



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

Sintesi di impurezze per strategie di controllo regolatorio nella
produzione di Cefovecin e studio di fattibilità di una reazione di
idrogenazione in flusso

Relatore: Prof.ssa Daniela Rossi

Correlatore: Dott. Michele Benotti



Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Marika Borriello

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

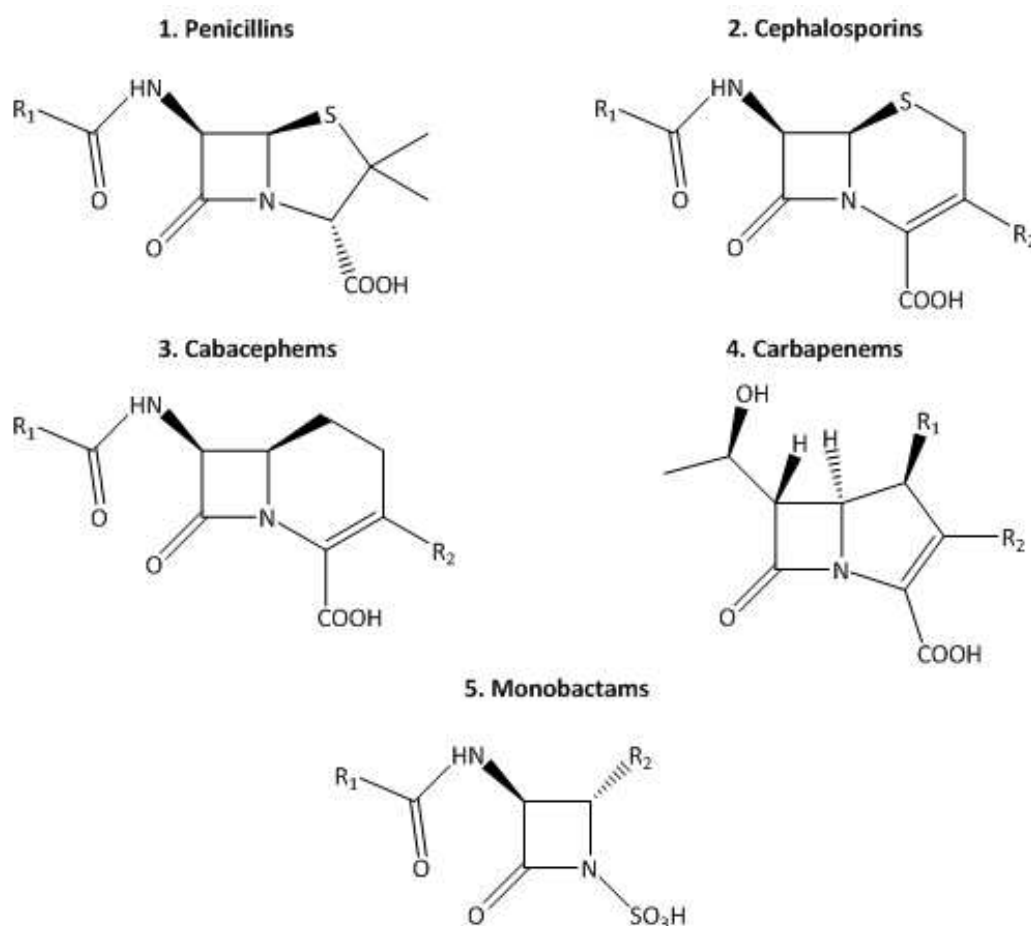
Abstract	III
1. Introduzione	1
1.1 Gli antibiotici β -lattamici	1
1.1.1 Scoperta degli antibiotici β -lattamici.....	3
1.1.2 Resistenza antibiotica	5
1.2 Le Cefalosporine	6
1.3 Aspetti regolatori legati alla produzione di β -lattamici.....	10
1.3.1 Autorizzazione alla produzione	11
1.3.2 Autorizzazione all'immissione in commercio	12
1.4 Le impurezze	13
1.5 Vie di sintesi sostenibili per ridurre l'impatto ambientale dell'industria farmaceutica	15
1.5.1 Green Chemistry	15
1.5.2 La Flow Chemistry applicata all'industria farmaceutica.....	15
2. Presupposti scientifici e scopo della tesi.....	19
2.1 Il Cefovecin	19
2.1.1 Le impurezze del Cefovecin	20
2.2 Idrogenazione in flow.....	22
2.3 Scopo della tesi.....	23
3. Discussione dei risultati	25
3.1 Sintesi isomero Δ^3 del 7-AMT	25
3.2 Sintesi dell'epimero in posizione 7 del 7-AMT	26
3.2.1 Reazione con TMCS, TEA e PPh ₃	28
3.2.2 Reazione con LDA	34
3.2.3 Reazione con catalizzatore di Shvo	35
3.2.4 Aumento della T nello step di formazione dell'imminocloruro	38

3.3 Sintesi dell'isomero <i>E</i> dell'ossima del Cefovecin.....	39
3.4 Design of Experiments (DoE)	43
3.5 Applicazione del DoE alla reazione di idrogenazione in flow	44
4. Conclusioni	56
5. Parte sperimentale	58
5.1 Materiali e strumenti	58
5.2 Preparazione composto 3	59
5.3 Preparazione composto 6 con PPh ₃ , TEA e TMCS.....	60
5.4 Preparazione composto 6 con LDA.....	61
5.5 Preparazione composto 7 con catalizzatore di Shvo	62
5.6 Preparazione composto 7 aumentando la T nello step di formazione dell'imminocloruro.....	62
5.7 Preparazione composto 10	63
5.8 Preparazione composto 12	64
6. Bibliografia	65

Abstract

β -lactam antibiotics are one of the most important classes of drugs for the treatment of bacterial infections. The first β -lactam antibiotic to be discovered and subsequently marketed was penicillin G in 1928 by the English scientist Alexander Fleming. Subsequently, several other β -lactam antibiotics were introduced into the therapeutic panorama, thus revolutionizing the treatment of infections. Despite the discovery and synthesis of new β -lactam antibiotics, the phenomenon of bacterial resistance has limited the efficacy of these molecules, leading, in some cases, to the failure of pharmacological therapies.

In general, β -lactam antibiotics are broad-spectrum antimicrobial agents and are divided into five subcategories, all characterized by the presence of a β -lactam ring, bearing a secondary amino group (RNH-), with the exception of carbapenems, which have a hydroxyethyl substituent (*Scheme 1*).



Scheme 1: General structure of β -lactams antibiotics

Among β -lactam antibiotics, cephalosporins are molecules characterized by the presence of a dihydrothiazine ring condensed to a β -lactam ring. They are classified into five different generations, depending on the substituents in R1 and R2, which confer different activity and spectrum of action (*Scheme 1*).

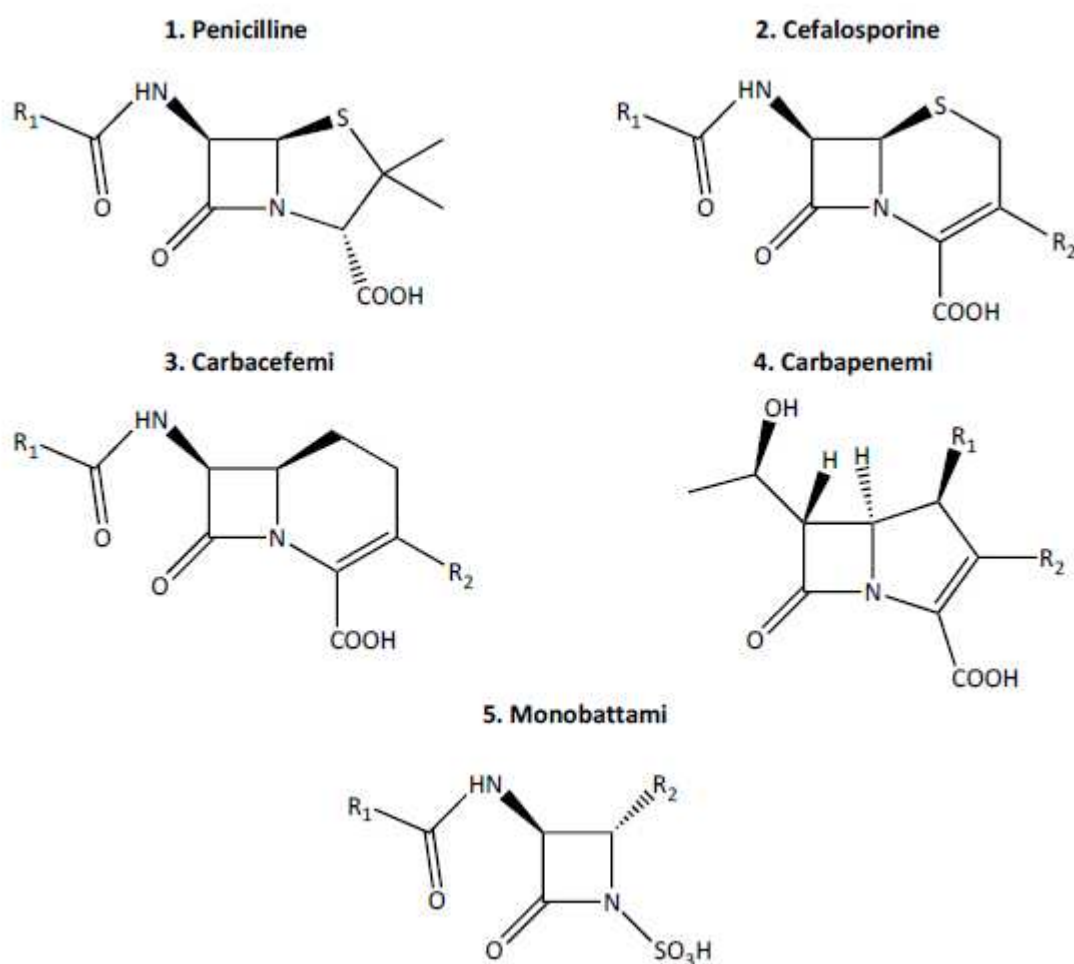
ACS DobFar S.p.A. is an Italian generic pharmaceutical and contract manufacturing company specializing in the production of β -lactam antibiotics for both human and veterinary use. Cefovecin, a third-generation cephalosporin authorized for the treatment of skin infections caused by *Pasteurella multocida* in cats and *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs, represents one of the manufacturing activities.

The synthesis and characterization of some impurities of Cefovecin for regulatory purposes were the aim of this thesis. In detail, the identification and chemical characterization of impurities in a final product or in intermediate reaction represent essential steps in the development process of a drug. Regulatory agencies require for each impurity, deriving from both degradation processes and/or secondary reactions, a complete characterization and a quantitatively and qualitatively evaluation of their presence and/or absence to guarantee the quality, safety and efficacy of the final product. Furthermore, knowing the chemical structure of an impurity is essential to understand its formation mechanisms and consequently improve the chemical synthesis processes to reduce and/or eliminate their presence.

A feasibility study of a hydrogenation reaction, using a flow reactor, H-Cube[®] Mini Plus (ThalesNano), was another activity performed during my thesis period at ACS Dobfar. The Design of Experiments (DoE) was adopted to identify the optimal reaction conditions based on the knowledge of the stability and the synthesis process of the molecule of interest. Compared to the traditional “one-at-a-time” approach, in which all the factors are kept constant and one at a time is changed trying to understand how the response varies, the DoE allows the variation of multiple factors at the same time. In fact, the DoE is a statistical, multivariate analysis that allows us to understand the relevance of the different factors on the response, saving time, money and energy.

Riassunto

Gli antibiotici β -lattamici sono una delle classi di farmaci più rilevante per il trattamento di malattie associate ad infezioni batteriche. Il primo antibiotico β -lattamico ad essere scoperto e successivamente commercializzato è stata la penicillina G nel 1928 dallo scienziato inglese Alexander Fleming. Conseguentemente diversi altri antibiotici β -lattamici sono stati introdotti nel panorama terapeutico, rivoluzionando così il trattamento delle infezioni. Tuttavia, parallelamente alla scoperta e sintesi di nuovi antibiotici β -lattamici, il fenomeno della resistenza batterica ha iniziato a compromettere l'efficacia stessa di queste molecole causando, in alcuni casi, il fallimento delle terapie farmacologiche. In generale, gli antibiotici β -lattamici sono degli agenti antimicrobici ad ampio spettro e vengono suddivisi in cinque sottocategorie, tutte caratterizzate dalla presenza di un anello β -lattamico, recante un gruppo amminico secondario (RNH-), ad eccezione dei carbapenemi, che possiedono un sostituito idrossietilico (*Schema 1*).



Schema 1: Formule di struttura delle diverse classi di antibiotici β -lattamici

Tra gli antibiotici β -lattamici, le Cefalosporine sono molecole caratterizzate dalla presenza di un anello diidrotiazinico condensato ad un anello β -lattamico; ad oggi sono classificate in cinque diverse

generazioni, in funzione dei sostituenti in R1 e R2, che conferiscono attività e spettro d'azione differenti (*Schema 1*).

ACS DobFar S.p.A. è un'azienda italiana genericista e terzista specializzata nella produzione di antibiotici β -lattamici sia per uso umano che veterinario. Tra le varie attività di produzione vi è quella riguardante il Cefovecin, una cefalosporina di terza generazione autorizzata per il trattamento di infezioni cutanee causata da *Pasteurella multocida* nei gatti e da *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus canis* nei cani.

La sintesi e la caratterizzazione di alcune impurezze del Cefovecin per scopi regolatori hanno rappresentato l'obiettivo di questo elaborato di tesi. Nel dettaglio, l'identificazione e caratterizzazione chimica delle impurezze in un prodotto finale o in un intermedio di reazione rappresentano degli step essenziali nel processo di sviluppo di un farmaco. Gli enti regolatori richiedono che per ciascuna impurezza, derivante sia da processi degradativi e/o da reazioni secondarie, di effettuare una caratterizzazione completa e di dimostrare quantitativamente e qualitativamente la presenza e/o assenza di esse al fine di garantire qualità, sicurezza ed efficacia del prodotto finale. Inoltre, conoscere la struttura chimica di un'impurezza è essenziale per comprenderne i meccanismi di formazione e di conseguenza migliorare i processi chimici di sintesi per ridurre e/o eliminare la loro presenza.

Un'altra attività svolta durante il mio periodo di tesi in ACS Dobfar, parallelamente alla sintesi e caratterizzazione delle impurezze del Cefovecin, ha previsto uno studio di fattibilità di una reazione di idrogenazione, mediante l'impiego di un reattore per chimica in flusso, H-Cube[®] Mini Plus (ThalesNano). Questo tipo di studio ha richiesto l'applicazione del *Design of Experiments* (DoE) al fine di individuare le condizioni di reazione ottimali sulla base della conoscenza della stabilità e del processo di sintesi della molecola di interesse. Rispetto all'approccio tradizionale “*one-at-a-time*”, in cui tutti i fattori vengono tenuti costanti e se ne modifica uno per volta cercando di capire come varia la risposta, il DoE permette la variazione di più fattori contemporaneamente. Di fatto il DoE è un'analisi statistica, multivariata che permette di comprendere la rilevanza dei diversi fattori sulla risposta, garantendo un risparmio economico, di tempo ed energie.

1. Introduzione

1.1 Gli antibiotici β -lattamici

Gli antibiotici rappresentano una delle scoperte più importanti della medicina moderna, fondamentali per il trattamento delle infezioni batteriche. La loro efficacia deriva dalla capacità di interferire con le funzioni vitali dei batteri o con i loro processi di crescita, impedendone la loro proliferazione o causando la loro morte. Il raggiungimento di tali scopi può avvenire attraverso cinque principali meccanismi d'azione¹:

- inibizione della sintesi della parete cellulare
- compromissione della membrana citoplasmatica
- inibizione della sintesi dell'acido nucleico
- inibizione della sintesi proteica
- azione antagonista metabolica

Generalmente gli antibiotici vengono classificati in base al loro meccanismo d'azione, ma è possibile classificarli anche in base alla loro struttura chimica o al loro spettro d'azione; le principali classi includono glicopeptidi, β -lattamici, macrolidi, tetraciline, amminoglicosidi e chinoloni.

Gli antibiotici β -lattamici rappresentano oltre la metà delle vendite di antimicrobici², promuovendosi come la classe di antibatterici più utilizzata per il trattamento delle infezioni grazie al loro ampio spettro d'azione e alla loro comprovata sicurezza nel tempo. Essi vengono suddivisi in cinque sottoclassi tutti caratterizzati dalla presenza di un anello β -lattamico, struttura generale fig. 1.1, recante un gruppo amminico secondario (RNH-), ad eccezione dei carbapenemi, che possiedono un sostituito idrossietilico (Fig. 1.2).

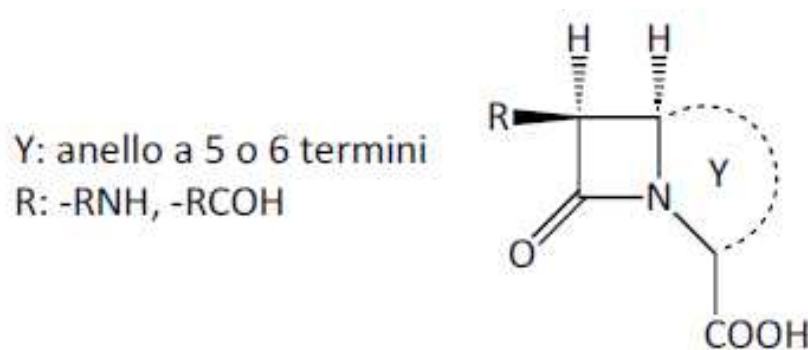


Fig. 1.1: Struttura generale antibiotici β -lattamici

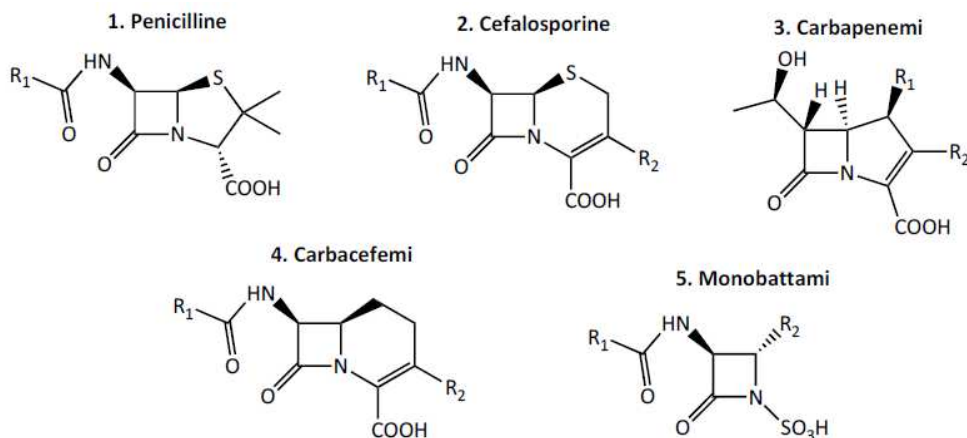


Fig. 1.2: Formule di struttura dei antibiotici β -lattamici

Gli antibiotici β -lattamici esercitano la loro azione inibendo la biosintesi del peptidoglicano interferendo con l'attività dell'enzima transpeptidasi. Questo enzima appartiene alla famiglia delle PBP (*Penicillin Binding Proteins*), proteine coinvolte nella formazione dei legami crociati del peptidoglicano, l'elemento essenziale per la stabilità strutturale della parete cellulare dei batteri. Il peptidoglicano è un eteropolimero ramificato costituito da catene alternate di amminozuccheri, N-acetilglucosammina (NAG) e N-acetilmuramico (NAM):

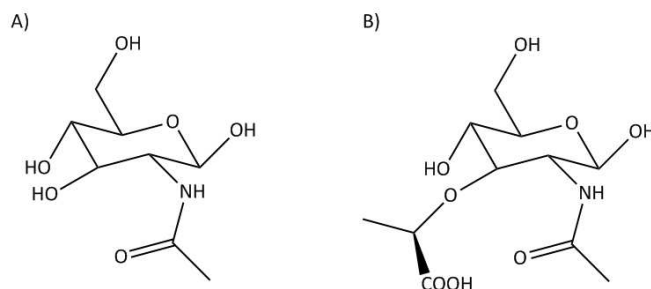


Fig. 1.3: Formule di struttura di A) N-acetilglucosammina e B) acido N-acetilmuramico

Collegate a quest'ultimo, all'estremità di ogni singolo filamento, vi è poi un peptide formato da cinque amminoacidi, che termina con il dipeptide D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala)³.

