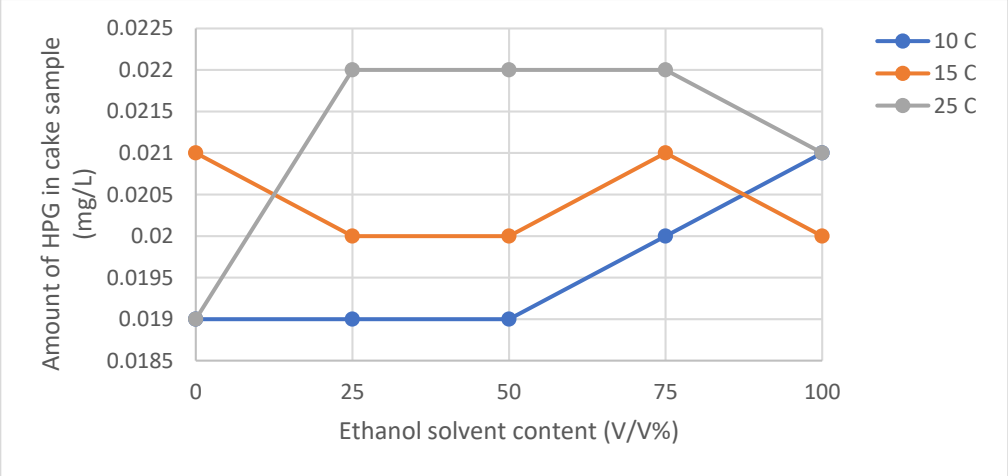


Figure 6: Kristal icerisindeki 4-HPG miktari

Sekil 7 ve 8, kristal cozeltisi suzuldukten sonra elde edilen ana likor ve elde edilen islak kek icerisindeki AMCT ve HPG miktarini gostermektedir. Sicaklik artisi ile birlikte ana likor

icerisindeki AMCT ve 4-HPG miktari artarken kristal kek icerisindeki AMCT ve 4-HPG miktari azalmaktadir. Dolayisi ile sicaklik artisi urun verimini negatif olarak etkiledigi gorulmektedir.