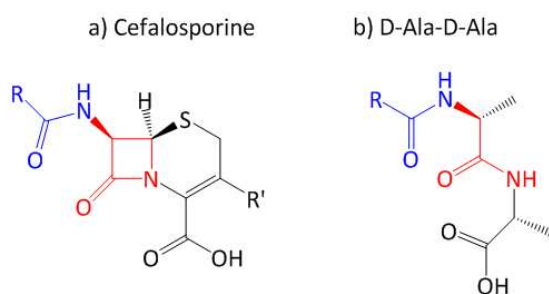


Fig. 1.4: Analogie strutturali tra Cefalosporine e D-alanil-D-alanina

Gli antibiotici β -lattamici, strutturalmente simili al dipeptide D-Ala-D-Ala (Fig. 1.4), presentano una forte affinità per il sito attivo della transpeptidasi, in particolare per il residuo Ser403. Legandosi in modo irreversibile, questi antibiotici bloccano l'attività dell'enzima, impedendo la sintesi del peptidoglicano e compromettendo la formazione della parete cellulare⁴. L'azione inibitoria dei β -lattamici si basa sull'attacco nucleofilo del residuo serinico dell'enzima al carbonio ammidico dell'anello β -lattamico, provocandone l'apertura e la conseguente inibizione irreversibile dell'enzima (Fig. 1.5). Questo blocco enzimatico impedisce la sintesi della parete cellulare, causando la morte del batterio per lisi cellulare⁵.

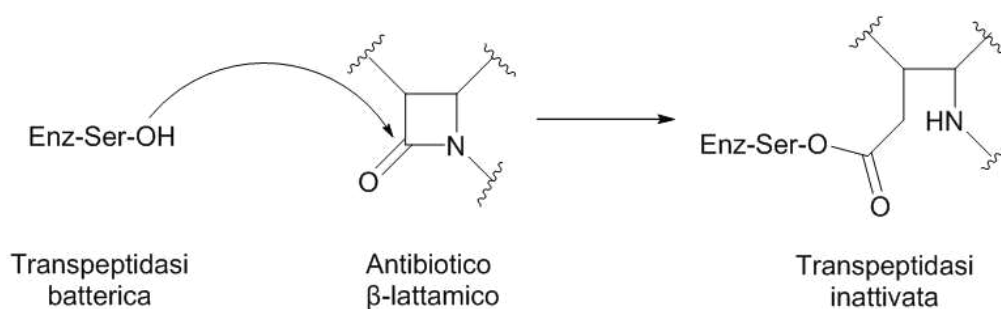


Fig. 1.5: Meccanismo d'azione antibiotici β -lattamici

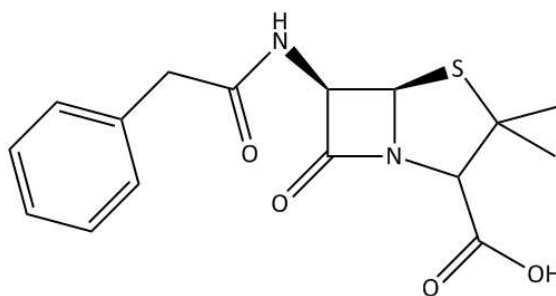
1.1.1 Scoperta degli antibiotici β -lattamici

Sebbene il ruolo di Alexander Fleming nella scoperta della penicillina sia universalmente riconosciuto, pochi sanno che già nel 1895 Vincenzo Tiberio, medico e ricercatore della Marina Militare Italiana, aveva osservato l'azione battericida di alcune muffe, anticipando di oltre trent'anni le ricerche di Fleming.^{6,7}

Lo scienziato Alexander Fleming, durante uno studio condotto su *Staphylococcus aureus*, notò casualmente che uno dei terreni di coltura batterica era stato contaminato da colonie fungine che avevano inibito la crescita degli stafilococchi; dedusse che questa muffa, denominata *Penicillium notatum*, producesse una sostanza con attività battericida.⁸ Tuttavia, la penicillina iniziò a essere rilevante in ambito terapeutico solo alla fine degli anni '30, quando Ernst Chain e Howard Florey portarono alla purificazione della penicillina e alla comprensione del suo meccanismo d'azione.⁹ Un contributo essenziale arrivò anche da Mary Hunt, microbiologa statunitense, che scoprì il *Penicillium chrysogenum*, una muffa in grado di produrre il principio attivo in quantità superiori rispetto al *Penicillium notatum*.⁷ Inoltre, gli studi di cristallografia a raggi X condotti da

Dorothy Hodgkin permisero di determinare la struttura della penicillina nel 1945, lavoro che le valse il premio Nobel per la chimica nel 1964.

La penicillina G si distinse per la sua produzione relativamente economica e per la sua elevata efficacia contro i batteri Gram-positivi, pur risultando meno efficace contro i patogeni Gram-negativi (*Fig. 1.6*).



Penicillina G

Fig. 1.6: Struttura della penicillina G

L'impiego medico della penicillina fu inizialmente riservato all'ambito militare, per poi essere esteso alla popolazione generale. Prima della sua introduzione, le infezioni rappresentavano una delle principali cause di morte: malattie come tifo, polmoniti, meningiti, setticemie e infezioni intestinali gravi spesso portavano al decesso in tempi brevi. La necessità di combattere queste patologie incentivò la ricerca in questo ambito, portando alla scoperta di numerosi altri antibiotici.

Negli anni '50, il medico italiano Giuseppe Brotzu fece una scoperta rivoluzionaria identificando un ceppo del fungo *Cephalosporium acremonium*, isolato dall'acqua marina vicino a uno sbocco fognario, in grado di produrre una sostanza con proprietà antibatteriche efficaci contro i batteri Gram-negativi resistenti alla penicillina.¹⁰ Le ricerche successive di Edward Abraham e Guy Newton portarono all'individuazione di due composti fondamentali: la penicillina N, che contribuì allo sviluppo di penicilline ad ampio spettro, e la cefalosporina C, dotata di una resistenza naturale alle β -lattamasi batteriche.^{11,12} Quest'ultima rappresentò un punto di svolta, dando origine alla classe delle cefalosporine, caratterizzate da un'azione più estesa e da una maggiore resistenza alla degradazione enzimatica (*Fig. 1.7*).

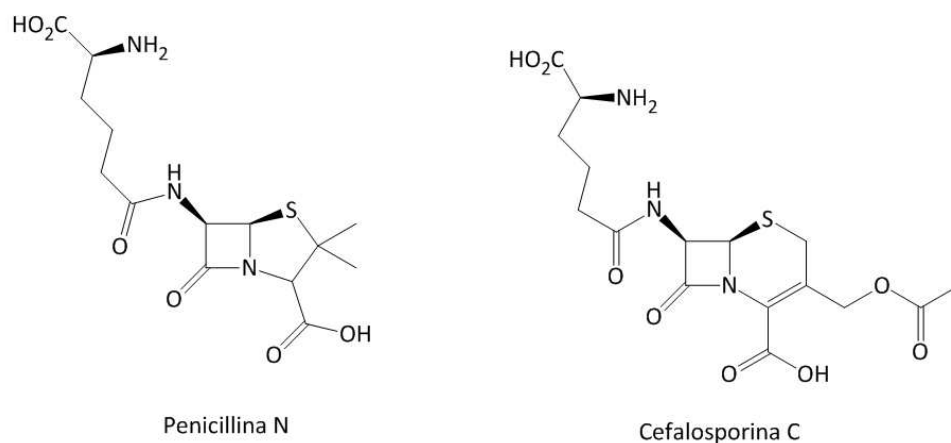


Fig. 1.7: Formule di struttura della penicillina N e della cefalosporina C

1.1.2 Resistenza antibiotica

Il massiccio impiego degli antibiotici ha favorito, nel tempo, lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza, ad oggi una delle sfide più ardue della medicina moderna. Questo fenomeno, noto con l'acronimo inglese AMR (*AntiMicrobial Resistance*), si riferisce alla capacità di un batterio di resistere all'azione di uno o più antibiotici, riuscendo a sopravvivere e proliferare nonostante la presenza di concentrazioni dell'agente antibatterico generalmente sufficienti a inibire o eliminare microrganismi della stessa specie.¹³ La resistenza agli antibiotici è un fenomeno naturale nei batteri, ma il suo sviluppo è notevolmente accelerato dall'uso inappropriato o eccessivo di antimicrobici in ambito medico e veterinario. Fattori come scarse condizioni igieniche, pratiche inadeguate negli ambienti sanitari e nella catena alimentare favoriscono inoltre la diffusione di microrganismi resistenti.

Queste pratiche comportano un elevato rischio di fallimento terapeutico, rendendo necessaria la prescrizione di antibiotici alternativi per contrastare l'infezione. Tuttavia, l'esposizione ripetuta del microbiota a tali farmaci contribuisce ulteriormente allo sviluppo dell'antibiotico-resistenza. Con il tempo, questo processo riduce progressivamente l'efficacia degli antimicrobici, fino a renderli, in alcuni casi, del tutto inefficaci.¹⁴ Diversi sono i meccanismi di resistenza messi in atto dai batteri, i principali sono:

- ridotta permeabilità cellulare
- inattivazione enzimatica
- modificazioni del bersaglio antibiotico
- aumento dell'attività delle pompe di efflusso¹⁵

I batteri sviluppano generalmente resistenza alle penicilline, ai carbapenemi e alle cefalosporine principalmente attraverso la produzione di β -lattamasi, enzimi in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico¹⁵, come illustrato nella figura 1.8.

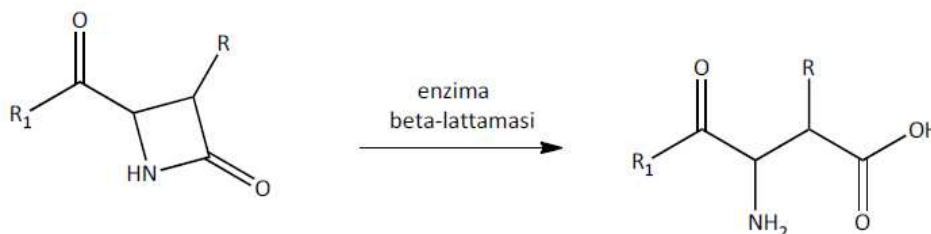


Fig. 1.8: Reazione di idrolisi dell'anello β -lattamico dovuta a β -lattamasi

Gli enzimi β -lattamasi vengono classificati in diversi modi; una suddivisione, quella proposta da Ambler, distingue questi enzimi idrolitici in quattro classi (A, B, C e D) in base alla sequenza primaria degli amminoacidi che compongono le proteine e al loro meccanismo catalitico. In generale le β -lattamasi delle classi A, C e D svolgono la loro funzione idrolitica sfruttando un residuo di serina nel sito attivo, mentre quelle di classe B necessitano di cationi metallici bivalenti (Zn^{2+}) per catalizzare l'idrolisi dei β -lattamici¹⁶.

1.2 Le Cefalosporine

Le cefalosporine rappresentano una delle classi più importanti di antibiotici β -lattamici e sono ampiamente utilizzate in ambito clinico per il trattamento delle infezioni batteriche. La loro efficacia deriva dall'ampio spettro d'azione, che copre sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi, e dalla loro naturale resistenza alle β -lattamasi, rendendole una scelta terapeutica versatile e affidabile.¹⁵

Dal punto di vista strutturale, queste molecole presentano un nucleo biciclico costituito da un anello β -lattamico legato a un anello diidrotiazinico a sei membri, una configurazione che garantisce una maggiore stabilità chimica rispetto alle penicilline e una maggiore resistenza all'azione delle β -lattamasi batteriche (*Fig. 1.9*). Inoltre, la presenza di due siti di funzionalizzazione nel nucleo centrale, situati nelle posizioni C-3' e C-7', consente l'introduzione di diverse catene laterali, facilitando lo sviluppo di nuovi principi attivi con proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche in continuo miglioramento¹⁷.

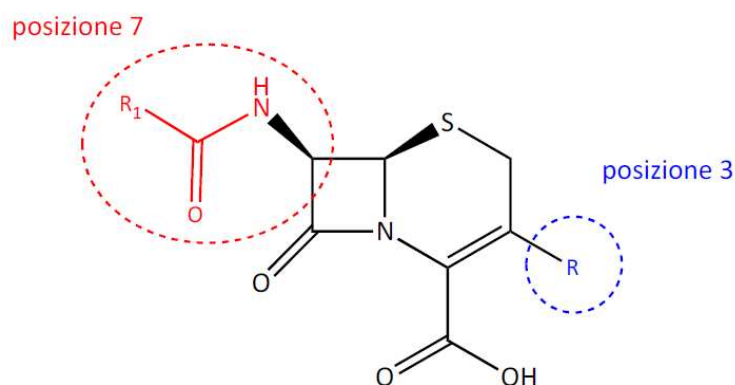


Fig. 1.9: Struttura generica di una cefalosporina

Le cefalosporine vengono suddivise in cinque generazioni; tale classificazione riflette sia la sequenza temporale del loro sviluppo sia il progressivo ampliamento dello spettro antibatterico e della resistenza ai meccanismi di difesa dei batteri. Ciò evidenzia l'evoluzione costante di questi antibiotici, finalizzata a contrastare la crescente resistenza batterica e a favorire la progettazione di molecole sempre più efficaci e mirate.

Le cefalosporine di prima generazione, sviluppate tra gli anni '60 e '70, hanno rappresentato il punto di partenza nell'evoluzione di questa classe di antibiotici. Tra le prime molecole sintetizzate si trova la cefazolina, formulata per uso orale, e la cefalexina, somministrata per via parenterale (Fig. 1.10).

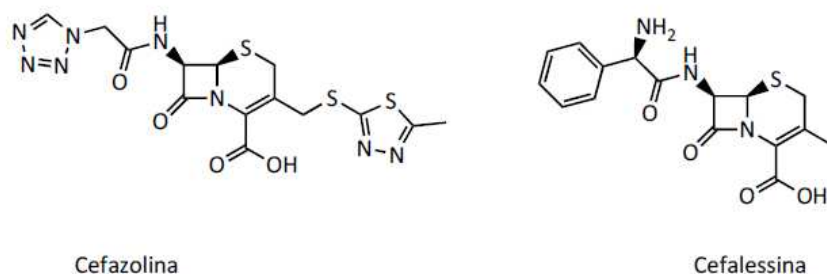


Fig. 1.10: Formule di struttura Cefazolina e Cefalexina

Questi farmaci sono noti per la loro elevata efficacia contro batteri Gram-positivi, come *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibile (MSSA) e diversi streptococchi. Grazie a queste proprietà, sono ampiamente impiegate nel trattamento di infezioni cutanee e dei tessuti molli, faringiti e infezioni urinarie non complicate¹⁸.

Sebbene mostrino una certa attività contro alcuni batteri Gram-negativi, il loro spettro d'azione risulta limitato in quanto sensibili alle β -lattamasi prodotte da questi microrganismi. Inoltre, non sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, rendendole inadatte per il trattamento delle infezioni del sistema nervoso centrale.

Nonostante queste limitazioni, le cefalosporine di prima generazione restano una scelta terapeutica consolidata per le infezioni non complicate e per la profilassi chirurgica, grazie alla loro ottima tollerabilità e comprovata efficacia clinica¹⁹.

L'introduzione delle cefalosporine di seconda generazione negli anni '70, tra cui cefuroxima e cefaclor, ha ampliato significativamente lo spettro d'azione di questa classe di antibiotici (Fig. 1.11).

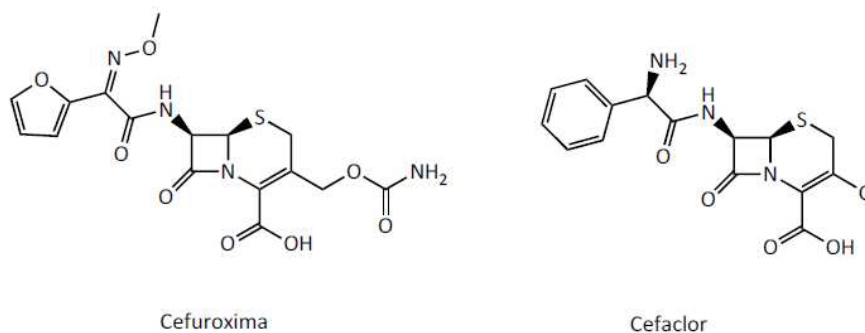


Fig. 1.11: Formule di struttura Cefuroxima e Cefaclor

Rispetto alle cefalosporine di prima generazione, queste molecole presentano una maggiore efficacia contro i batteri Gram-negativi, mantenendo un'attività contro diversi batteri Gram-positivi, tra cui *Streptococcus pneumoniae* e MSSA.

Oltre ad un migliore spettro d'azione, le cefalosporine di seconda generazione offrono importanti vantaggi terapeutici, tra cui una maggiore resistenza alle β -lattamasi e una maggiore varietà di vie di somministrazione. Inoltre, la loro emivita più lunga e la necessità di dosaggi meno frequenti hanno contribuito a migliorare l'aderenza alla terapia e l'uso clinico²⁰.

Le cefalosporine di terza generazione, come ceftriaxone e cefotaxime (Fig. 1.12), hanno segnato un avanzamento significativo nella terapia antibiotica, offrendo un'elevata efficacia contro batteri Gram-negativi di difficile trattamento, risultando particolarmente utili nei contesti ospedalieri²¹.

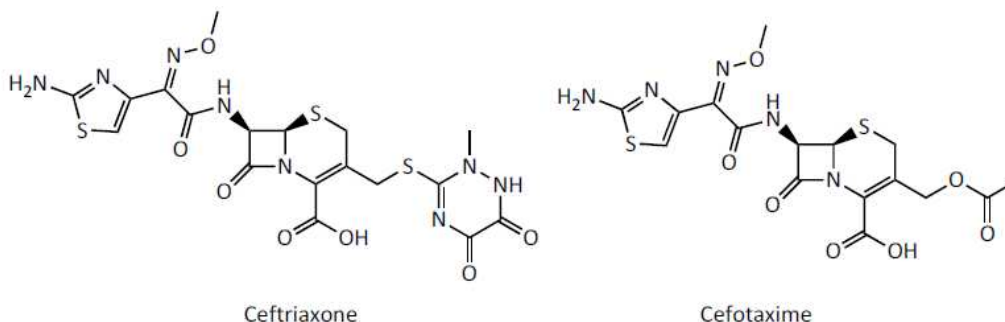
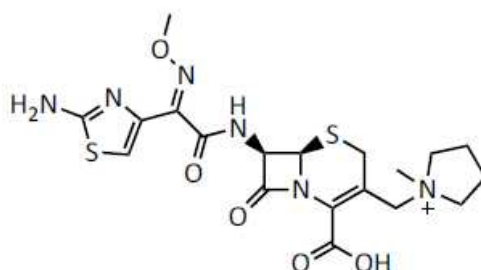


Fig. 1.12: Formule di struttura Ceftriaxone e Cefotaxime

Una delle caratteristiche distintive di questa generazione è la maggiore stabilità nei confronti delle β -lattamasi, resa possibile dalla presenza di una catena laterale (amminotiazoil)ossiimino acetamido in posizione C-7'. Un ulteriore vantaggio delle cefalosporine di terza generazione è la loro capacità di attraversare la barriera ematoencefalica, rendendole essenziali per il trattamento di infezioni del sistema nervoso centrale, come la meningite batterica.^{22,23}

Tuttavia, la diffusione crescente di ceppi resistenti, in particolare quelli produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), ha compromesso l'efficacia di alcune cefalosporine di terza generazione. Per contrastare questo problema, sono state sviluppate formulazioni terapeutiche innovative ottenute dalla combinazione di queste cefalosporine con inibitori delle β -lattamasi, è il caso della ceftazidime con l'avibactam.

Le cefalosporine di quarta generazione, come il cefepime (Fig. 1.13), hanno permesso di ottenere miglioramenti significativi nella capacità di penetrare la membrana batterica e in una maggiore resistenza alle β -lattamasi²⁴.



Cefepime

Fig. 1.13: Formule di struttura Cefepime

Ciò è dovuto alla loro struttura modificata che include una carica positiva in posizione C-3', che favorisce il passaggio attraverso le membrane esterne dei batteri Gram-negativi. Inoltre, queste cefalosporine hanno una minore affinità per le β -lattamasi, riducendo il rischio di inattivazione enzimatica. Esse inoltre continuano a essere altamente efficaci contro i batteri Gram-positivi, come *Streptococcus pneumoniae* e MSSA, rendendole ideali per la gestione delle infezioni in ambito ospedaliero²⁵.

Le cefalosporine di quinta generazione, come il ceftolozane (Fig. 1.14) sono progettate per legarsi con elevata affinità alle varianti mutate delle PBP, un altro meccanismo di resistenza batterica, presente nei ceppi di MSSA. Nella loro struttura è presente una catena laterale idrofobica in posizione C-3' che termina con un gruppo basico; questo sostituyente permette di eludere i meccanismi di resistenza.^{26,27} Tuttavia, è fondamentale

monitorare attentamente l'uso di queste molecole per prevenire l'insorgenza di ulteriori meccanismi di resistenza, garantendo così la loro efficacia nella pratica clinica.