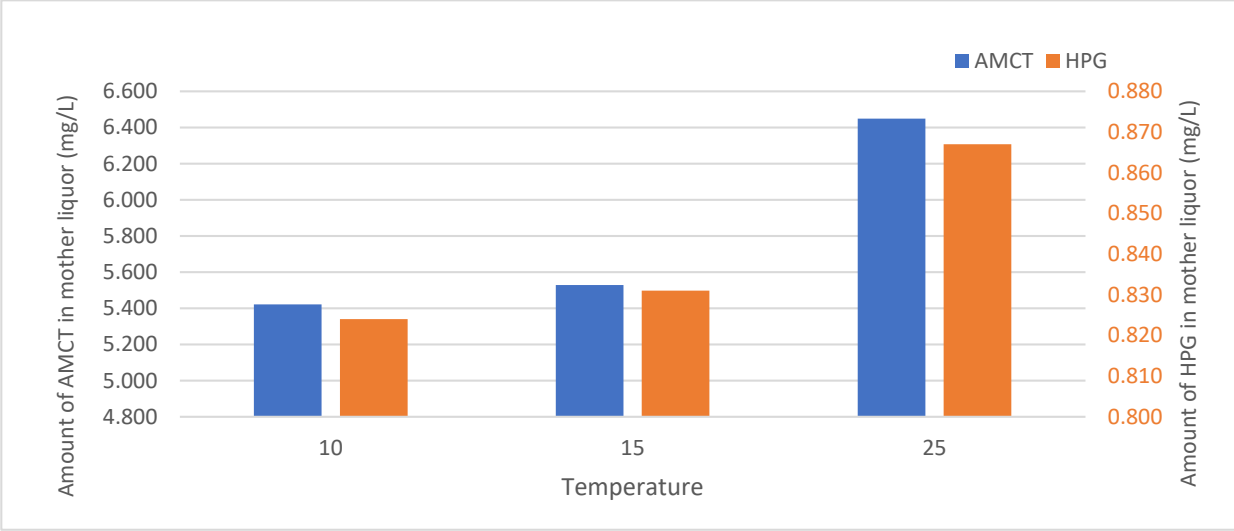


Figure 7: Ana likor icerisinde AMCT miktari

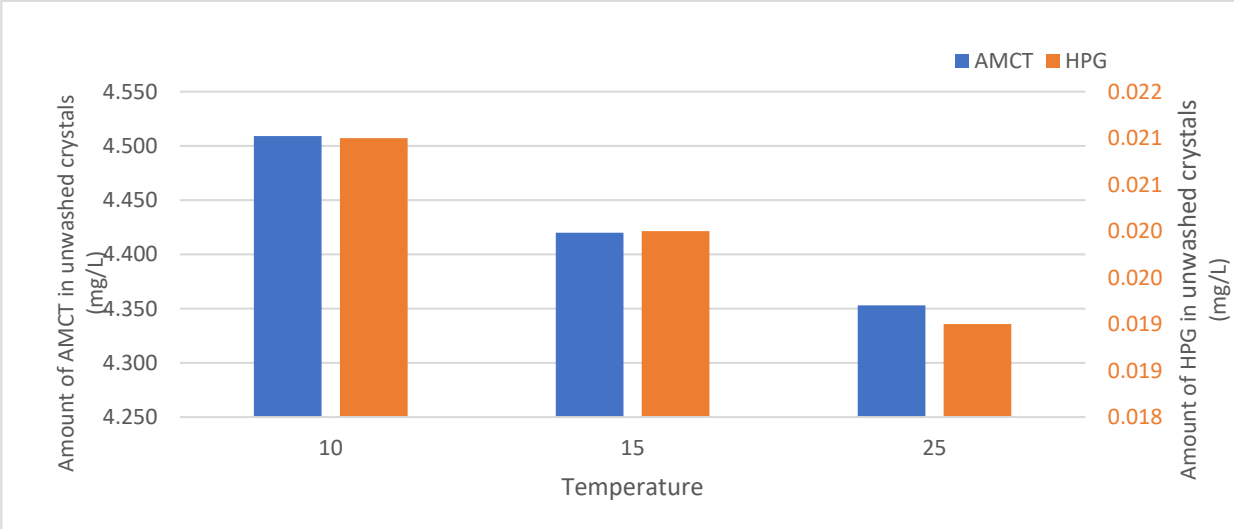


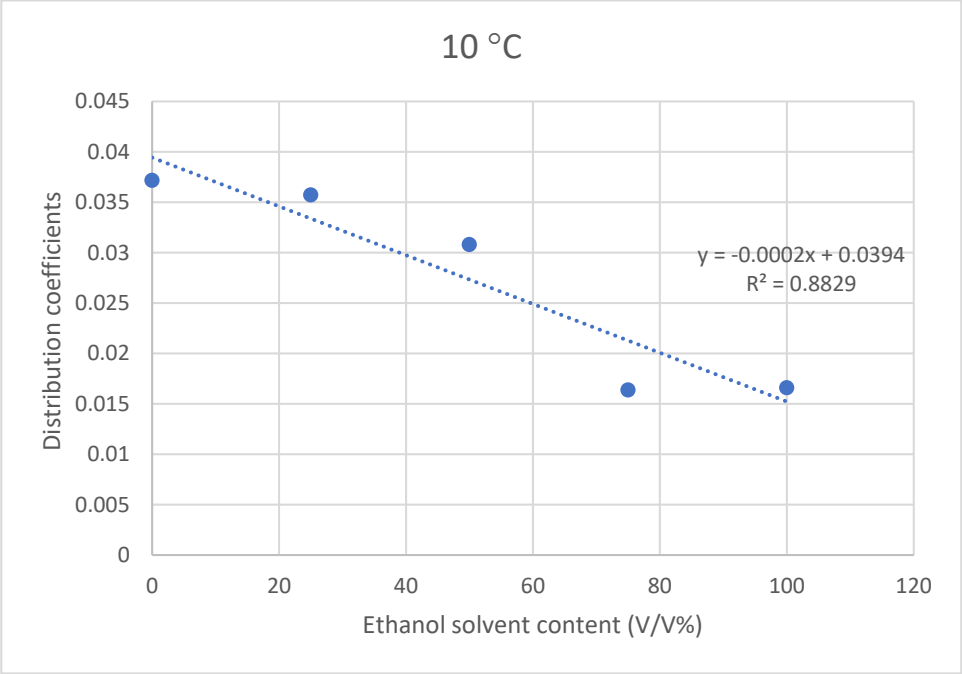
Figure 8: Ana likor icerisinde 4-HPGmiktari