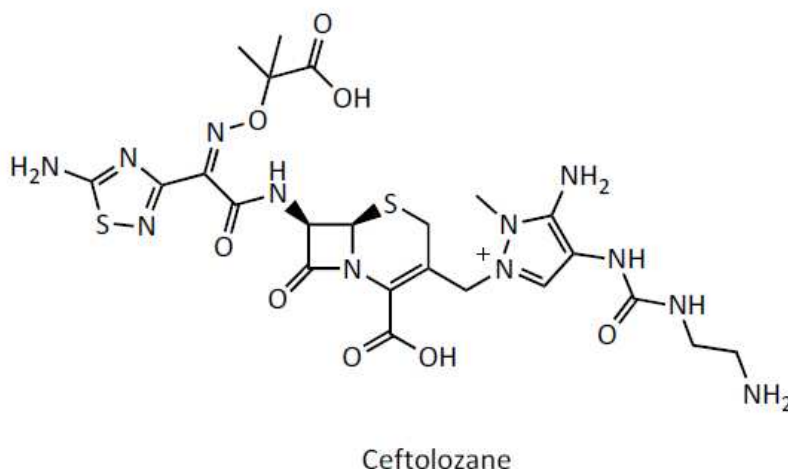


Fig. 1.14: Formula di struttura del Ceftolozane

1.3 Aspetti regolatori legati alla produzione di β -lattamici

L'*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) è un'iniziativa nata nel 1990 come collaborazione tra autorità regolatorie e industria farmaceutica. Il suo obiettivo è migliorare l'efficienza dei processi di sviluppo e registrazione di nuovi farmaci in Europa, Giappone e Stati Uniti attraverso l'armonizzazione delle normative. L'ICH mira a rendere i nuovi medicinali accessibili ai pazienti nel minor tempo possibile, evitando la ripetizione di studi clinici sull'animale e sull'uomo. I suoi risultati si concretizzano in un insieme di linee guida suddivise in quattro categorie principali:

- Qualità: ossia linee guida per la produzione e il controllo dei farmaci;
- Sicurezza: ossia linee guida per la valutazione del rischio e degli effetti collaterali;
- Efficacia: ossia criteri per la progettazione e l'analisi degli studi clinici;
- Multidisciplinari: ossia documenti trasversali, tra cui il dizionario di terminologia medica *MedDRA*.

Grazie a queste linee guida, l'ICH contribuisce a garantire che i medicinali siano sviluppati in modo sicuro, efficace e uniforme a livello globale.

Per quanto riguarda gli antibiotici β -lattamici accanto alla loro comprovata efficacia, essi rappresentano il 42,6% di tutte le anafilassi gravi indotte da farmaci²⁸, costituendo uno degli effetti collaterali più comuni e rilevanti di questa classe di farmaci.

In questo contesto particolarmente rilevante è il rischio di *cross* reattività clinica tra penicilline e cefalosporine ²⁹. Ciò ha reso necessario da parte delle agenzie regolatorie, tra cui l’FDA (*Food and Drug Administration*) negli Stati Uniti e l’AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) in Italia, di stabilire delle linee guida rigide per la produzione degli antibiotici β -lattamici. In particolare si raccomanda, che ogni sottoclasse venga prodotta in ambienti separati per prevenire contaminazioni con altre sottoclassi o prodotti farmaceutici, riducendo il rischio di esposizione accidentale e minimizzando gli effetti avversi nei pazienti. Gli antibiotici, come tutti gli *Active Pharmaceutical Ingredients* (API) e i *Finished Pharmaceutical Products* (FPP), devono soddisfare rigorosi standard di qualità, efficacia e sicurezza, i quali vengono garantiti attraverso l’Autorizzazione alla Produzione e l’Autorizzazione all’Immissione in Commercio.

1.3.1 Autorizzazione alla produzione

La produzione di medicinali destinati sia al mercato europeo che all’esportazione richiede un’apposita autorizzazione, rilasciata dalle Autorità Regolatorie Nazionali in seguito a un’ispezione che verifica la conformità del produttore ai requisiti tecnico-industriali e la presenza di personale qualificato.

In Italia, dopo un’ispezione con esito positivo, l’azienda ottiene la *Manufacturing Licence*, un provvedimento autorizzativo, e il *GMP Certificate*, che attesta la conformità alle Norme di Buona Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices*).

L’autorizzazione non si limita alla produzione completa dei farmaci, ma include anche attività parziali, come il confezionamento, il controllo qualità e la lavorazione di sostanze attive intermedie utilizzate per la produzione dei medicinali. Inoltre, per assicurare il mantenimento di tali requisiti, sono previsti controlli periodici per il rinnovo dell’autorizzazione. In Italia è l’AIFA l’ente responsabile del coordinamento delle ispezioni, sebbene queste possano essere richieste anche dalla Commissione Europea, dall’EMA, da altri Stati membri o dagli stessi produttori.

Le Norme di Buona Fabbricazione sono un insieme di regole e procedure finalizzate a garantire i più elevati standard di sicurezza e qualità nei settori farmaceutico, alimentare, dei dispositivi medici e cosmetico. Le linee guida di riferimento sono contenute nel documento ICH Q7³⁰, sviluppato dall’*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

Le GMP non si limitano alla regolamentazione del processo produttivo, ma coprono numerosi aspetti fondamentali per la qualità e la sicurezza dei prodotti finali, tra cui:

- documentazione e registrazione dettagliata di ogni fase del processo produttivo;
- formazione del personale su produzione, controllo e conservazione dei prodotti;
- prevenzione della contaminazione, attraverso specifiche procedure di sterilizzazione, decontaminazione e disinfezione;
- manutenzione di strumenti e macchinari per prevenire contaminazioni e garantire la sicurezza sul lavoro;
- monitoraggio del processo produttivo, mediante *audit* interni per il controllo delle materie prime e dei materiali di imballaggio;
- gestione dei reclami e dei ritiri di prodotto, con procedure efficaci per intervenire tempestivamente in caso di problemi.

1.3.2 Autorizzazione all'immissione in commercio

Prima che un farmaco possa essere commercializzato è necessario che l'azienda produttrice inoltri la domanda di Autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) presso le autorità regolatorie, le quali verificheranno che il prodotto soddisfi gli standard di qualità, sicurezza ed efficacia stabiliti dalle autorità regolatorie stesse.

Il richiedente è tenuto a presentare un *dossier* di registrazione secondo il formato standard *Common Technical Document* (CTD), messo a punto dall'ICH³¹, ossia un modello sviluppato per armonizzare la documentazione, semplificare le procedure di registrazione e accelerare i tempi di valutazione da parte delle autorità regolatorie. Il CTD è strutturato in cinque moduli:

- Modulo 1: dati amministrativi specifici per la Comunità Europea, inclusi il modulo di domanda, il riassunto delle caratteristiche del prodotto, l'etichettatura e il foglietto illustrativo;
- Modulo 2: sintesi della documentazione generale, con riassunti di qualità, efficacia e sicurezza, redatti da esperti qualificati;
- Modulo 3: dati chimici, farmaceutici e biologici;
- Modulo 4: report degli studi di farmacologia e tossicologia;
- Modulo 5: relazioni sugli studi clinici (fase 0, I, II, III) per dimostrare l'efficacia e sicurezza nell'uomo.

L'inoltro della domanda di AIC da parte del richiedente può avvenire attraverso diverse procedure regolamentate: procedura nazionale, valida solo in un singolo stato (es. Italia, con AIFA), procedura centralizzata, gestita dall'EMA ed obbligatoria per alcuni farmaci innovativi, procedura decentrata, che consente l'autorizzazione simultanea in più Stati UE, senza passare dall'EMA e la procedura di mutuo riconoscimento, utile quando farmaco è già autorizzato in un Paese UE e si vuole chiedere il riconoscimento in altri Stati membri. Per la registrazione dei dati relativi a un principio attivo, le linee guida dell'EMA³² prevedono tre opzioni: il *Certificate of Suitability* (CEP), applicabile solo se il principio attivo è presente nella Farmacopea Europea, l'*Active Substance Master File* (ASMF), utilizzabile per principi attivi nuovi non presenti nella Farmacopea Europea ma anche per quelli inclusi in essa, ed infine può essere utilizzato il modulo 3 del CTD.

La redazione del documento tecnico-scientifico ASMF, segue le linee guida di EMA³³ e contiene informazioni dettagliate sulla sostanza attiva; l'ASMF è l'equivalente del *Drug Master File* (DMF) negli Stati Uniti. Tale documento ha lo scopo di tutelare la proprietà intellettuale del produttore, responsabile della stesura del ASMF oltre che della qualità del medicinale.

1.4 Le impurezze

Nello sviluppo di un processo produttivo, la ricerca e il controllo delle impurezze rivestono un'importanza cruciale, in quanto possono compromettere la qualità e la sicurezza dell'API o del FPP.

Il processo di *Manufacturing Process Development* si articola in tre punti fondamentali:

1. Identificazione dei *Critical Quality Attributes* (CQA), ossia le caratteristiche critiche che possono influire sulla qualità del principio attivo.
2. Definizione di un processo produttivo adeguato che rispetti gli standard di qualità richiesti.
3. Implementazione di una strategia di controllo per monitorare il processo e garantire che il prodotto finale mantenga i requisiti di qualità.

I CQA comprendono caratteristiche fisiche, chimiche o microbiologiche le quali devono rientrare entro limiti specifici per assicurare la qualità del prodotto finale. Tali attributi possono essere ridefiniti e modificati sulla base delle nuove conoscenze scientifiche.

Una classe di CQA sono le impurezze le quali sono particolarmente rilevanti in quanto possono influenzare la sicurezza e l'efficacia del principio attivo. Pertanto, le linee guida

riguardanti il controllo delle impurezze sono fondamentali; tali linee guida le definiscono come "tutte le sostanze presenti in un prodotto farmaceutico finito che non siano il principio attivo o gli eccipienti"³⁴.

Le impurezze possono avere diversa origine e natura:

- impurezze organiche: derivanti dal processo di sintesi o purificazione dell'API, oppure dalla degradazione durante lo stoccaggio. Queste includono i materiali di partenza, catalizzatori, reagenti residui, sottoprodotti, intermedi e prodotti di degradazione;
- impurezze inorganiche: principalmente provenienti dal processo di sintesi, come residui di catalizzatori e ligandi metallici, sali inorganici, residui di agenti filtranti e metalli derivanti dalle apparecchiature industriali. Approfondite nelle linee guida ICH Q3D³⁵.
- solventi residui: classificati in tre categorie di rischio e trattati nella linea guida ICH Q3C³⁶.

Per le prime due categorie di impurezze si fa riferimento alle linee guida ICH Q3A (R2)³⁷, che trattano le impurezze nei nuovi principi attivi, e alle linee guida ICH Q3B (R2)³⁴, che riguardano invece il controllo dei prodotti di degradazione che possono formarsi durante la produzione e la conservazione del farmaco finito.

Nel dossier ASMF/DMF, il richiedente deve giustificare le specifiche adottate per il principio attivo e dimostrare che i metodi analitici utilizzati per rilevare e quantificare impurezze e solventi residui siano validati, in conformità alle linee guida ICH Q2A e ICH Q2B sulla validazione dei metodi analitici³⁸.

Inoltre, è necessario documentare tutte le impurezze organiche, sia attuali che potenziali, che potrebbero formarsi durante la sintesi, purificazione e conservazione del principio attivo. Questa valutazione si basa su un'analisi scientifica che considera le reazioni chimiche coinvolte nel processo sintetico, le impurezze derivanti dai materiali di partenza e i prodotti di degradazione, seguendo le linee guida ICH Q1³⁹ per gli studi di stabilità.

Il richiedente inoltre deve riassumere gli studi di laboratorio condotti per identificare le impurezze, includendo i test effettuati sui lotti prodotti durante lo sviluppo e quelli derivanti dal processo produttivo commerciale. Inoltre, devono essere riportati i risultati degli *stress test* per identificare le impurezze che potrebbero aumentare durante lo stoccaggio. Il profilo delle impurezze ottenuto nei lotti di laboratorio deve essere

confrontato con quello dei lotti commerciali, e le eventuali differenze devono essere adeguatamente discusse nella sezione pertinente del *Common Technical Document* (CTD).

1.5 Vie di sintesi sostenibili per ridurre l'impatto ambientale dell'industria farmaceutica

L'obiettivo dell'industria farmaceutica è il miglioramento della salute e del benessere della popolazione mondiale adattandosi alle mutevoli esigenze della società. Per raggiungere questo traguardo, le aziende investono costantemente in processi più sostenibili, al fine di ridurre il loro impatto ambientale⁴⁰.

1.5.1 Green Chemistry

La chimica verde si propone di sviluppare processi industriali a basso impatto ambientale, promuovendo soluzioni eco-compatibili e sostenibili. Per rispondere alla crescente esigenza di ridurre l'inquinamento, la *green chemistry* definisce condizioni di reazione alternative ed ecocompatibili, ottimizzando al contempo tempi e temperature nei processi sintetici⁴¹. Nel 1991 i chimici Paul T. Anastas e John C. Warner hanno stilato i 12 principi su cui si basa la chimica verde, diventati delle linee guida da seguire per ottimizzare un processo in termini di sicurezza ed eco-compatibilità. Questi principi sono raggruppati in due categorie ovvero “Minimo impatto ambientale” (punti da 1 a 8) e “Riduzione del rischio” (punti da 9 a 12)^{41,42}. Oggi, molti processi industriali sono stati convertiti a sintesi *green*, sfruttando tecnologie avanzate come la *flow chemistry*, la bioingegneria e la biocatalisi con enzimi per trasformazioni selettive⁴².

1.5.2 La Flow Chemistry applicata all'industria farmaceutica

Negli ultimi anni, la chimica di flusso (*flow chemistry*) si è affermata come una tecnologia chiave nell'innovazione chimica, grazie alla sua capacità di ottimizzare i processi produttivi, migliorando al contempo sostenibilità, sicurezza ed efficienza. La crescente attenzione verso l'impatto ambientale e la necessità di processi più sicuri ed economici hanno accelerato la transizione verso questa metodologia, perfettamente allineata con i principi della *green chemistry*.⁴³

La chimica a flusso continuo non è un concetto nuovo, la sua prima vera applicazione su larga scala è avvenuta nel settore petrolchimico⁴⁴, tuttavia negli ultimi decenni l'interesse

verso processi a flusso continuo da parte delle industrie farmaceutiche è aumentato notevolmente soprattutto da parte delle grandi aziende farmaceutiche in continua ricerca di processi più sostenibili ed efficienti. Interessante in tale contesto è il lavoro di Patrick L. Heider et al.⁴⁵ in cui è riportato un esempio di produzione continua *end-to-end* di un API, l'aliskiren emifumarato. L'impianto per la produzione di questo farmaco è stato progettato, partendo da un intermedio chimico avanzato **1** fino alla compressa finita del composto **6** (Fig. 1.15). Il processo comprende due fasi di sintesi, seguite dal *work-up* dell'intermedio e dalla purificazione. Successivamente, il sale emifumarato finale è stato cristallizzato, lavato, filtrato ed essiccato. La polvere ottenuta è stata successivamente miscelata con un eccipiente per ottenere il prodotto finale sottoforma di compressa. Il sistema ha garantito una produttività nominale di 41 g/h di aliskiren, equivalenti a 340 compresse all'ora.

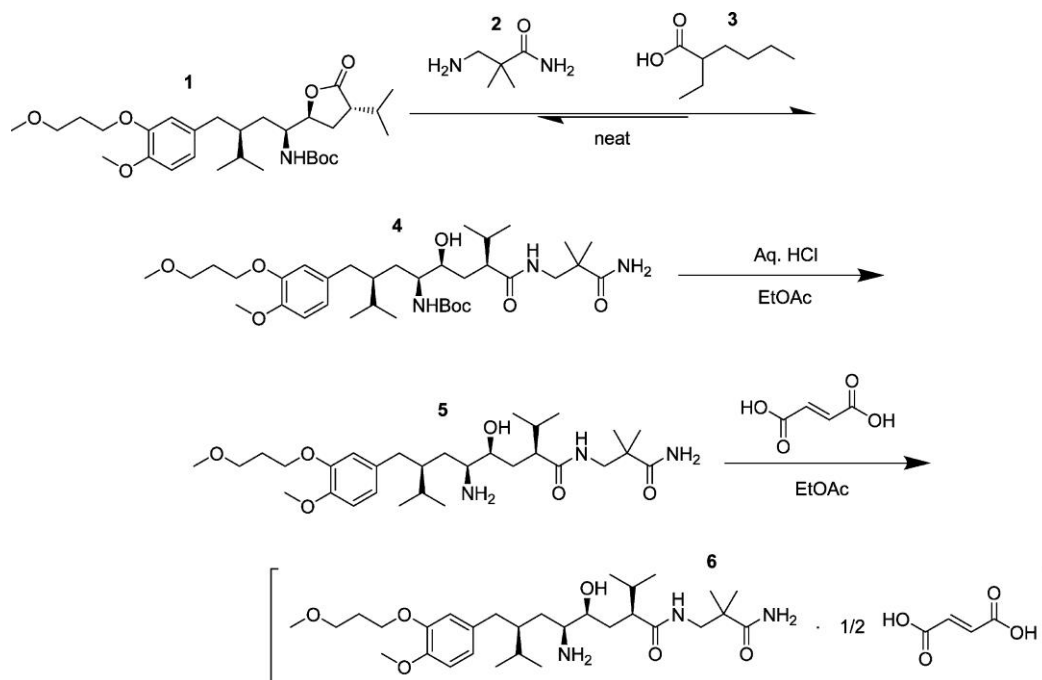


Fig. 1.15: Continuous Process Chemistry per trasformare l'intermedio **1** nella sostanza farmacologica **6**

Il principio alla base della flow chemistry prevede che uno o più fluidi contenenti i reagenti vengano pompati continuamente attraverso un reattore, dove avviene la reazione chimica. Questo processo può avvenire attraverso sistemi semi-continuativi, con pompe a siringa che richiedono un riempimento periodico, oppure attraverso sistemi completamente continui, in grado di operare senza interruzioni per lunghi periodi. I sistemi di flusso poi sono provvisti di altri elementi come giunzioni, miscelatori, regolatori di pressione e, nelle configurazioni più sofisticate, si trovano anche strumenti

per il controllo della temperatura, la separazione in linea dei prodotti e il monitoraggio analitico in tempo reale.⁴⁶



Fig. 1.16: Sistemi semi-continuativi e sistemi completamente continui⁴⁶

L'approccio tradizionale per la sintesi di API e intermedi farmaceutici si basa su processi di sintesi in *batch*. Questo metodo prevede l'introduzione dei reagenti in un reattore in quantità predefinite, seguita dalla loro miscelazione e reazione per un determinato periodo di tempo. Al termine della reazione, il prodotto viene estratto e il reattore pulito prima di avviare un nuovo ciclo produttivo. Diversamente la flow chemistry adotta un sistema continuo in cui i reagenti scorrono costantemente attraverso un reattore.

Un tipico sistema a flusso continuo è costituito da una serie di moduli interconnessi, ognuno dei quali svolge una funzione specifica per garantire un processo efficiente e controllato.

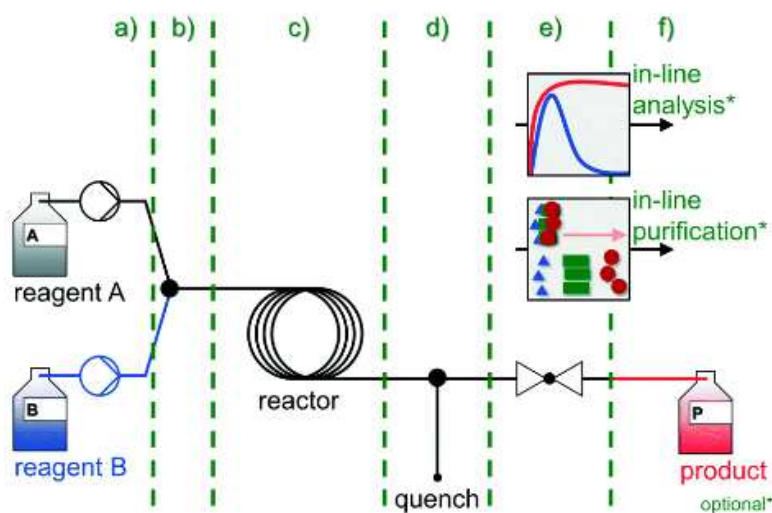


Fig. 1.17: Schema tipico di un sistema a flusso⁴⁷

Nella figura 1.17 sono riportati i moduli di un tipico sistema a flusso: a) zona pompa di erogazione reagente, b) miscelazione, c) reattore, d) quenching, e) regolazione della contropressione (BPR), f) raccolta, analisi e purificazione. Facoltativamente, è possibile accoppiare al sistema anche tecniche di analisi in linea e/o di purificazione in linea.⁴⁷

La transizione dai tradizionali processi *batch* alla chimica di flusso offre numerosi vantaggi, nonostante tale passaggio possa presentare alcune sfide tecniche. Numerosi sono i benefici che si hanno nell'applicazione di questa tecnologia; tra i principali si annoverano:

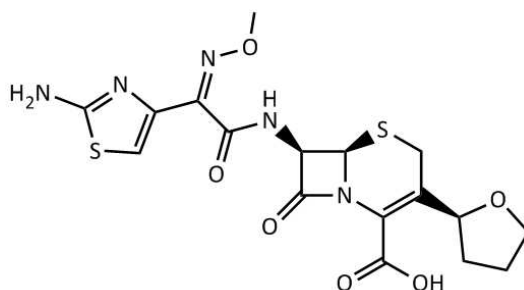
- maggiore velocità di reazione, il ridotto volume del reattore migliora il trasferimento di calore e massa, accelerando le trasformazioni chimiche;
- controllo ottimizzato delle condizioni operative, temperatura, pressione e tempi di reazione possono essere regolati con estrema precisione, aumentando l'efficienza e riducendo gli sprechi;
- maggiore sicurezza, la lavorazione continua evita l'accumulo di grandi quantità di intermedi pericolosi, riducendo il rischio di incidenti;
- riduzione dei costi e impatto ambientale, l'ottimizzazione del processo porta a un minore consumo di risorse e una significativa riduzione dei rifiuti chimici.⁴⁸

I processi a flusso continuo offrono poi altri benefici tra cui la possibilità di effettuare *screening*, ottimizzazione e automazione delle reazioni più facilmente rispetto all'approccio in *batch* in cui l'automazione non è scontata ed infine permettono una migliore integrazione di analisi in linea per analisi in tempo reale.⁴⁹

2. Presupposti scientifici e scopo della tesi

2.1 Il Cefovecin

Il Cefovecin (*Fig. 2.1*) è una cefalosporina di terza generazione commercializzato da Zoetis (sussidiaria veterinaria di Pfizer) con il nome di *Convenia* ed è autorizzato per il trattamento di infezioni cutanee causata da *Pasteurella multocida* nei gatti e da *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus canis* nei cani.



Cefovecin

Fig. 2.1: Formula di struttura del Cefovecin

Il grande vantaggio di questa molecola è l'efficacia terapeutica a lunga durata d'azione associata ad un relativo basso dosaggio (circa 8 mg/kg), che permette una somministrazione come singola dose, con un tempo di emivita nel cane di 5.5 giorni e 6.9 giorni nel gatto.

Il Cefovecin ha ottenuto l'AIC in Europa il 19 giugno 2006 e in America nel giugno del 2008. Lo sviluppo sintetico è iniziato nel 1999 e si è protratto fino al 2005 coinvolgendo un gruppo multinazionale; ACS Dobfar è stata parte attiva di questo *team* e ha contribuito allo sviluppo del processo produttivo fino alla scala commerciale.

La procedura sintetica adottata da ACS Dobfar per preparare il Cefovecin parte dal RSM (*Regulatory Starting Material*) 7-AMT, ottenuto per via fermentativa a partire dalla penicillina G secondo il seguente schema di reazione (*Fig. 2.2*).

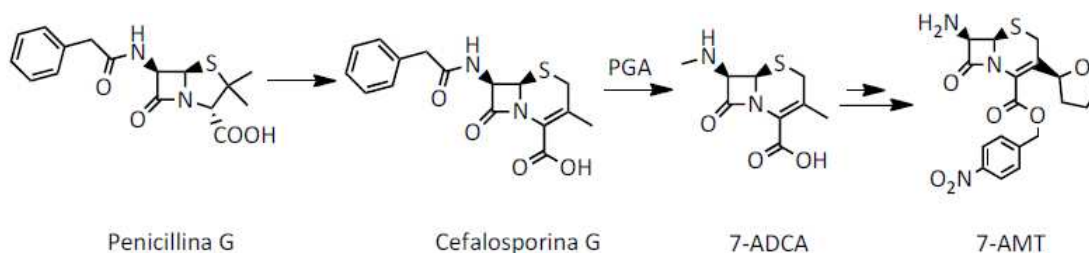


Fig. 2.2: Sintesi dell'RMS 7-AMT

Il 7-AMT subisce una reazione di riduzione, promuovendo la formazione dell'intermedio 3-TH, il quale successivamente reagisce con un agente acilante (MAEM), impiegato per funzionalizzare la posizione C-7', per introdurre la catena laterale del Cefovecin (Fig. 2.3).

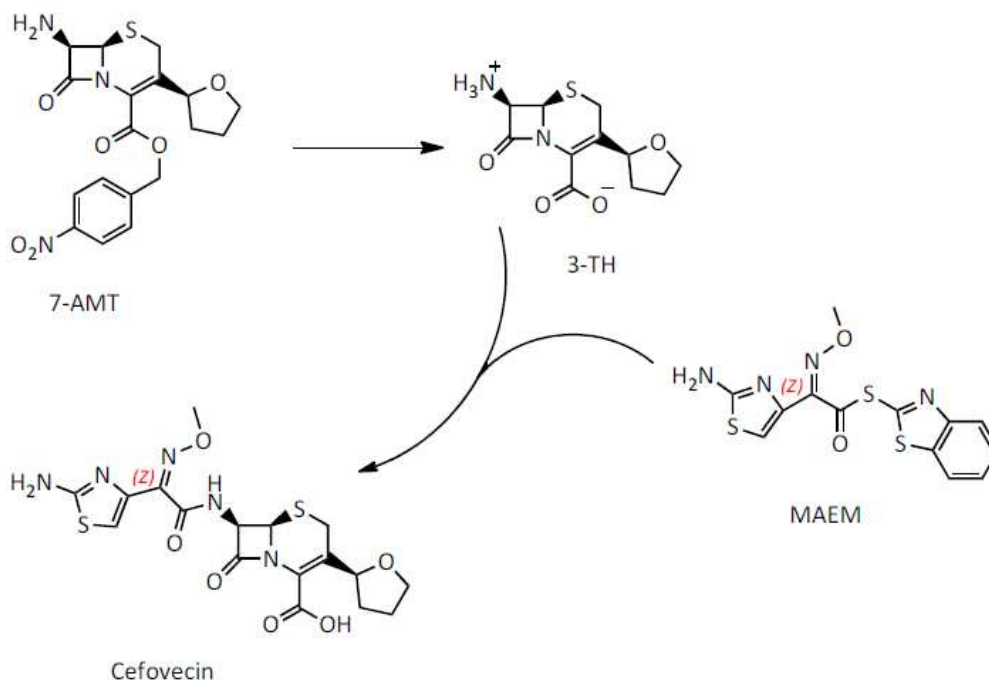


Fig. 2.3: Sintesi del Cefovecin

2.1.1 Le impurezze del Cefovecin

ACS Dobfar S.p.A. è una delle principali aziende internazionali specializzate nella produzione di β -lattamici e vanta una pipeline ricca di antimicrobici, tra cui cefalosporine, carbapenemi e penicilline. Per ACS Dobfar, così come per tutte le aziende farmaceutiche, è fondamentale individuare, sintetizzare e caratterizzare le impurezze che si generano durante un processo produttivo.

L'identificazione e la caratterizzazione chimica delle impurezze, sia nei prodotti finali che negli intermedi di reazione, rappresentano passaggi cruciali nello sviluppo di un farmaco. Gli enti regolatori richiedono una caratterizzazione approfondita di ciascuna impurezza, indipendentemente dal fatto che derivi da processi degradativi o reazioni secondarie. Essi, inoltre, chiedono di dimostrare quantitativamente e qualitativamente la presenza o assenza di tali impurezze al fine di garantire la qualità, la sicurezza e l'efficacia del prodotto finale. A questo scopo, lo studio delle impurezze deve considerare non solo l'intero percorso sintetico, ma anche la stabilità del prodotto finito, un aspetto cruciale per

le valutazioni legate alla fase di stoccaggio. Nel caso del Cefovecin, l'analisi si è focalizzata sui centri di asimmetria della molecola e sui relativi isomeri (Fig. 2.4).

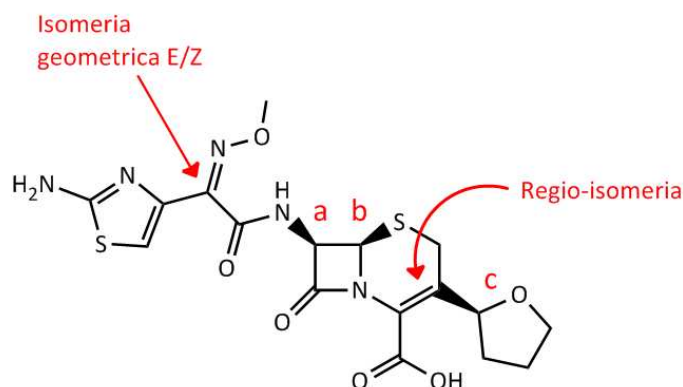


Fig. 2.4: Centri di asimmetria del Cefovecin

Nel dettaglio si identificano 3 stereocentri (a, b e c), l'isomero geometrico a livello dell'ossima e il regio-isomero C2-C3 del doppio legame nel nucleo cefalosporinico. Complessivamente, ciò porta a un totale di $2^5 = 32$ possibili isomeri. Le conoscenze pregresse dell'azienda sulla sintesi delle cefalosporine hanno consentito di focalizzarsi solo su alcuni di questi 32 possibili isomeri. La selezione è avvenuta in base alla loro elevata probabilità di formazione, già osservata in altri processi di sintesi di cefalosporine analoghe. In particolare, due impurezze caratteristiche sono la variazione del centro di asimmetria "a" e la regio-isomeria del doppio legame endociclico. In aggiunta a queste due possibili impurezze comunemente presenti, di rilevante importanza è l'isomeria E/Z dell'ossima del Cefovecin.

Per quanto riguarda invece i centri di asimmetria "b" e "c" è noto che lo stereocentro "b" del Cefovecin, con configurazione R, è determinato dal processo di fermentazione che porta alla produzione della penicillina G. Di conseguenza, lungo l'intero percorso sintetico che dalla penicillina G conduce al Cefovecin API, non è stata evidenziata epimerizzazione di questo stereocentro. Diversamente, lo stereocentro "c" del Cefovecin, con configurazione S, risulta suscettibile all'epimerizzazione, che può verificarsi sia durante il processo di sintesi sia a seguito di fenomeni di degradazione. È stato osservato che tale epimerizzazione avviene quando il gruppo carbossilico è in forma deprotetta e risulta particolarmente rapida in ambiente acido, suggerendo il coinvolgimento del gruppo carbossilico nel meccanismo di epimerizzazione. A conferma di ciò, l'epimero con configurazione R dello stereocentro "c" è stato sintetizzato, isolato e completamente caratterizzato precedentemente da ACS Dobfar.

2.2 Idrogenazione in flow

L'adozione delle metodologie di chimica di flusso nelle reazioni di idrogenazione ha portato a significativi miglioramenti in termini di efficienza, sicurezza e sostenibilità ambientale. Rispetto agli approcci tradizionali, che sono limitati dalla lenta diffusione dell'idrogeno gassoso nel solvente, la chimica di flusso ottimizza il contatto gas-liquido grazie all'impiego di tecniche di miscelazione in linea. Questo processo consente una rapida saturazione del solvente con idrogeno, favorendo un'interazione più efficace tra gas, liquido e catalizzatore e, di conseguenza, accelerando la velocità di reazione. Un esempio di reattore che sfrutta la miscelazione gas-liquido in linea è il H-Cube® ThalesNano.⁵⁰ In generale una reazione di idrogenazione prevede l'introduzione di idrogeno molecolare, in presenza di un catalizzatore metallico come il palladio (Pd), nel substrato da idrogenare. Un H-Cube si compone di un serbatoio in cui è contenuta acqua distillata che attraverso un processo di elettrolisi produce H₂ gassoso, di tuberie che collegano l'H₂ gassoso e la soluzione contenente il substrato da idrogenare ad un miscelatore e una cartuccia contenente il catalizzatore metallico immobilizzato (Fig. 2.9).

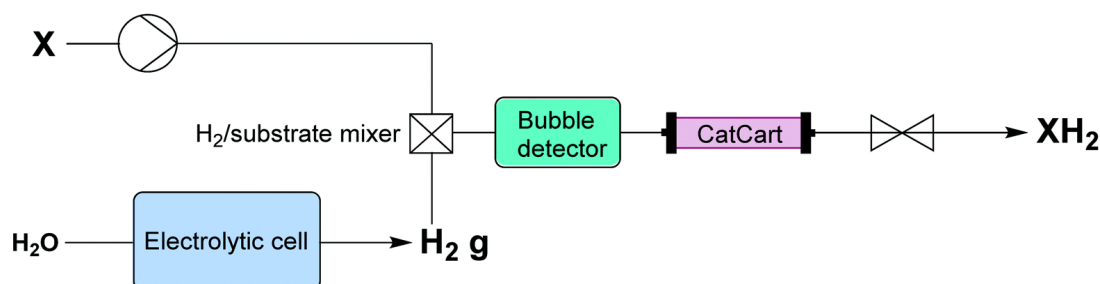


Fig. 2.5: Schema di un idrogenatore che lavora in flow ⁵¹

Grazie alle ampie superfici di contatto e ai ridotti percorsi di diffusione molecolare all'interno dei micro canali, si ottiene un'interazione ottimale tra le tre fasi, consentendo un'idrogenazione che risulta impossibile nei tradizionali sistemi batch.⁵²

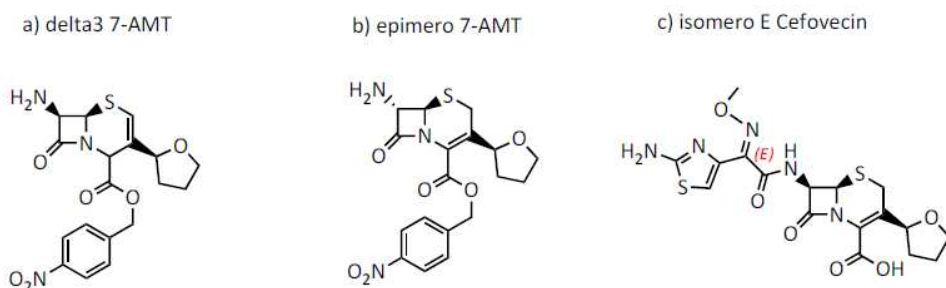
I vantaggi nell'applicazione di questo approccio sono molteplici a partire dal migliore controllo delle condizioni di reazione, ossia velocità del flusso, temperatura e pressione rispetto all'approccio in batch. Inoltre, si ha una maggiore sicurezza nell'esecuzione della reazione in quanto l'H₂ viene generato in situ mediante elettrolisi dell'acqua riducendo drasticamente i rischi esplosivi. La presenza del catalizzatore immobilizzato all'interno di cartucce permette poi di ridurre il contatto dell'operatore con i metalli tossici. Infine, questo tipo di strumenti sono dotati di una migliore automazione il che permette di poter

effettuare più facilmente analisi di screening e studi di ottimizzazione di un processo rispetto all'approccio tradizionale in batch.

2.3 Scopo della tesi

Nella fase iniziale del mio percorso di tesi, mi sono occupata della sintesi e caratterizzazione di alcune impurezze del Cefovecin, utili per scopi regolatori. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata su tre molecole:

- a) isomero $\Delta 3$ del 7-AMT
- b) epimero del 7-AMT
- c) isomero E dell'ossima del Cefovecin



Le impurezze **a** e **b** coinvolgono la molecola 7-AMT, in quanto la loro formazione è strettamente correlata alle condizioni sintetiche che portano alla formazione di tale intermedio. Per quanto riguarda invece l'impurezza **c** la sintesi è stata effettuata a partire dal Cefovecin, in quanto l'isomerizzazione dell'ossima può avvenire esclusivamente nel prodotto finito ed è strettamente correlata alla stabilità della molecola stessa.

Nella seconda fase del mio percorso di tesi, l'attenzione si è concentrata sulla valutazione della fattibilità di un processo di idrogenazione mediante l'utilizzo di un reattore per chimica in flusso, l'H-Cube[®] Mini Plus (ThalesNano). In particolare, è stata analizzata la possibilità di eseguire una reazione di deprotezione, attualmente eseguita in batch, sfruttando i vantaggi offerti dalla tecnologia a flusso continuo (Fig. 2.6).

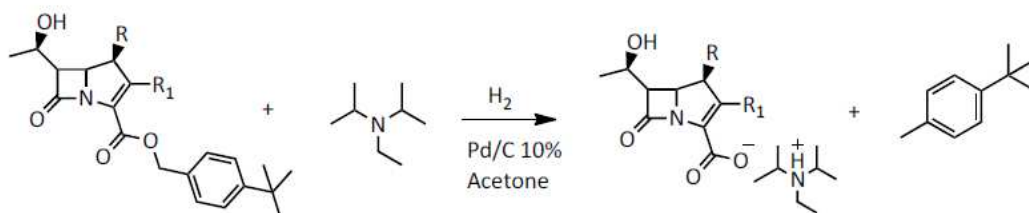


Fig. 2.6: Schema di reazione di idrogenazione

Sulla base delle conoscenze relative al processo in batch di questa reazione, nonché alla stabilità del substrato e del prodotto finale, è stato effettuato uno studio di *Design of Experiments* (DoE). Questo approccio ha permesso di individuare le condizioni ottimali di reazione, tra cui velocità di flusso, temperatura e pressione, per massimizzare la resa del prodotto idrogenato, impiegando questa nuova tecnologia.

3. Discussione dei risultati

3.1 Sintesi isomero $\Delta 3$ del 7-AMT

L'isomero $\Delta 3$ (**3**) dell'intermedio 7-AMT (**2**) è il risultato della regio-isomeria del doppio legame endociclico C₂-C₃. L'esperienza pregressa di ACS Dobfar nella sintesi di cefalosporine ha consentito di riconoscere la potenziale formazione di questa impurezza, che risulta essere piuttosto comune per questo tipo di prodotti. La migrazione del doppio legame è un fenomeno ben noto, che si verifica in presenza di un acido carbossilico esterificato e in condizioni fortemente basiche. In particolare, quando l'acido carbossilico in posizione 2 è protetto, gli idrogeni adiacenti al solfuro risultano particolarmente acidi e, sotto l'azione di una base, vengono deprotonati. Ciò porta alla migrazione del doppio legame dalla posizione 2 alla posizione 3 (*Fig. 3.1*).

Poiché l'impurezza **3** si forma esclusivamente durante la sintesi del 7-AMT (da ora in avanti composto **2**), precursore carbossilico protetto del Cefovecin, la sua sintesi è stata effettuata a partire dal suo sale cloridrato (**1**), commercialmente disponibile. Valutare la possibile formazione di **3** è di fondamentale importanza ai fini regolatori; pertanto, è necessario ottenere la molecola con un elevato grado di purezza per identificarla come possibile sottoprodotto del processo. Il composto **2** disponibile come sale cloridrato ha reso necessario il trattamento con una base per ripristinare l'ammina. A tale scopo è stato adottato un metodo di cristallizzazione con bicarbonato di sodio, acqua e metanolo secondo il seguente schema di reazione (*Fig. 3.1*).

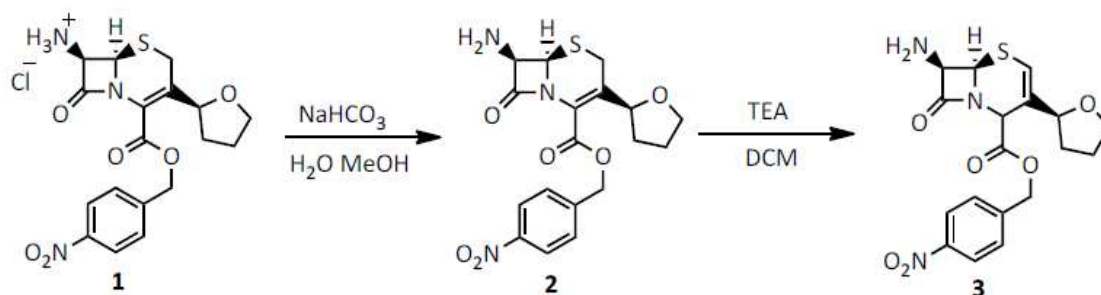


Fig. 3.1: Schema di sintesi composto 3

Il composto **2** così ottenuto è stato disciolto in diclorometano (DCM) e alla soluzione sono stati aggiunti 0,7 equivalenti di trietilammina (TEA), come base per indurre l'isomerizzazione del doppio legame endociclico C₂-C₃.

La miscela è stata mantenuta in agitazione per 1,5 ore e quindi è stata effettuata un'analisi HPLC per verificare l'andamento dell'isomerizzazione.