Kirlilikler, kristalin içine küçük bir seviyede dahil edildiğinde, içerme, katı fazdaki konukçu bileşik konsantrasyonuna konsantrasyon olarak tanımlanan, katı fazdaki sıvı fazdaki orana

bölünen bir dağılım katsayısı ile tanımlanabilir. Aşağıdaki denklem dağıtım katsayısını tanımlar 1,3,16.

$$\text{Distribution coeff} = \frac{\left(\frac{C_{imp}}{C_{AMCT}}\right)solid}{\left(\frac{C_{imp}}{C_{AMCT}}\right)liquid} \quad (1)$$

Bu denklemde, C_{imp}, safsızlığın konsantrasyonu ve C_{AMCT}, Amoksisilin trihidratın konsantrasyonudur. C_{AMCT} safsızlıkları için dağılım katsayıları, deneysel olarak elde edilen verilerin denklem 1 uygulanmasi ile hesaplandı. İlk çözeltinin saflığının bir fonksiyonu olarak dağılım katsayısının grafiği, Şekil 7'de gösterilmektedir. Bu bilgi daha sonra kristalleşme işlemini modellemek ve işlem koşullarının saflık üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılmıştır.



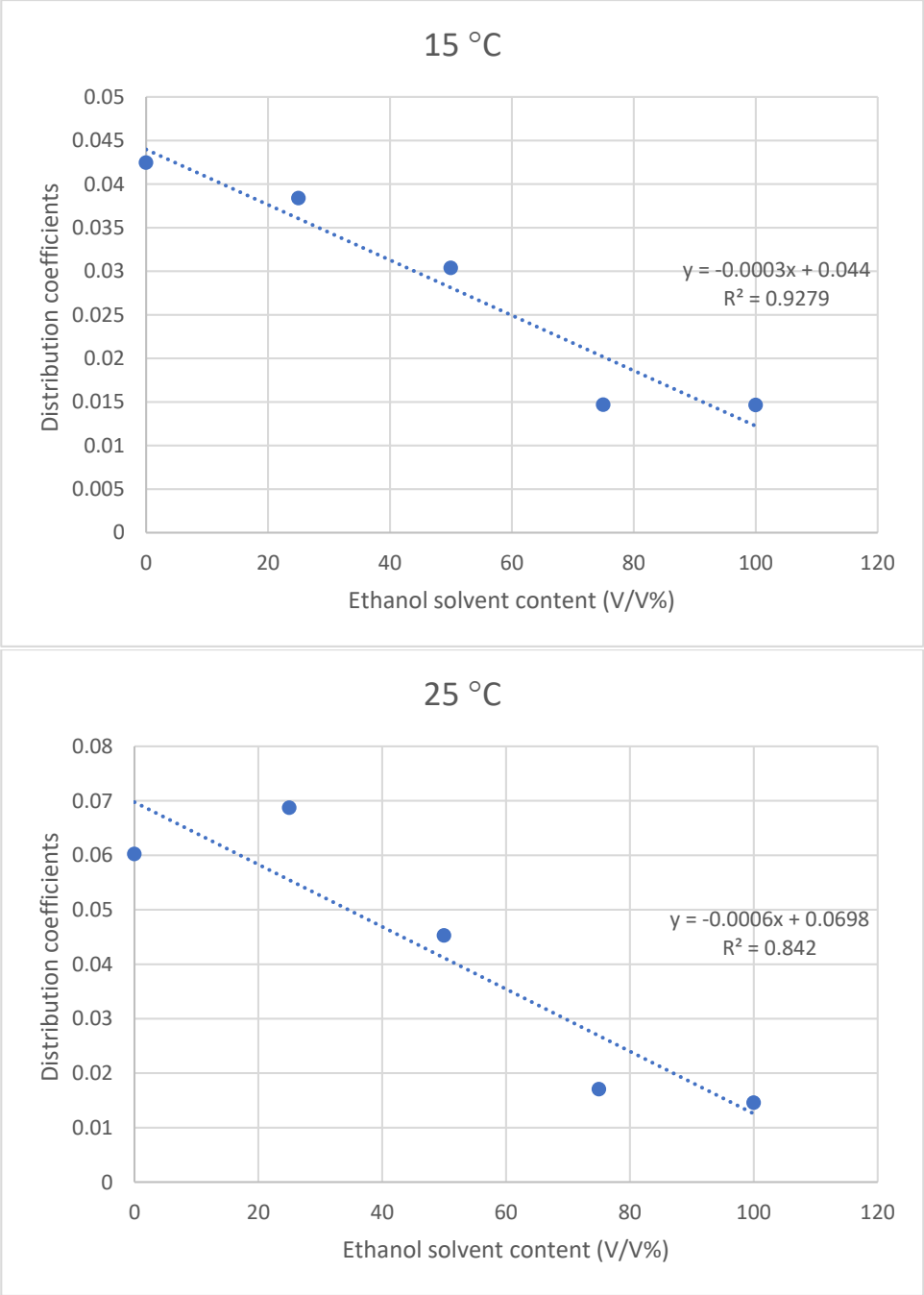
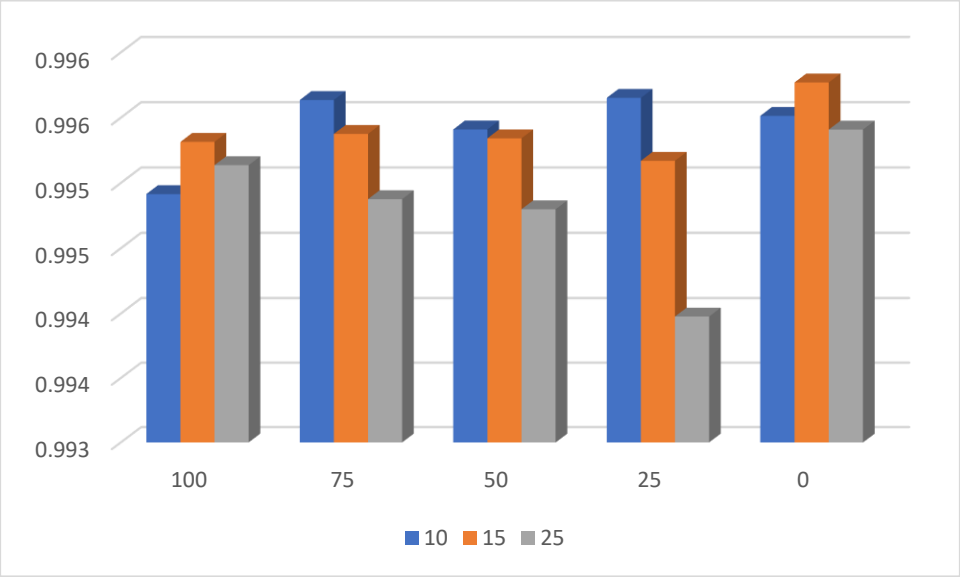