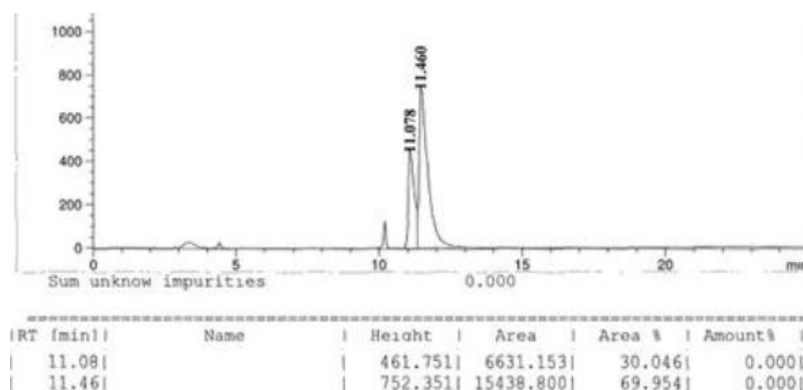


Fig. 3.2: Cromatogramma analisi dopo 1,5 ore di reazione di isomerizzazione

Il tempo di ritenzione di **2** è pari a 11,460 min; osservando il cromatogramma è possibile notare la comparsa di un nuovo picco con un tempo di ritenzione pari a 11,078 min. riferibile al composto **3**. La conversione di **2** in **3** è stata monitorata confrontando i valori di area dei due picchi. Dopo 1,5 ore di reazione la conversione del composto **2** in composto **3** è stata del 30%. Si è resa necessaria una purificazione su colonna al fine di ottenere il composto **3** puro ed eseguire la successiva caratterizzazione. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia *flash* utilizzando un approccio in gradiente di concentrazione (Tabella 1) in particolare è stato impiegato gel di silice come fase stazionaria, e una miscela di etilacetato – cicloesano come fase mobile, in cui il campione è risultato completamente solubile.

Tabella 1: Gradiente di concentrazione della fase mobile

Etilacetato	Cicloesano
60	40
70	30
80	20

Il composto **3** purificato è stato quindi sottoposto ad un'analisi di spettrometria di massa e NMR, al fine di ottenere una caratterizzazione completa.

3.2 Sintesi dell'epimero in posizione 7 del 7-AMT

Nel Cefovecin la configurazione R dello stereocentro “a” è stabilita dalla fermentazione che produce la penicillina G; tuttavia, il processo sintetico che porta all'ottenimento

dell'intermedio chiave 7-AMT (**2**), potrebbe causare l'epimerizzazione di tale stereocentro, fornendo l'impurezza epi-7-AMT (**14**), come indicato nello schema di seguito riportato (Fig. 3.3):

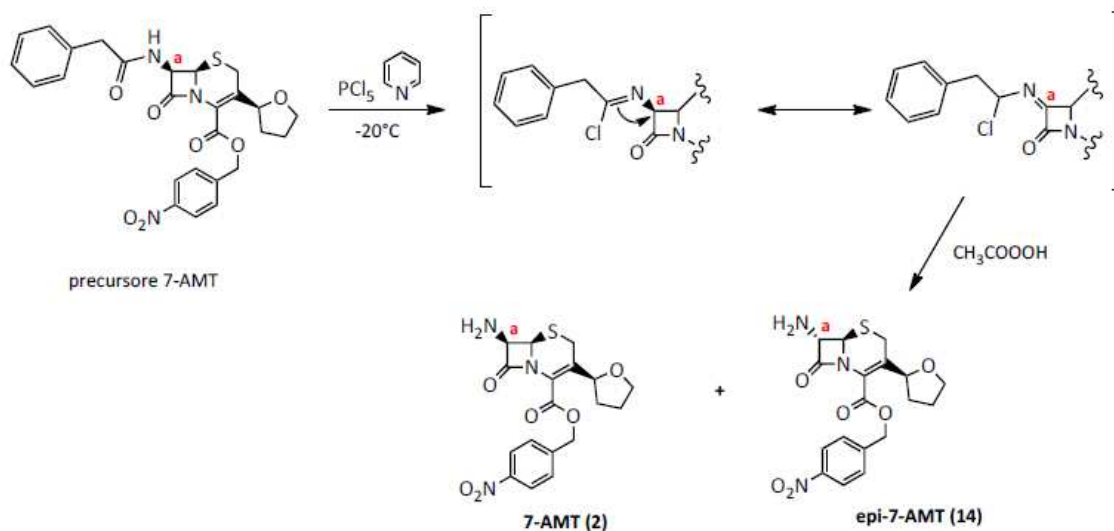


Fig. 3.3: Ipotetica formazione dell'impurezza **14**

Nel dettaglio, il protocollo di *cleavage*, prevede l'iniziale formazione di un imminocloruro, ad opera del pentacloruro di fosforo in presenza di piridina, seguita da una alcol-lisi con isobutanolo, in cui si ha la formazione del **2** e dell'aril-alchil-estere, come gruppo uscente. La reazione di clorurazione è condotta a temperatura controllata, a -20°C , ed è proprio in questo step che potrebbe avvenire la perdita dell'informazione stereogenica. Si ipotizza infatti, una tautomeria del doppio legame, presente nell'intermedio imminocloruro, con la sua migrazione in posizione 7. La conseguente reazione di alcol-lisi dell'immina può avvenire da entrambe le facce della molecola causando una racemizzazione del centro di asimmetria.

Alla luce di queste osservazioni l'impurezza **14** si potrebbe generare solamente durante il processo di sintesi del **2** pertanto verificare la sua possibile formazione è di fondamentale importanza ai fini regolatori. Per ottenere la molecola con un elevato grado di purezza sono state valutate diverse strategie sintetiche a partire dal **2**:

1. reazione con TMCS, TEA e PPh_3 ;
2. reazione con LDA;
3. reazione con il catalizzatore di Shvo;
4. aumento della temperatura nello step di formazione dell'imminocloruro.

3.2.1 Reazione con TMCS, TEA e PPh₃

La prima strategia sintetica ha previsto l'applicazione di una procedura che ACS Dobfar ha adottato per ottenere la completa epimerizzazione di una penicillina, dell'analogo stereocentro a cui è legato il gruppo amminico in posizione 6 secondo il seguente schema di reazione (Fig. 3.4).

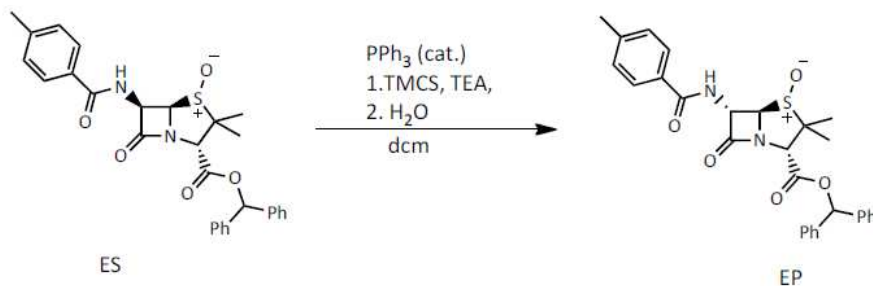


Fig. 3.4: Schema di reazione epimerizzazione penicillina

Il meccanismo di reazione, illustrato nella fig. 3.5, prevede la formazione del sililetere dell'ammide di ES che porta alla scomparsa del legame idrogeno tra 6 β -ammide-NH e solfossido. La repulsione sterica risultante tra 6 β -allil etere e solfossido accelera l'epimerizzazione in posizione 6 β per fornire EP sililetere.

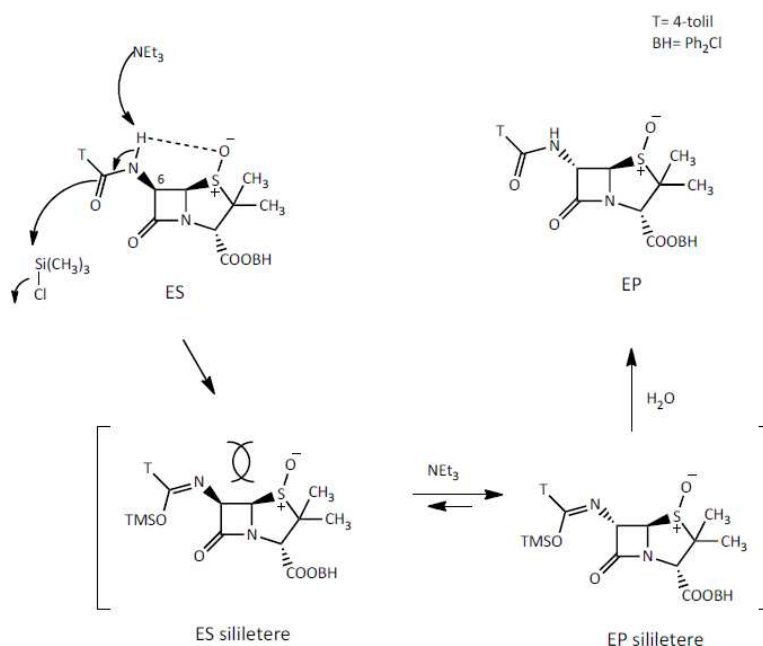


Fig. 3.5: Meccanismo di epimerizzazione penicillina

Pertanto, nonostante la diversità dei substrati di partenza, è stata applicata la stessa procedura sul composto **2** come sale cloridrato, dopo una trasformazione dell'ammina in **7** ad ammide. La reazione di ammidazione è stata condotta utilizzando il para-tolil cloruro secondo il seguente schema di reazione (Fig. 3.6).

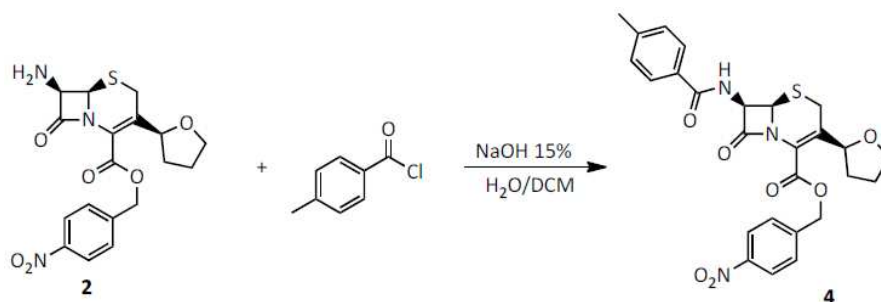


Fig. 3.6: Schema di reazione di ammidazione composto 2

Il primo passo è stato individuare le giuste condizioni di reazione al fine di ottenere una buona conversione del composto **2** in composto **4**. Per tal ragione sono state condotte due prove, applicando dei protocolli sintetici già in uso in ACS Dobfar, in cui sono stati impiegati diversi equivalenti di para-tolil cloruro e diverse temperature di reazione. Nella prima prova sono stati utilizzati 2,6 equivalenti di para-tolil cloruro a temperatura ambiente mentre nella seconda prova 1,2 equivalenti a temperatura compresa tra 0-2 °C (Tabella 2). In entrambe le prove è stata utilizzata una soluzione di NaOH al 15% al fine di mantenere il pH di reazione intorno alla neutralità. L'utilizzo della base era necessario in quanto la reazione di ammidazione comporta la formazione di acido cloridrico; pertanto per ragioni legate alla stabilità della molecola è stato necessario mantenere il pH di reazione neutro.

Tabella 2: Risultati delle prove di ammidazione

Prova	Eq. para-tolil cloruro	Temperatura	Conversione
1	2,6	Temp. ambiente	> 99%
2	1,2	0-2 °C	> 99%

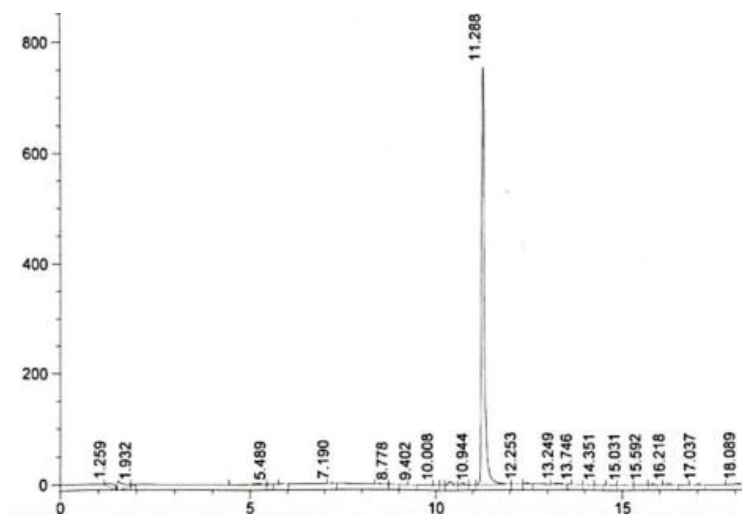


Fig. 3.7: Cromatogramma composto 2

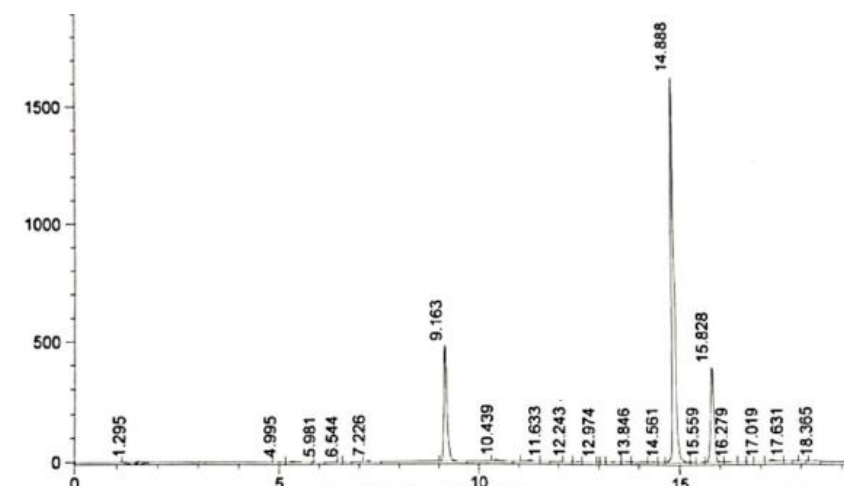


Fig. 3.8: Cromatogramma fine reazione prova 1

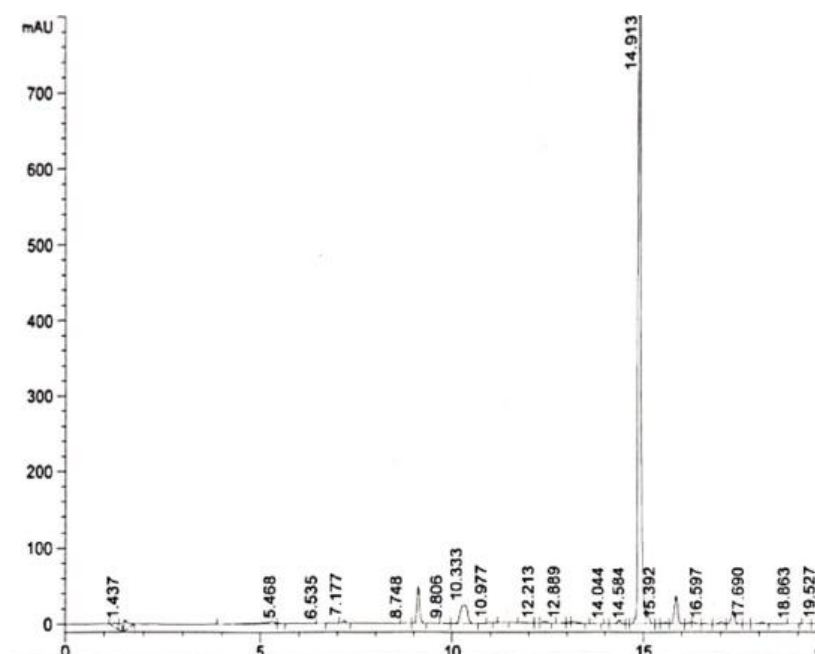


Fig. 3.9: Cromatogramma fine reazione prova 2

Dai cromatogrammi risulta che entrambe le vie sintetiche permettono di ottenere una completa conversione del composto **2** in **4** in quanto il picco del composto **2**, con tempo di ritenzione 11,2 min, è assente. Il picco con tempo di ritenzione di 14,9 min invece è riferito al composto **4**. Tuttavia, osservando i profili cromatografici delle due prove è possibile notare come quello relativo alla prova 2 sia migliore e pertanto sono state scelte queste condizioni sintetiche per effettuare la reazione di ammidazione.

Una volta ottenuto il composto **4**, è stata effettuata la reazione di ossidazione del solfuro a solfossido, mediante l'utilizzo dell'acido peracetico, secondo il seguente schema di reazione (Fig. 3.10).

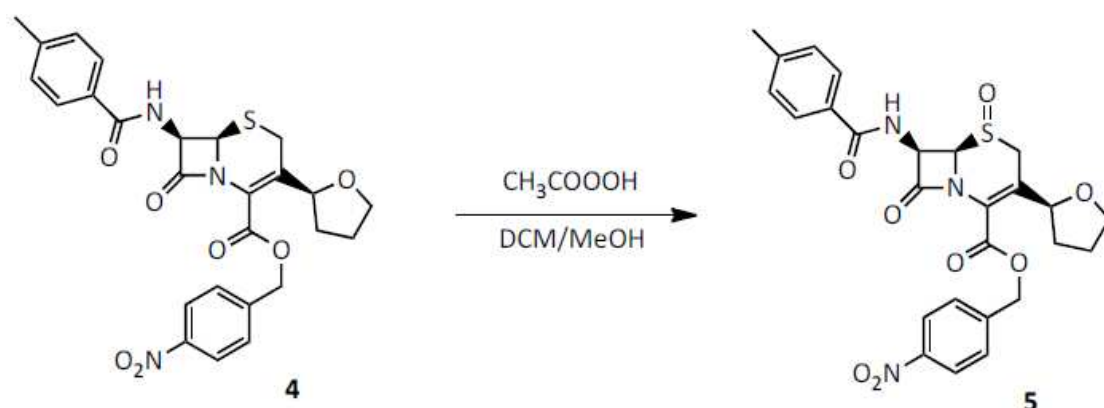


Fig. 3.10: Schema di reazione di ossidazione composto **4**

Ciò si è reso necessario perché il protocollo di epimerizzazione prevede l'utilizzo della base TEA che potrebbe indurre una migrazione del doppio legame endociclico C₂-C₃ in assenza del solfossido. Di fatto questa modifica strutturale riduce la suscettibilità degli idrogeni in α al solfuro all'attacco della base. Anche per l'ossidazione del composto **4** è stato necessario individuare le migliori condizioni di reazione per avere una buona conversione del composto **4** in **5**. Il protocollo che è stato applicato per ossidare il composto **4** ha previsto una temperatura di -20 °C, DCM e metanolo come solventi e uno step di *quenching* con una soluzione di tiosolfato di sodio. È stato fondamentale individuare i corretti equivalenti di acido peracetico necessari per l'ossidazione (Tabella 3).

Tabella 3: Equivalenti acido peracetico

Tentativo	Eq. acido peracetico usati
1	2,3
2	3,4

Il primo tentativo è stato eseguito utilizzando 2,3 equivalenti di acido peracetico. Per il monitoraggio della reazione è stata eseguita un'analisi HPLC. Dal cromatogramma è emerso che vi era ancora del residuo di composto **4**, con tempo di ritenzione a 14,7 min, e la comparsa di un nuovo picco riferibile al composto **5**, con tempo di ritenzione 13,7 min (Fig. 3.11).

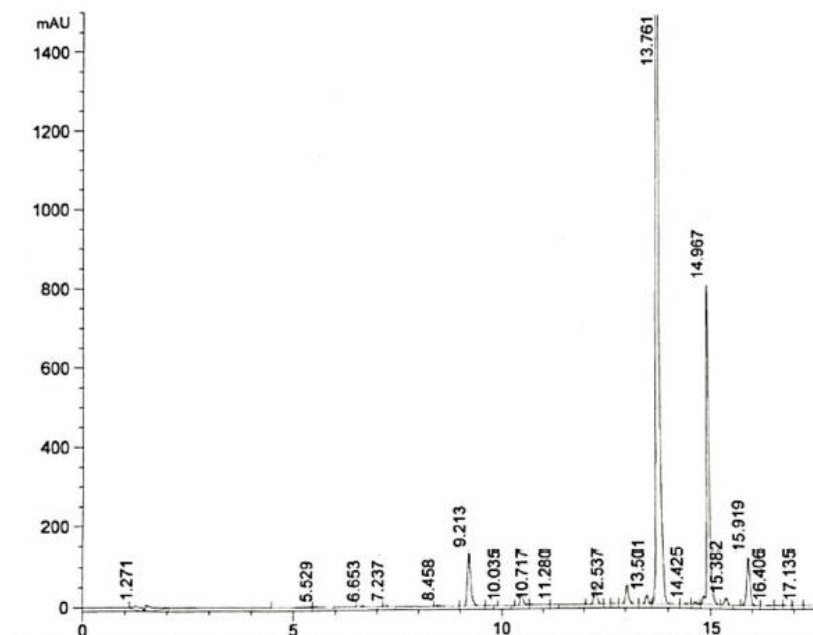


Fig. 3.11: Cromatogramma dopo aggiunta di 2,3 equivalenti di acido peracetico

Nel caso specifico nel primo tentativo la conversione del composto **4** in **5** è stata del 74%; pertanto è stata eseguita un'altra prova in cui sono stati utilizzati 3,4 equivalenti di acido peracetico. In seguito a tale aggiunta dall'analisi HPLC è stato possibile verificare la scomparsa del picco del composto **4**, indice del fatto che la conversione del composto **4** in **5** è stata > 99% (Fig. 3.12).