Figure 9: Amoksisilin icin dagilim faktoru

Amoksisillin trihydrat'in safligi, denklem 2 de gosterildigi sekilde malzemenin kati halde kutle kesri olarak hesaplanmistir.

$$\text{Purity}(\%) = \frac{\text{mass of Amoxicillin trihydrate}}{(\text{mass of Amoxicillin trihydrate} + \text{mass of impurity})} \quad (2)$$

AMCT'nin kristalizasyon işleminde calışma koşullarının kristalin saflığı üzerindeki etkisi belirlenmistir. Sıcaklık ve etanol çözücü içeriğinin kristal saflığı üzerindeki etkisi değerlendirilmistir. Her çözücü içeriğinin sıcaklığının, ürün saflığı üzerindeki etkisi, Şekil 9'da görülebilir.



4. Gelecek Calismalar Hakkinda Bilgi

Şu ana kadar ki yapmis oldugumuz calismalar kapsaminda, projenin yaklaşık %50'si tamamlanmistir. Bu calisma ile ilgili olarak 1 adet SCI yuksek etki faktorlu bir dergiye gonderilmek uzere yayina hazirlanmaktadir.

Sonraki asama da, proje kapsaminda gelistirilmekte olan antibiyotiklerin kontinu uretimi calismalari hizla devam etmektedir.