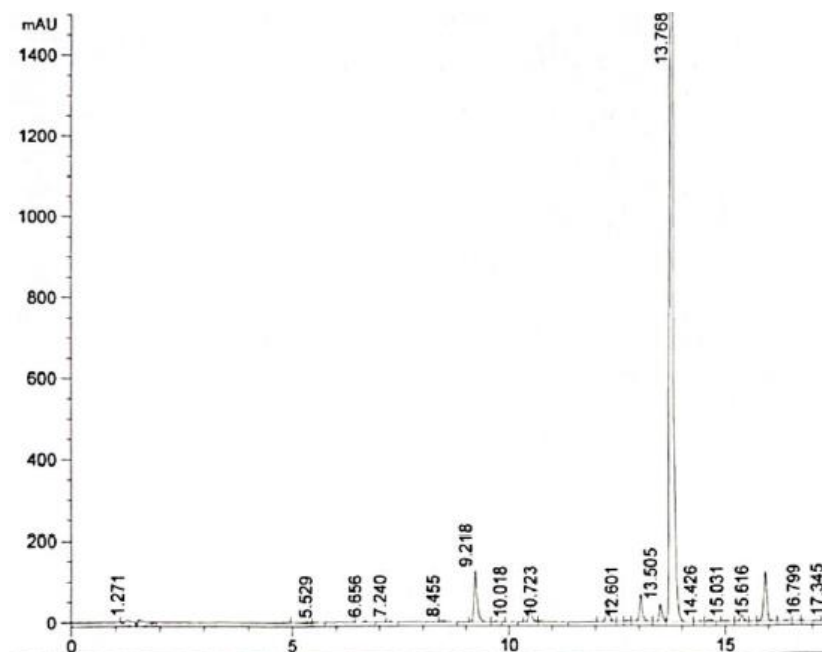


Fig. 3.12: Cromatogramma dopo aggiunta di 3,45 equivalenti di acido peracetico

Una volta ottenuto il composto **5** è stato applicato il protocollo di epimerizzazione, che ha previsto l'impiego di 0,05 equivalenti di trifenilfosfina (PPh_3), usata come

catalizzatore, 2,80 equivalenti di trietilammina (TEA) e 1,40 equivalenti di trimetilclorosilano (TMCS), secondo il seguente schema di reazione (Fig. 3.13).

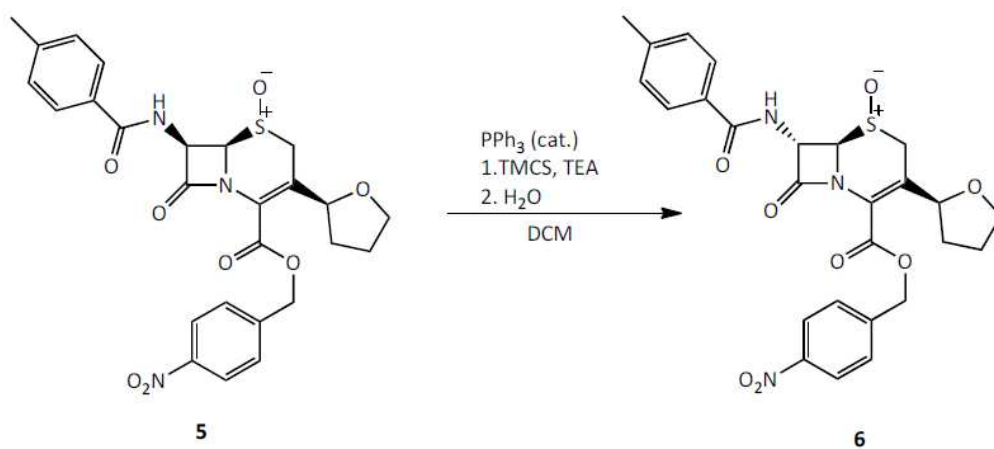


Fig. 3.13: Schema di reazione di epimerizzazione composto **5**

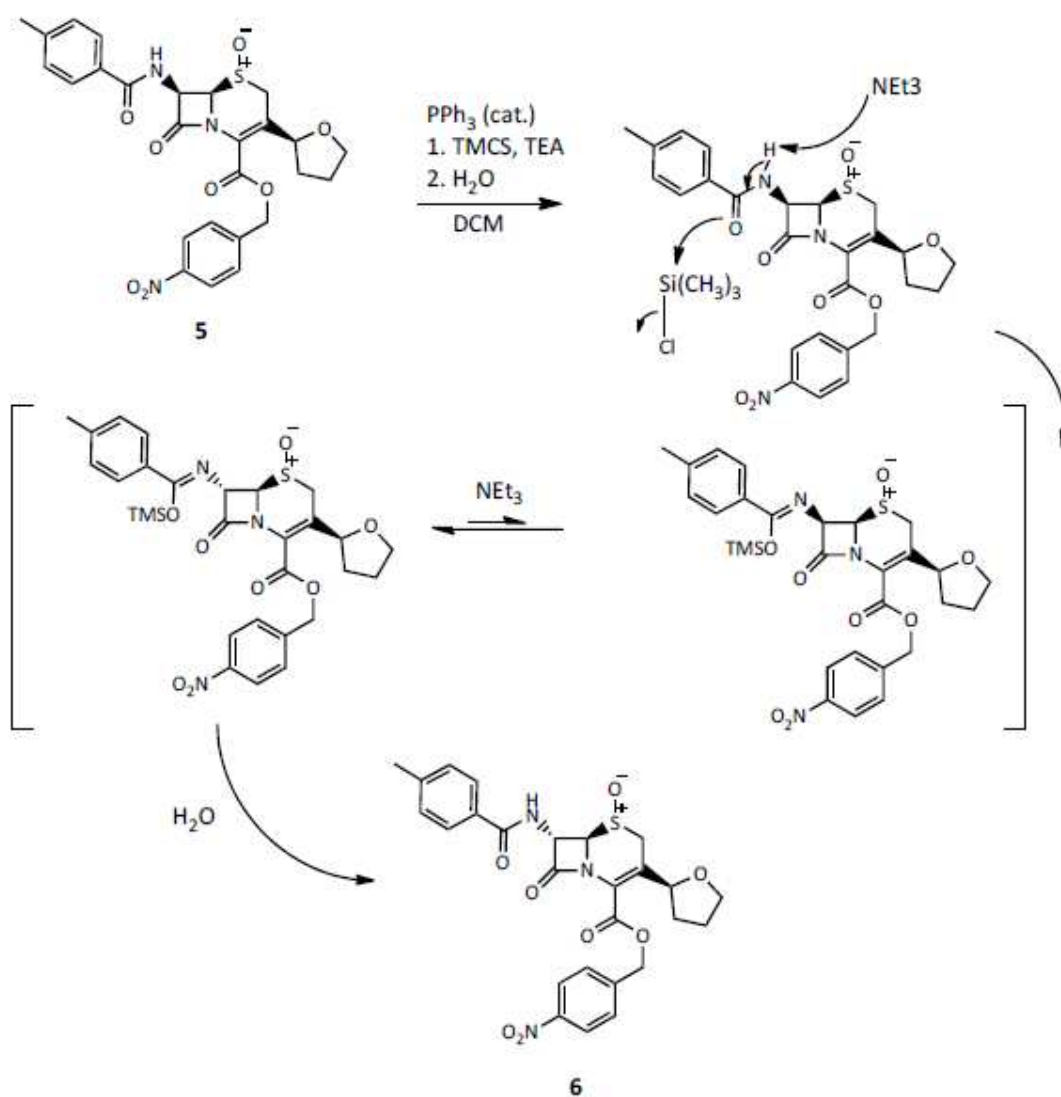


Fig. 3.14: Ipotetico meccanismo di epimerizzazione composto **5**

La reazione è stata eseguita in DCM sotto flusso di azoto, seguendo una sequenza ben definita di aggiunte. Inizialmente, viene caricata la PPh_3 a temperatura ambiente. Successivamente, la temperatura viene abbassata fino a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per poi aggiungere in ordine prima la TEA e successivamente il TMCS. La miscela di reazione viene quindi mantenuta a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ per 3 ore. Successivamente la temperatura viene portata a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ e la miscela di reazione mantenuta in agitazione per altre 2 ore. Mediante analisi HPLC è stato eseguito il monitoraggio della reazione. Tuttavia, tale procedura non ha consentito di ottenere altri prodotti di interesse, al contrario è avvenuto il completo recupero del substrato di partenza.

Alla luce dei risultati ottenuti, sono state apportate delle piccole variazioni al protocollo sintetico:

- prova 1: inversione dell'ordine di aggiunta di TEA e TMCS.
- prova 2: utilizzo di 1 equivalente di PPh_3 .
- prova 3: esecuzione della reazione in assenza di PPh_3 .

Tuttavia, nessuna di queste modifiche ha portato alla formazione dell'isomero **6**. Si è quindi concluso che gli effetti sterici ed elettronici del composto **5** ostacolano l'applicazione di questa metodologia per lo scopo previsto.

3.2.2 Reazione con LDA

La seconda strategia sintetica ha previsto l'utilizzo del litio diisopropilammide (LDA), una base estremamente forte in grado di deprotonare il substrato. Prima di procedere con la reazione con l'LDA è stato necessario preparare il composto **5** con la procedura precedentemente descritta. La reazione è stata condotta in tetraidrofurano (THF), ed impiegando una soluzione 2M di LDA in THF, commercialmente disponibile. In questa prova, è stato impiegato 1 equivalente di LDA per favorire la deprotonazione dell'azoto dell'ammide del composto **5**, secondo il meccanismo ipotizzato e riportato nella figura 3.15.

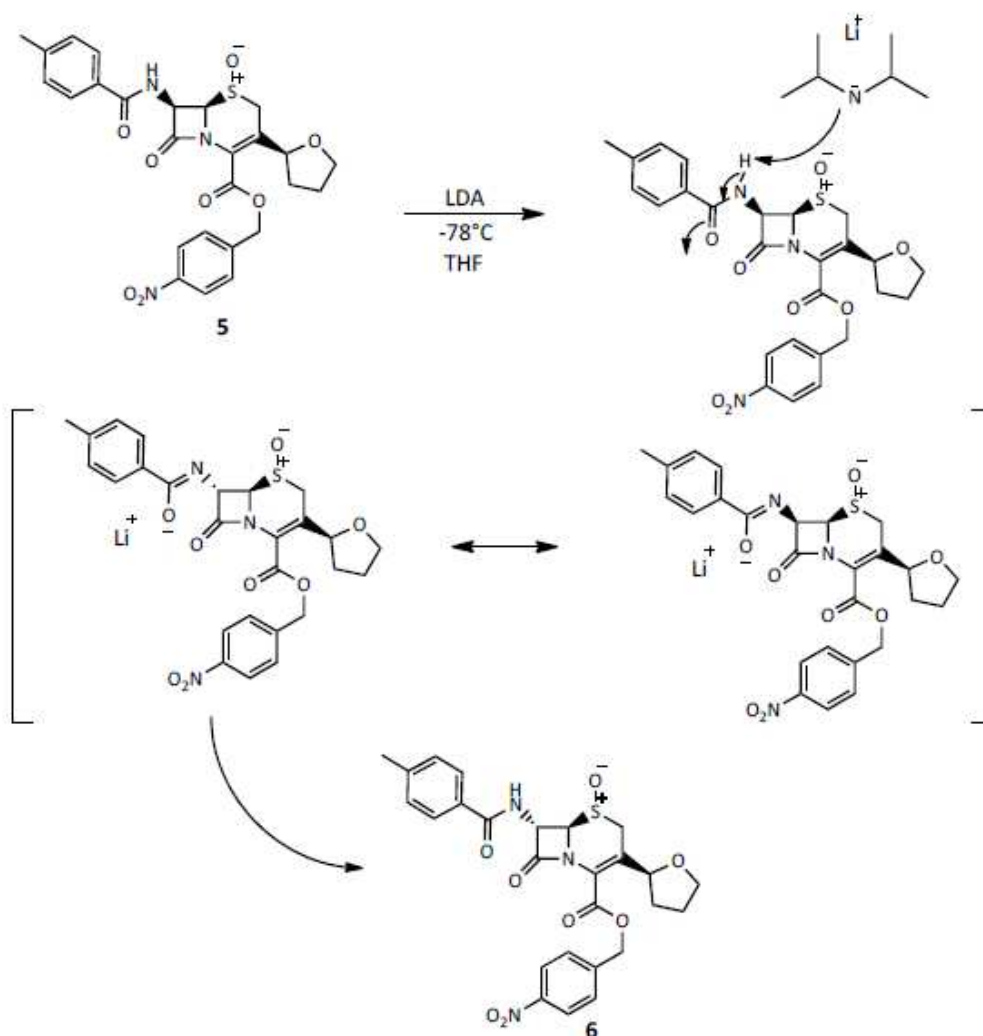


Fig. 3.15: Schema di reazione e ipotetico meccanismo di reazione con LDA

Data la forte reattività dell'LDA con l'acqua, la reazione è stata eseguita in condizioni anidre, sotto flusso di azoto e a -78 °C. Il *quenching* è stato effettuato mediante aggiunta di una soluzione di cloruro di ammonio. La principale difficoltà riscontrata nell'applicazione di questa strategia è stata la scarsa solubilità del composto **5** in THF. Inoltre, l'elevata reattività dell'LDA sembra aver causato la degradazione del substrato e la mancata formazione dell'isomero **6** desiderato. Di conseguenza, questa strategia è stata considerata inefficace e quindi abbandonata.

3.2.3 Reazione con catalizzatore di Shvo

La terza strategia sintetica ha previsto l'impiego del catalizzatore di Shvo (*fig. 3.16*), un complesso del rutenio con il ciclopentadienone. Questo catalizzatore è utilizzato in reazioni di ossido/riduzione di vari composti chimici, agendo attraverso un meccanismo di trasferimento simultaneo di atomi di idrogeno da e verso il centro metallico.

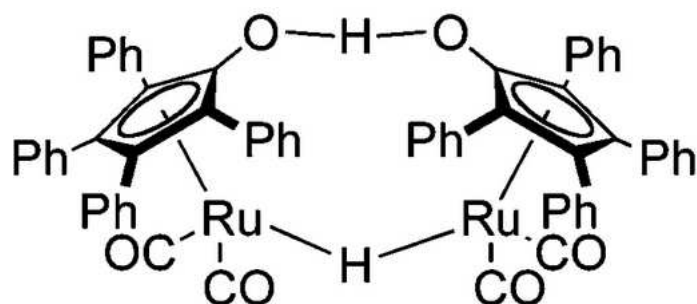


Fig. 3.16: Struttura del catalizzatore di Shvo⁵³

In questo caso, i complessi al rutenio a bassa valenza catalizzano l'idrogenazione per la trasformazione delle immine in ammine e la deidrogenazione per la conversione delle ammine in immine. Queste trasformazioni sono passaggi chiave nella racemizzazione delle ammine. Inoltre l'efficienza di racemizzazione sembra essere migliore quando la reazione è eseguita ad alte temperature⁵⁴. L'ipotetico meccanismo di reazione di questo catalizzatore è riportato nella fig. 3.17.

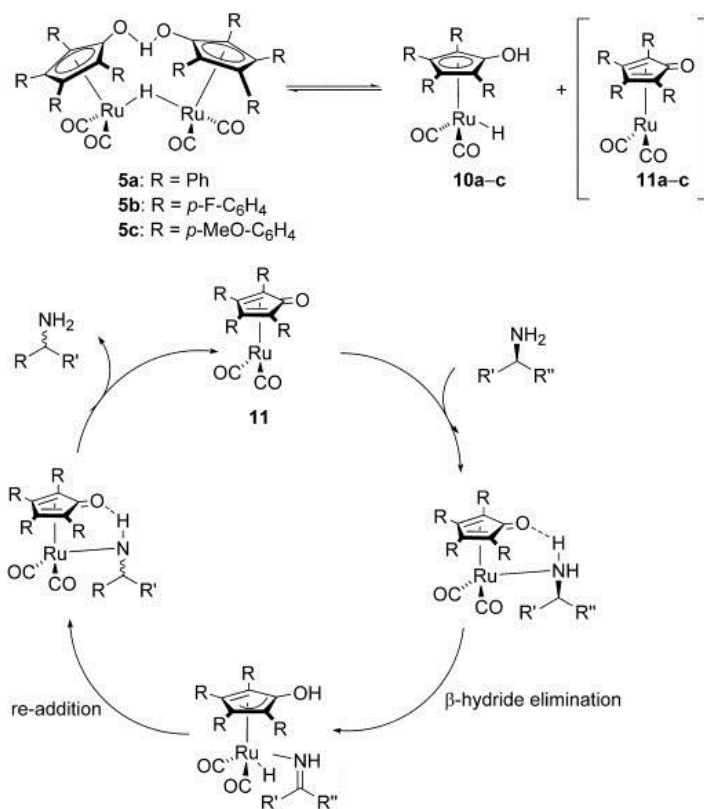


Fig. 3.17: Meccanismo catalizzatore di Shvo⁵⁵

Sulla base delle informazioni trovate in letteratura è stato applicato un protocollo sintetico sul composto **2**, secondo il seguente schema di reazione (Fig. 3.18).

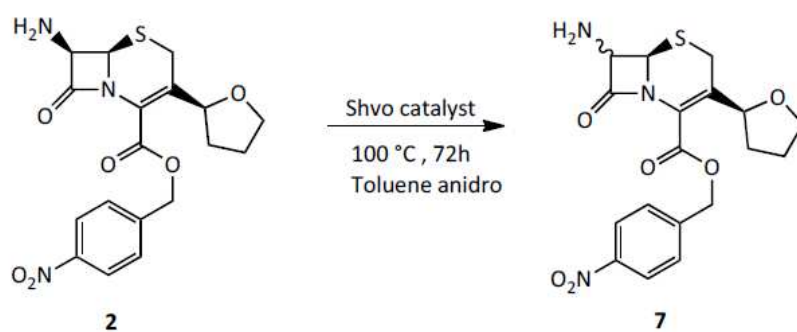


Fig. 3.18: Schema di reazione con catalizzatore di Shvo

La reazione è stata eseguita in condizioni anidre all'interno di un tubo di Schlenk, utilizzando toluene anidro come solvente di reazione. Al composto **2** si aggiungono 0,05 equivalenti di catalizzatore e successivamente il toluene; la miscela di reazione così ottenuta è mantenuta in agitazione a 100 °C per 72 ore. La reazione è stata monitorata ogni 24 ore, mediante analisi HPLC (Fig. 3.19).

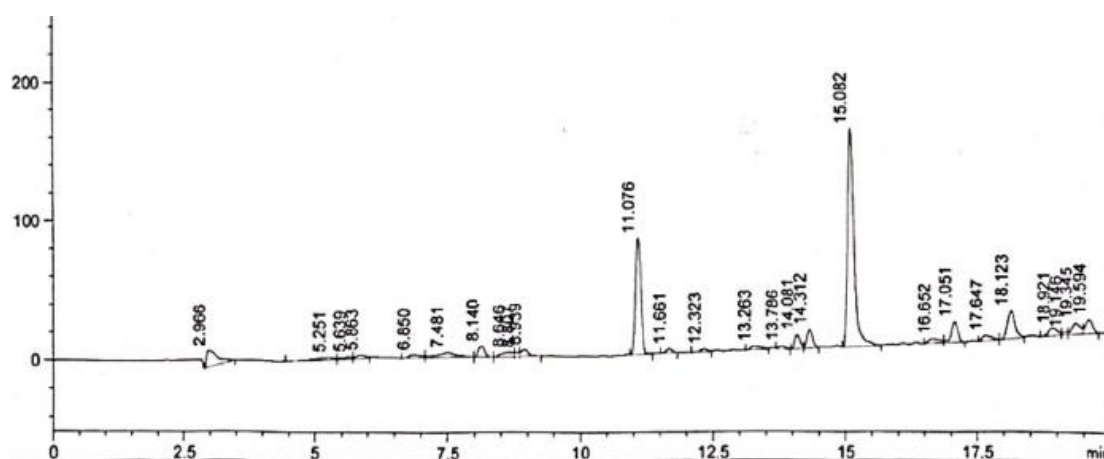


Fig. 3.19: Cromatogramma dopo 72 ore di reazione

Osservando il cromatogramma è possibile individuare il picco riferito al composto **2** con tempo di ritenzione pari a 15,0 min, e due picchi rispettivamente a 14,0 min e 14,3 min. Dall'analisi spettrometrica di massa del grezzo di reazione è emerso che questi due picchi presentano lo stesso peso molecolare del composto **2**. In particolare, il picco con tempo di ritenzione pari a 14,0 min è relativo al composto **3**. Per quanto riguarda invece il picco con tempo di ritenzione pari a 14,3 min, è stato ipotizzato essere un altro isomero del composto **2**; tuttavia, la struttura di questa molecola deve ancora essere definita. Per raggiungere tale scopo sarà effettuato un iniziale *screening* analitico volto a identificare le condizioni migliori per risolvere il picco di interesse, che saranno poi trasferite su scala preparativa, per ottenere una quantità sufficiente per condurre la caratterizzazione completa della molecola.

3.2.4 Aumento della T nello step di formazione dell'imminocloruro

L'ultima strategia sintetica per ottenere l'impurezza **14** ha previsto un'estremizzazione del protocollo di reazione, ovvero un aumento della temperatura nell'ultimo step di sintesi dell'intermedio chiave 7-AMT (*Fig. 3.3*). Come ampiamente discusso in precedenza, un aumento della temperatura di reazione, durante il processo di formazione dell'imminocloruro, potrebbe causare una perdita dell'informazione stereogenica a carico del centro di asimmetria in 7. Questo fenomeno è già stato osservato in altri processi sintetici di cefalosporine, dove l'incremento della temperatura ha causato la formazione dell'epimero con percentuali del 10-15%.

Per applicare questa strategia, è stato necessario convertire l'ammina del composto **2** come sale cloridrato in ammidi mediante una reazione di amidazione con fenil-acetil cloruro secondo il seguente schema di reazione (*Fig. 3.20*).

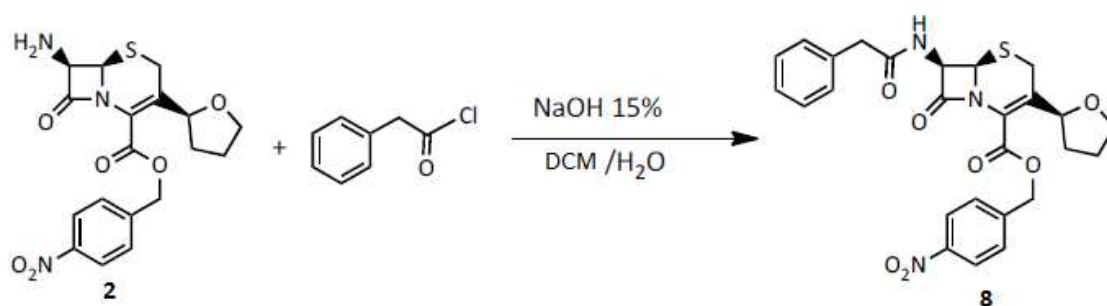


Fig. 3.20: Schema di reazione di amidazione composto 2

Per la reazione di amidazione è stato applicato un protocollo già in uso in ACS Dobfar che prevede l'impiego di una miscela di DCM – acqua come solventi di reazione, 2,6 equivalenti di fenil-acetil-cloruro e NaOH al 15% per tamponare il pH di reazione e mantenerlo intorno al 7. Il protocollo inoltre prevedeva di eseguire la reazione a temperatura compresa tra 0-2 °C. La conversione del composto **2** in **8** è stata > del 99%. Successivamente, il composto **8** è stato aggiunto ad una soluzione di pentacloruro di fosforo in presenza di piridina a -15 °C. Una volta completata l'aggiunta, la temperatura è stata portata a 32 °C per 3 ore. La reazione è stata monitorata mediante analisi HPLC. L'attenzione è stata principalmente rivolta verso due nuovi picchi:

- picco con tempo di ritenzione pari a 11,10 min;
- picco con tempo di ritenzione pari a 11,94 min.

Tuttavia, accanto a questi picchi è stata osservata anche una crescente degradazione del composto **2** (*fig. 3.21*).

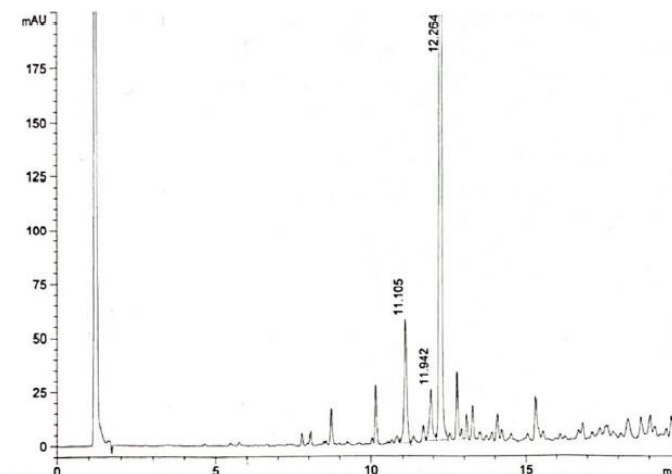


Fig. 3.21: Cromatogramma analisi dopo 3 ore a 32 °C

E' stata quindi effettuata la successiva reazione di alcol-lisi con isopropanolo a -25°C. L'analisi spettrometrica di massa del campione di questa prova ha permesso di attribuire a questi due nuovi picchi lo stesso peso molecolare del composto **2**; tuttavia, il composto con tempo di ritenzione pari a 11,10 min si è rivelato essere il composto **3**. Per quanto riguarda invece il picco che cade a 11,94 min per poter comprendere la sua natura sarà necessario sottoporre il grezzo di reazione ad una purificazione mediante cromatografia preparativa al fine di poter isolare una quantità sufficiente della molecola e quindi caratterizzarla mediante analisi NMR.

3.3 Sintesi dell'isomero *E* dell'ossima del Cefovecin

La configurazione *Z* dell'ossima del Cefovecin (**9**) è stabilita dalla geometria dell'agente acilante MAEM, impiegato per introdurre la catena laterale in posizione 7 della cefalosporina. L'isomero con configurazione *E* (**10**) dell'ossima si suppone che possa formarsi in condizioni acide anidre o mediante una reazione di fotocatalisi. Poiché il composto **10** può formarsi esclusivamente nel prodotto finito **9**, la sua sintesi è stata ottenuta partendo direttamente dal composto **9** mediante una reazione di fotocatalisi. (Fig. 3.22).

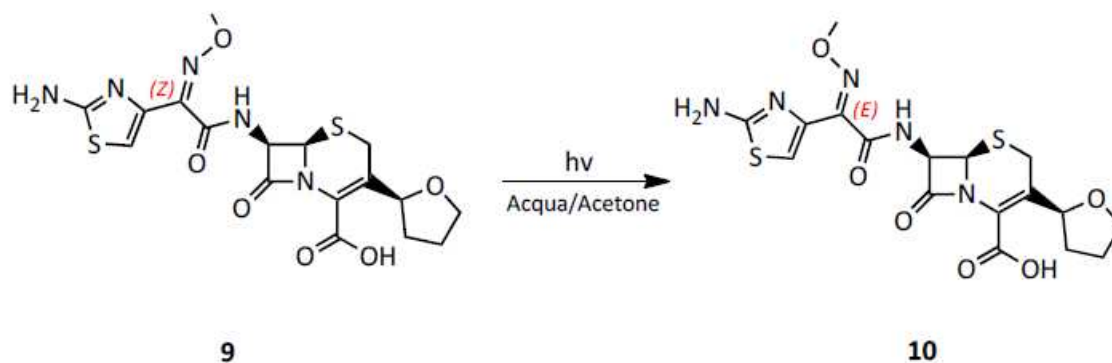


Fig. 3.22: Isomerizzazione ossima del composto **9**

Per la sintesi del composto **10** mediante fotocatalisi, è stata utilizzata la lampada Rayonet (Helios Italquartz s.r.l.) con una lunghezza d'onda di 254 nm, selezionata in funzione del massimo d'assorbimento della molecola.

Sono state eseguite due prove preliminari su piccola scala per individuare le condizioni di reazione migliori e per valutare la stabilità della molecola:

- Prova 1: una soluzione del composto **9** con concentrazione pari a 10^{-3} mol/L in una miscela di acqua/acetone. La scelta di utilizzare questa miscela di solventi per la reazione non è casuale ma è correlata alle conoscenze del processo di sintesi del composto **9** che di fatto si esegue in una miscela di acqua/acetone con il seguente rapporto 20:80;
- un letto di polvere del composto **9**;

La soluzione di reazione è stata posta in una provetta in quarzo, mentre la polvere su vetro di orologio; quindi, entrambi sono stati alloggiati all'interno dello strumento per l'irraggiamento. La reazione di fotocatalisi è stata condotta per 5 ore monitorando l'isomerizzazione attraverso analisi HPLC ogni 30 minuti. Durante le varie analisi è risultato evidente che l'isomerizzazione di **9** nel campione solido era più lenta rispetto a quella ottenuta nel campione in soluzione. Si è supposto che nella soluzione di **9**, in seguito ad irraggiamento, vi sia in gioco una maggiore quantità di energia cinetica che porta ad una conversione maggiore nell'isomero E, rispetto a quello che si verifica nel campione allo stato solido. Pertanto l'attenzione si è focalizzata sull'isomerizzazione in soluzione. Dalle analisi in HPLC è emerso che già dopo 30 minuti di esposizione vi è la presenza di un nuovo picco, che si è supposto essere riferito al composto **10** (Fig. 3.23).

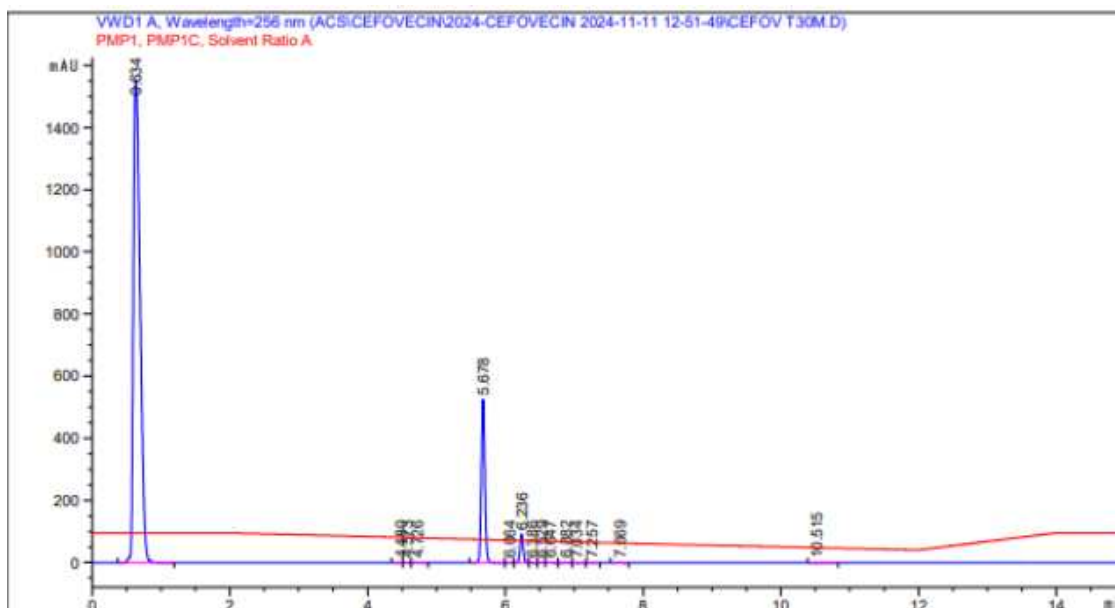


Fig. 3.23: Cromatogramma dopo 30 minuti da inizio reazione

Osservando le percentuali di conversione nella *Tabella 4* di seguito riportata è possibile individuare, dopo 4 ore di reazione, il raggiungimento di un plateau di conversione:

Tabella 4: Percentuale di conversione nel tempo

Tempo	% composto 9 (RT: 5,6 min)	% composto 10 (RT: 6,2 min)
30 min	86,4	1,6
60 min	73,1	26,9
90 min	68,3	31,7
120 min	63,4	36,6
3h	59,2	40,8
4h	58	42
5h	57	43

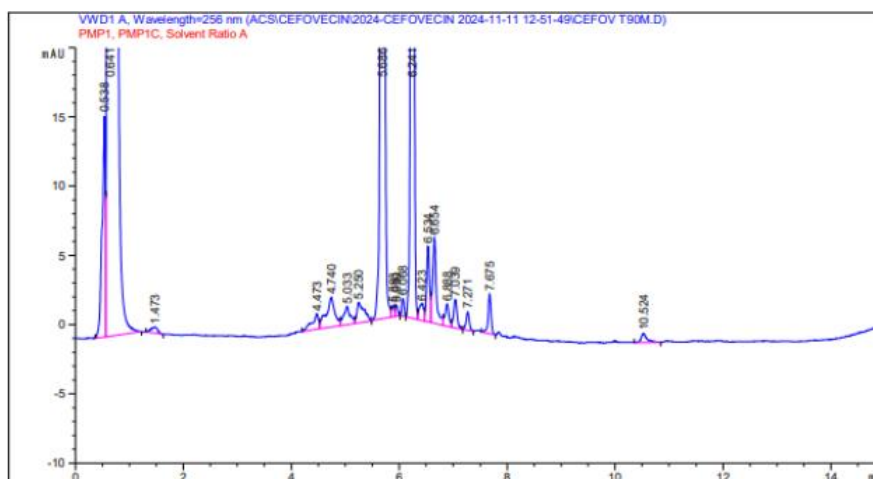


Fig. 3.24: Cromatogramma dopo 90 minuti da inizio reazione

Osservando il profilo cromatografico dopo 90 minuti di esposizione si è notato un inizio di degradazione. Inoltre, da questa prova preliminare emerge che dopo 3-4 ore di esposizione si verifica una conversione nel composto **10** del 40%. Sulla base di queste informazioni è stata quindi eseguita una prova su scala maggiore, preparando una soluzione di composto **9** con una concentrazione pari a 10^{-3} mol/L in una miscela di acqua e acetone (20:80). La soluzione ottenuta è stata successivamente suddivisa in 16 provette in quarzo da alloggiare all'interno dello strumento per l'irraggiamento. La reazione di fotocatalisi è stata eseguita per 4 ore, portando ad una conversione del composto **9** in **10** del 42,3%. La purificazione del campione è stata eseguita mediante cromatografia liquida preparativa ad alta prestazione (prep-HPLC), impiegando un approccio in gradiente di concentrazione riportato nella *Tabella 5*.

Tabella 5: Gradiente di concentrazione della fase mobile

Fase A	Fase B
95	5
60	40
95	5
95	5

La fase mobile A è stata preparata a partire da una soluzione di acetato di ammonio 1 M, ed in particolare sono stati prelevati 52 mL di questa soluzione e miscelati in 1 L di acqua. Mentre per la fase mobile B è stato utilizzato acetonitrile. Prima di procedere con la purificazione è stato necessario allontanare la maggior quantità possibile di acetone dal

grezzo di reazione mediante evaporazione a pressione ridotta. Il grezzo è stato quindi sottoposto a purificazione in sei corse preparative. Ad ogni corsa preparativa lo strumento elabora un cromatogramma con i tempi di ritenzione dei vari componenti della miscela e le relative frazioni separate (Fig. 3.25).

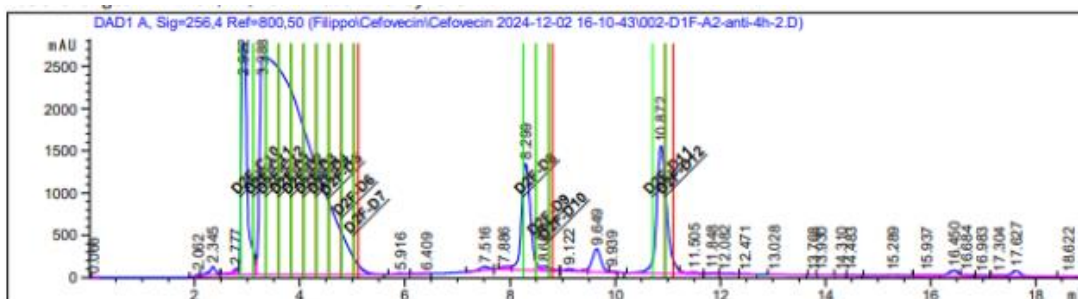


Fig. 3.25: Cromatogramma preparativa

Il composto **10** ha un tempo di ritenzione pari a 10,87 min; tutte le frazioni relative a quel picco sono quindi state raccolte e riunite in un unico pallone. Le analisi NMR e MS hanno confermato l'ottenimento del composto desiderato.

3.4 Design of Experiments (DoE)

Il *Design of Experiments* (DoE) è una metodologia statistica utilizzata per pianificare, condurre e analizzare esperimenti in modo sistematico ed efficiente. Grazie alla sua capacità di ottimizzare i processi e ottenere risultati affidabili con un numero ridotto di prove, il DoE trova applicazione in numerosi settori, tra cui chimica, ingegneria e farmacologia, affermandosi come uno strumento essenziale nella ricerca moderna. I principali obiettivi del DoE sono:

- l'identificazione dei fattori critici: permette di determinare le variabili che influenzano maggiormente la risposta del sistema, come la resa di un processo chimico;
- l'ottimizzazione delle condizioni di processo: permette di definire i parametri operativi ideali per migliorare efficienza, qualità o resa;
- la valutazione delle interazioni: permette di comprendere come la variazione di una variabile possa influenzare l'effetto di un'altra, un aspetto spesso trascurato negli approcci sperimentali tradizionali;
- la minimizzazione del numero di esperimenti: permette di sfruttare un approccio strutturato per analizzare più fattori contemporaneamente, minimizzando il numero di prove necessarie senza compromettere la qualità dei risultati.

A seconda dell'obiettivo e della complessità del sistema, si possono adottare diversi modelli di DoE, tra cui: *DoE fattoriale completo*, il quale consente di identificare tutti gli effetti principali e le interazioni tra i fattori; *DoE fattoriale frazionario*, che riduce il numero di esperimenti selezionando solo un sottoinsieme delle combinazioni possibili; o *metodologia della superficie di risposta* (RSM) la quale viene utilizzata per ottimizzare una risposta quando si sospetta una relazione non lineare tra i fattori.⁵⁶

3.5 Applicazione del DoE alla reazione di idrogenazione in flow

Per valutare la fattibilità della reazione di deprotezione riportata in figura 3.26 utilizzando un reattore per chimica in flusso (H-Cube® Mini Plus ThalesNano) è stato utile condurre uno studio di *Design of Experiments* (DoE).

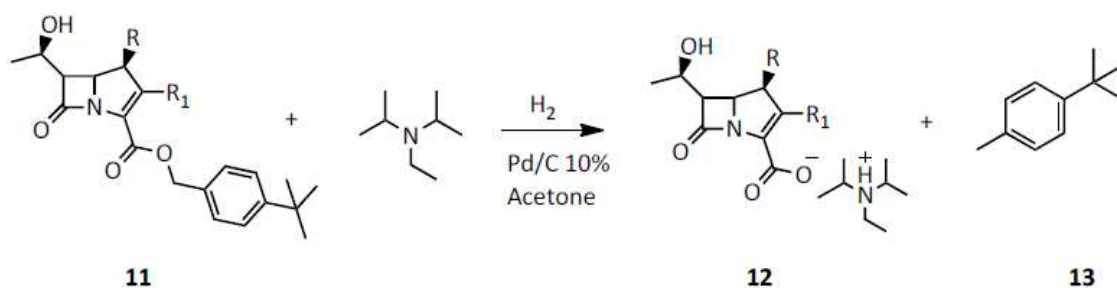


Fig. 3.26: Schema di reazione effettuata in flow

Un DoE si articola in due fasi principali: la fase di *Design*, dedicata alla progettazione del piano sperimentale, e la fase di *Analysis*, incentrata sull'analisi numerica dei dati raccolti. Se la fase di analisi fornisce risultati positivi, si può accedere a una terza fase, in cui il modello ottenuto viene impiegato per prevedere il comportamento delle variabili di risposta in condizioni non testate direttamente durante gli esperimenti. Nel dettaglio, il DoE si è reso utile per definire quella zona di spazio in cui la resa di reazione e la purezza del prodotto di interesse **12** raggiungono i risultati migliori. Per il seguente studio è stato utilizzato il programma MODDE di Umetrics sia per la progettazione del DoE che per l'analisi dei dati. Il primo passo nella progettazione del DoE è stato individuare gli obiettivi da raggiungere applicando questa metodica:

- identificare le condizioni di reazione migliori al fine di ottenere la completa conversione di **11** in **12**, quindi la resa di reazione;
- definire la purezza del processo di idrogenazione.

Tuttavia, prima di passare agli step successivi della progettazione è stato necessario effettuare una serie di prove preliminari al fine di verificare che la reazione potesse essere

eseguita con lo strumento di cui si disponeva e di comprendere i *range* operativi dei vari fattori su cui impostare il DoE.

Per le prove preliminari, i parametri di reazione sono stati selezionati considerando sia le informazioni derivanti dal processo in batch sia le caratteristiche dello strumento utilizzato. Nello specifico, questa reazione di idrogenazione in batch è solitamente condotta a basse temperature (0 °C) per preservare la stabilità del prodotto. Tuttavia, l'H-Cube non dispone di un sistema di raffreddamento, pertanto, si è optato per impostare la temperatura di lavoro a 25 °C, il minimo valore consentito dallo strumento.

Per quanto riguarda invece la velocità del flusso è stata selezionata una velocità pari a 0,7 ml/min. La scelta è stata ritenuta compatibile con la stabilità del substrato e il tempo di contatto del substrato con il catalizzatore. La pressione impostata per queste prove, invece, è stata di 40 bar. Sulla base delle informazioni ottenute dal processo in batch, questa reazione deve essere condotta in presenza della base N,N-Diisopropiletilammina (DIPEA); tuttavia, è stata effettuata una prova preliminare senza questo reagente per valutare se la sua presenza fosse determinante anche nella reazione in flow, sia in termini di resa che di stabilità del prodotto **12**.