5. REFERANSLAR

1. “Analyse des ventes de médicaments en France en 2013” [Analysis of drug sales in France in 2013]. June 2014: ANSM report.
2. DIVISION, I., SITUATION REPORT ON THE ACTIVE SUBSTANCE AMOXICILLIN. 30/03/2016: ANSM report.
3. Ghassempour, A., et al., Investigation of the solid state properties of amoxicillin trihydrate and the effect of powder pH. AAPS PharmSciTech, 2007. 8(4): p. 91-96.
4. Hsi, K.H.Y., et al., Purification of amoxicillin trihydrate by impurity-coformer complexation in solution. CrystEngComm, 2013. 15(34): p. 6776-6781.
5. Youshko, M.I., et al., Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: A new approach to optimization. Biotechnology and bioengineering, 2002. 78(5): p. 589-593.
6. Giron, D., et al., Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. 2002. 68(2): p. 453-465.
7. Engel, J. and A. Kleemann, Pharmaceutical substances: syntheses, patents, applications. 2003: Thieme.
8. Bruggink, A., Synthesis of β-lactam antibiotics: chemistry, biocatalysis & process integration. 2011: Springer Science & Business Media.
9. Elander, R.J.A.m. and biotechnology, Industrial production of β-lactam antibiotics. 2003. 61(5-6): p. 385-392.
10. Alemzadeh, I., et al., Enzymatic synthesis of amoxicillin with immobilized penicillin G acylase. 2010. 17(1): p. 106.
11. Fine Chemistry: Antibiotics: Investments in India for DSM, in Industrie Pharma. 14.11.2015.
12. JC, GSK invests in Singapore. 13/07/2015, IndustriePharma.
13. Diender, M., et al., Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction. 2000. 27(8): p. 576-582.
14. Ospina, S., et al., Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. 1996. 19(6): p. 462-469.

15. Youshko, M.I., et al., Penicillin acylase-catalyzed ampicillin synthesis using a pH gradient: A new approach to optimization. 2002. 78(5): p. 589-593.
16. van Langen, L.M., et al., Enzymatic synthesis of β-lactam antibiotics using penicillin-G acylase in frozen media. 1999. 456(1): p. 89-92.
17. Pereira, S.C., et al., Enzymatic synthesis of amoxicillin by penicillin G acylase in the presence of ionic liquids. 2012. 14(11): p. 3146-3156.
18. Illanes, A., et al., Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of β-lactam antibiotics in organic medium. 2006. 133(3): p. 189-202.
19. Chow, Y., et al., Modeling and optimization of methanol as a cosolvent in amoxicillin synthesis and its advantage over ethylene glycol. 2007. 12(4): p. 390-398.
20. Kim, M.G. and S.B.J.J.o.M.C.B.E. Lee, Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes. 1996. 1(3-6): p. 181-190.
21. Wei, D.Z. and L. Yang, Effects of ethylene glycol on the synthesis of ampicillin using immobilized penicillin G acylase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2003. 78(4): p. 431-436.
22. Van Broekhoven, A., F. Shapiro, and J. Anné, Novel frontiers in the production of compounds for biomedical use. Vol. 1. 2001: Springer Science & Business Media.
23. Ulijn, R., et al., Enzymatic synthesis of β-lactam antibiotics via direct condensation. 2002. 99(3): p. 215-222.
24. Gonçalves, L.R., R.L. Giordano, and R.C.J.P.B. Giordano, Mathematical modeling of batch and semibatch reactors for the enzymic synthesis of amoxicillin. 2005. 40(1): p. 247-256.
25. Gonçalves, L.R., et al., Enzymatic synthesis of amoxicillin: avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. 2002. 80(6): p. 622-631.
26. GonÇalves, L.R., et al. A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose. in Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 2000. Springer.
27. Gonçalves, L.R., et al., Inhibitory effects in the side reactions occurring during the enzymic synthesis of amoxicillin: p-hydroxyphenylglycine methyl ester and amoxicillin hydrolysis. 2003. 38(1): p. 77-85.

28. Silva, J.A., et al., Use of neural networks in the mathematical modelling of the enzymic synthesis of amoxicillin catalysed by penicillin G acylase immobilized in chitosan. 2008. 24(9): p. 1761-1767.
29. Chow, Y., et al., Influence of 6-aminopenicillanic acid on amoxicillin synthesis and p-hydroxyphenylglycine methyl ester hydrolysis. 2005. 23(5): p. 347-351.
30. XXXVI, U.P. and N.J.R. XXXI, Md, US Pharmacopeial convention. 2013: p. 1579-1580.
31. Feng, S., N. Shan, and K.J. Carpenter, Crystallization of amoxicillin trihydrate in the presence of degradation products. Organic process research & development, 2006. 10(6): p. 1212-1218.
32. Fong, G.W.K., et al., Determination of degradation products and impurities of amoxicillin capsules using ternary gradient elution high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1984. 298: p. 459-472.

Aras. Gor. Dr. Mustafa Fatih ERGIN