Tabella 6: Risultati delle prove preliminari

Prova	Presenza DIPEA	Resa di reazione	Rapporto area 12/13
<i>1</i>	NO	14%	7,7
<i>2</i>	SI	39%	11
<i>3</i>	SI	35%	9,4
<i>4</i>	SI	35%	9,6

Le prove preliminari sono state condotte nelle stesse condizioni di reazione ossia utilizzando una temperatura di 25 °C, una velocità di flusso pari a 0,7 ml/min e una pressione di 40 bar. Nella prova 1, la reazione è stata effettuata in assenza di DIPEA, mentre le prove 2, 3 e 4 sono state eseguite per valutare la ripetibilità del processo utilizzando lo strumento H-Cube. Dai risultati ottenuti nelle prove preliminari è emerso che:

- la base DIPEA è determinante anche nella reazione in flow, sia in termini di resa che di stabilità del prodotto **12**. In tal senso si è supposto che la base stabilizzi il composto **12** e sposti l'equilibrio di reazione verso i prodotti;

- osservando i valori relativi al rapporto delle aree **12/13** si è stabilito che per avere una buona purezza di processo di idrogenazione tale rapporto deve essere compreso tra 9 e 10.

Dopo aver completato le prove preliminari, si è passati al secondo step della progettazione, ovvero l'identificazione dei fattori di variabilità, ossia quei fattori che nel corso degli esperimenti vengono variati. Nel caso specifico sono stati selezionati i tre fattori relativi ai parametri di reazione: temperatura, pressione e velocità di flusso.

Tabella 7: Fattori di variabilità

Fattori	Unità di misura	Range di lavoro	Precisione
Temperatura	°C	da 25 a 51	1
Velocità di flusso	ml/min	da 0,2 a 1,8	0,1
Pressione	bar	da 20 a 80	1

Il range di lavoro viene scelto in fase di progettazione e indica l'intervallo dei valori che nella fase sperimentale vengono testati. Tale range tiene conto delle caratteristiche e della stabilità del composto **11** e **12**. All'interno di tale range poi vi sono i punti centrali ossia quei valori di temperatura, velocità di flusso e pressione che si trovano nel centro dei range selezionati; nel caso specifico sono stati: 38 °C, 1 ml/min e 50 bar. I punti centrali sono così chiamati perché di fatto sono equidistanti dai valori massimi e minimi di ciascun intervallo di lavoro. Per quanto riguarda la temperatura, il valore minimo selezionato è stato 25 °C, ossia il valore di temperatura più basso raggiungibile dallo strumento H-Cube, in quanto privo di sistemi di raffreddamento. Il valore massimo, invece, è stato fissato a 51 °C, al fine di esplorare un intervallo di temperatura sufficientemente ampio per lo studio. La precisione è invece relativa alle caratteristiche intrinseche dello strumento nell'impostare i vari parametri; nel caso specifico per i parametri di temperatura e pressione non era possibile impostare cifre decimali ma solo cifre intere.

Lo step successivo consiste nella definizione delle risposte, ovvero le variabili dipendenti da misurare, essenziali per il raggiungimento degli obiettivi del piano sperimentale. Nel caso specifico, due sono state le risposte individuate ossia:

- la percentuale di **11** residua a fine reazione;

- il rapporto tra l'area di **12** e l'area di **13**. La scelta di valutare questo rapporto è dettata dall'instabilità del composto **12**; pertanto minore è il rapporto tra le aree di **12** e **13** maggiore è la degradazione del composto **12** e quindi minore è la purezza del processo di idrogenazione.

Una volta definiti i fattori di variabilità e le risposte da misurare, è stato necessario sviluppare il protocollo sperimentale per l'esecuzione degli esperimenti, tenendo conto sia delle caratteristiche dello strumento sia del protocollo di reazione utilizzato nel processo in batch. La scelta del solvente di reazione è stata basata sulle informazioni provenienti dal protocollo in batch, individuando nell'acetone il solvente più adatto. Inoltre, considerando che la reazione in batch viene condotta a basse temperature, si è ritenuto opportuno raccogliere la soluzione idrogenata in un pallone mantenuto a temperatura controllata. Per la cartuccia impaccata di catalizzatore, è stata utilizzata quella contenente Pd/C al 10%. Data la similitudine tra le tuberie dell'H-Cube® Mini Plus e quelle di un normale sistema HPLC, al fine di prevenire eventuali intasamenti, si è scelto di preparare la soluzione del composto **11** con una concentrazione pari a 0,05 M.

Il protocollo ha inoltre previsto un ciclo di condizionamento dello strumento prima dell'esecuzione degli esperimenti e un ciclo di lavaggio delle tuberie prima dello spegnimento dell'H-Cube. In entrambi i casi, i solventi utilizzati sono stati: una miscela di acqua e isopropanolo (1:1) e successivamente acetone.

Per quanto riguarda il monitoraggio della reazione è stato impiegata l'HPLC opportunamente calibrato con gli standard del composto **11** e **13**. Per ogni esperimento sono state eseguite due analisi:

- analisi al t₀, ossia prima dell'idrogenazione;
- analisi di fine reazione. In particolare l'analisi di fine reazione è stata fondamentale per calcolare la quantità di composto **11** residuo e la purezza di reazione sfruttando il rapporto delle aree tra **12** e **13**.

Una volta definiti tutti questi aspetti, il software MODDE ha generato il piano sperimentale ossia il numero degli esperimenti da eseguire, con le relative condizioni di reazione e l'ordine di esecuzione dei vari esperimenti.

Tabella 8: Esperimenti generati da MODDE

N° esperimento	Nome esperimento	Ordine esecuzione	Temperatura (°C)	Velocità di flusso (ml/min)	Pressione (bar)
1	N1	1	25	0,2	20
2	N2	2	51	0,2	20
3	N3	5	25	1,8	20
4	N4	4	51	1,8	20
5	N5	11	25	0,2	80
6	N6	3	51	0,2	80
7	N7	7	25	1,8	80
8	N8	10	51	1,8	80
9	N9	8	38	1	50
10	N10	6	38	1	50
11	N11	9	38	1	50

Di fondamentale importanza è l'ordine di esecuzione degli esperimenti; parte della riproducibilità e affidabilità dei risultati dipende da questo aspetto.

Tabella 9: Risultati ottenuti per ciascun esperimento

N° esperimento	Nome esperimento	Percentuale residua di 11	Rapporto aree 12/13
1	N1	45,21	8,5
2	N2	15,96	7,07
3	N3	70,6	9,6
4	N4	52,77	9,2
5	N5	11,15	7,5
6	N6	12,91	5,26
7	N7	75,96	8,96
8	N8	28,74	8,3
9	N9	45,79	7,7
10	N10	42,78	9

Una volta ottenute le risposte per ogni esperimento si passa all'analisi degli esperimenti. Quest'ultima si compone a sua volta di due step:

- l'analisi dei dati grezzi;
- l'analisi del modello; dietro ad un modello ci sono degli assunti matematici e statistici. Parte di questa diagnostica serve innanzitutto per verificare che gli assunti siano verificati e di conseguenza, che il modello sia valido.

L'analisi dei dati grezzi è essenziale e si basa su due valutazioni visive: l'analisi delle repliche e l'analisi della distribuzione delle risposte.

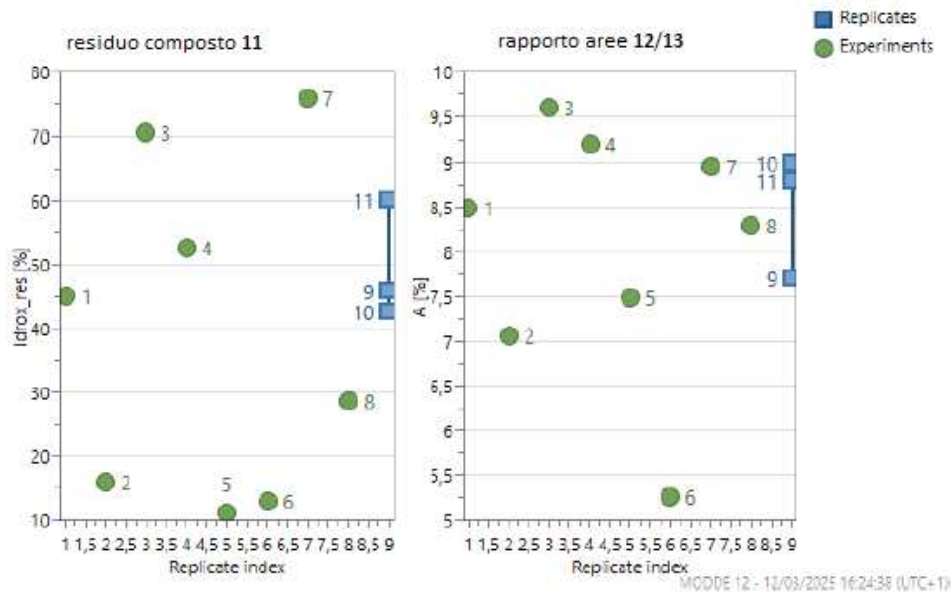


Fig. 3.27: Diagramma a dispersione generato da MODDE

L'analisi visiva può fornire due informazioni: la riproducibilità e la linearità. Come indicato anche da MODDE, i punti centrali, indicati come *replicates*, mostrano una debole riproducibilità, per entrambe le risposte. Una scarsa riproducibilità può portare a un modello debole o più semplicemente, farà risultare che tutti i fattori non sono significativi, in quanto l'effetto si nasconde sotto la variabilità non controllata. Osservando i grafici si può confermare che l'assunto di linearità è verificato in quanto i punti centrali, pur essendo un po' ampi, si collocano al centro dello *scatterplot*. Per quanto non rigoroso, è un indizio di linearità.

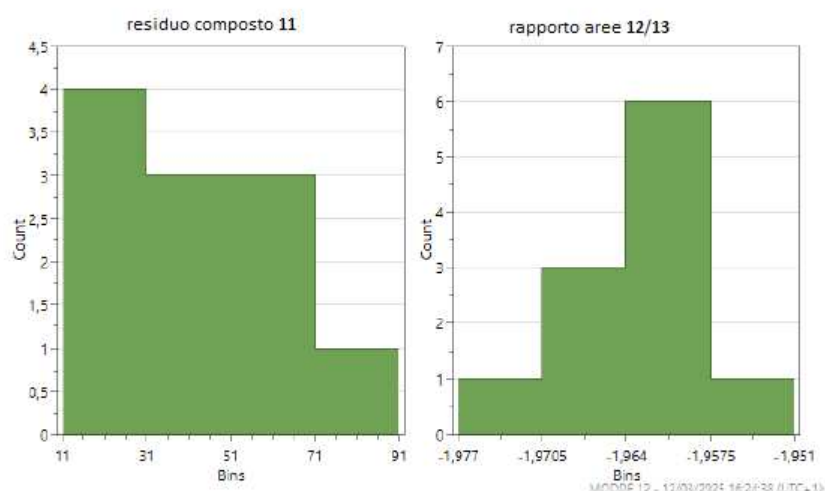


Fig. 3.28: Istogrammi generati da MODDE

I grafici riportati in figura 3.28 permettono di visualizzare invece la distribuzione delle risposte. Tale distribuzione deve essere normale, ossia gaussiana la quale di base è simmetrica ed è uno degli assunti del modello. Tuttavia MODDE effettua un test di ipotesi verificando la simmetria della distribuzione. Se in tale test MODDE verifica che la simmetria fallisce segnala che l'assunto di normalità non è rispettato e propone di trasformare la variabile risposta. Nel caso della resa, l'istogramma relativo al residuo del composto **11**, pur non essendo visibilmente simmetrica, il test di simmetria è stato superato. Nel caso della purezza, l'istogramma relativo al rapporto aree **12/13**, invece non è rispettato l'assunto di normalità ed infatti la risposta è stata trasformata in una scala logaritmica negativa; pertanto l'istogramma relativo alla purezza è la distribuzione trasformata.

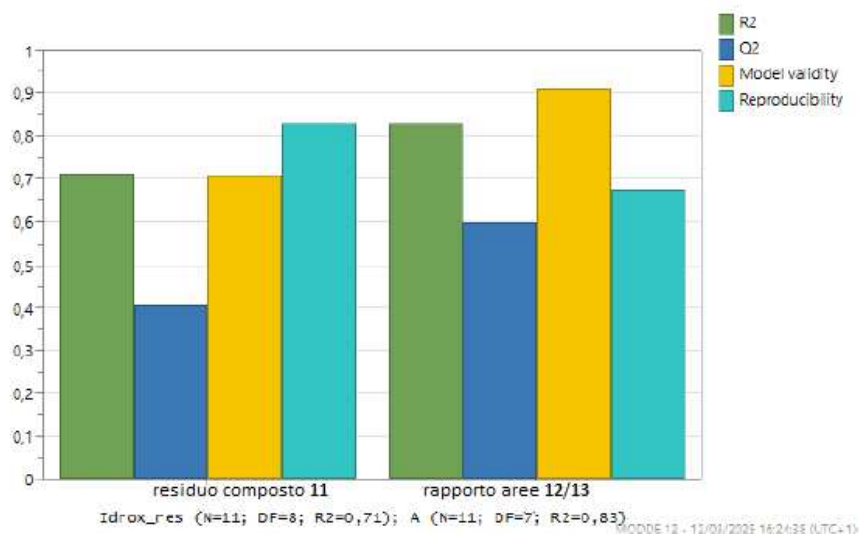


Fig. 3.29: Istogramma del summary of fit generato da MODDE

Il *Summary of Fit* è una caratteristica riassuntiva propria di MODDE. L'istogramma verde rappresenta R^2 ossia l'indice di adattabilità del modello. L'istogramma blu è invece il Q^2 , più noto come R^2 predittivo. Il Q^2 è sempre minore di R^2 , tuttavia, la differenza non deve essere indicativamente maggiore di 0,2. Nel caso della prima risposta (residuo composto **11**) ciò non è rispettato. Questo significa che il modello ha deboli caratteristiche predittive. L'istogramma giallo rappresenta il *Model validity* ed è una metrica propria di MODDE e riassume diversi parametri statistici in un unico indice. In generale se il *Model validity* è minore di 0,25 il modello non si adatta ai dati. Nel caso specifico, nonostante le considerazioni emerse, MODDE non rifiuta il modello. L'istogramma turchese rappresenta invece la riproducibilità che come già evidenziato precedentemente non è eccellente.

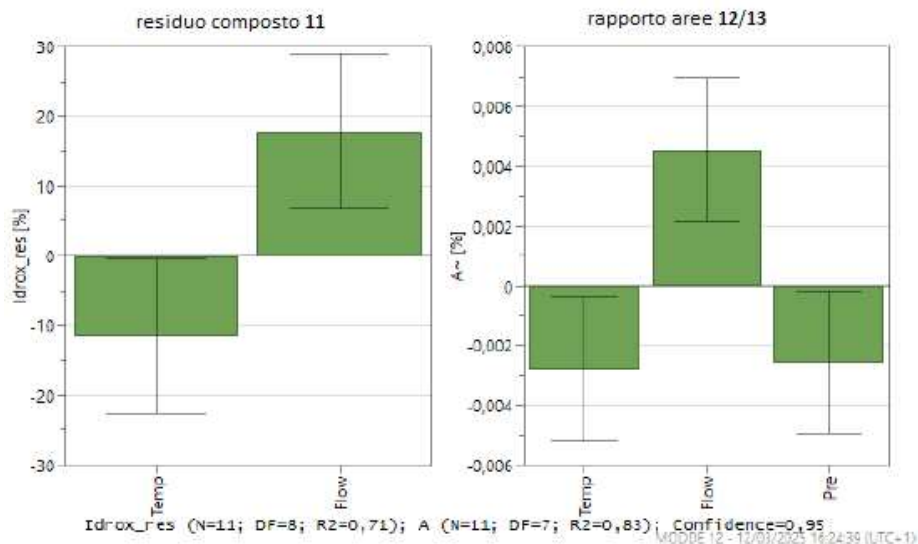


Fig. 3.30: Diagramma dei coefficienti generato da MODDE

Il diagramma dei coefficienti, opportunamente filtrato, rappresenta i fattori e le relative interazioni significativamente influenti; in altre parole il loro effetto supera la variabilità intrinseca non controllata. I segmenti neri rappresentano invece la variabilità non controllata e rappresentata anche dall'ampiezza delle repliche, ossia i punti centrali. Gli istogrammi verdi invece rappresentano gli effetti; più questi sono ampi rispetto al segmento nero, più l'effetto è significativo.

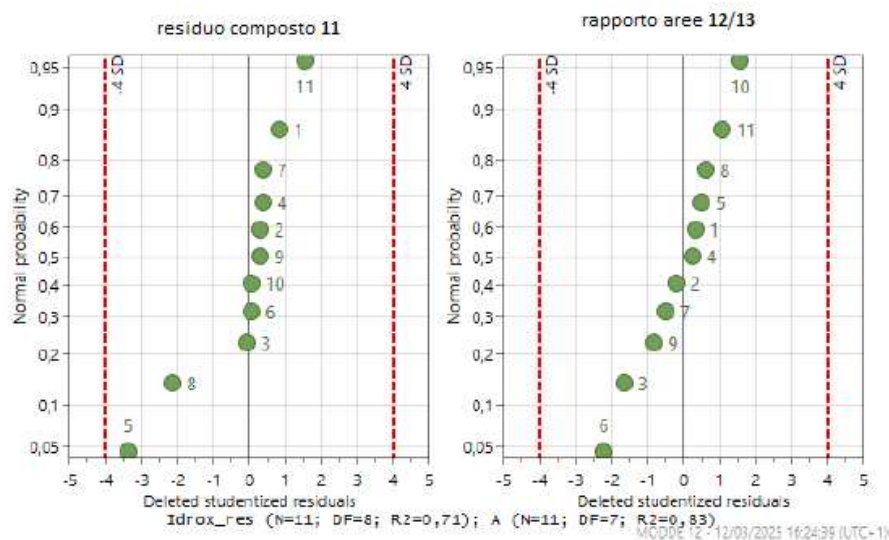


Fig. 3.31: Diagramma valori outlier generato da MODDE

Il diagramma in figura 3.31 permette di visualizzare eventuali punti anomali che potrebbero influenzare negativamente la retta di regressione. MODDE considera *outlier* tutti i punti che distano più di 4 deviazioni standard dalla media della risposta. Nel caso specifico non è stata eliminata nessuna osservazione.

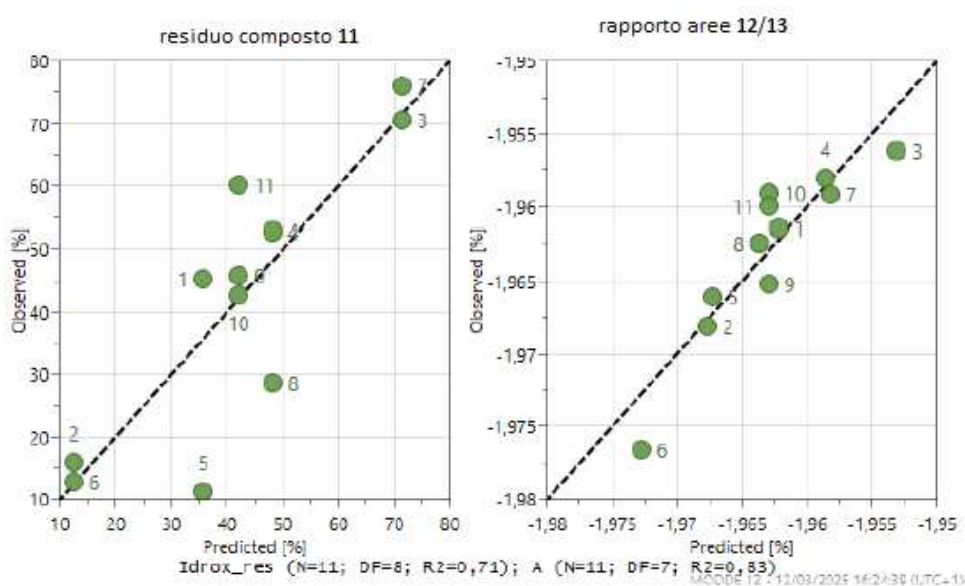


Fig. 3.32: Grafico della retta di regressione predittiva del modello generato da MODDE

La retta riportata nei seguenti grafici rappresenta la retta di regressione predittiva del modello che nel caso specifico è un modello lineare. Un modello con forte potere predittivo avrebbe i punti molto vicini alla retta. Osservando i due diagrammi è possibile notare come il diagramma riferito alla resa (residuo composto **11**) abbia un profilo

peggiore rispetto a quello riferito alla purezza (rapporto aree **12/13**). Non a caso il valore di Q^2 della prima risposta è inferiore rispetto al valore del Q^2 della seconda risposta.

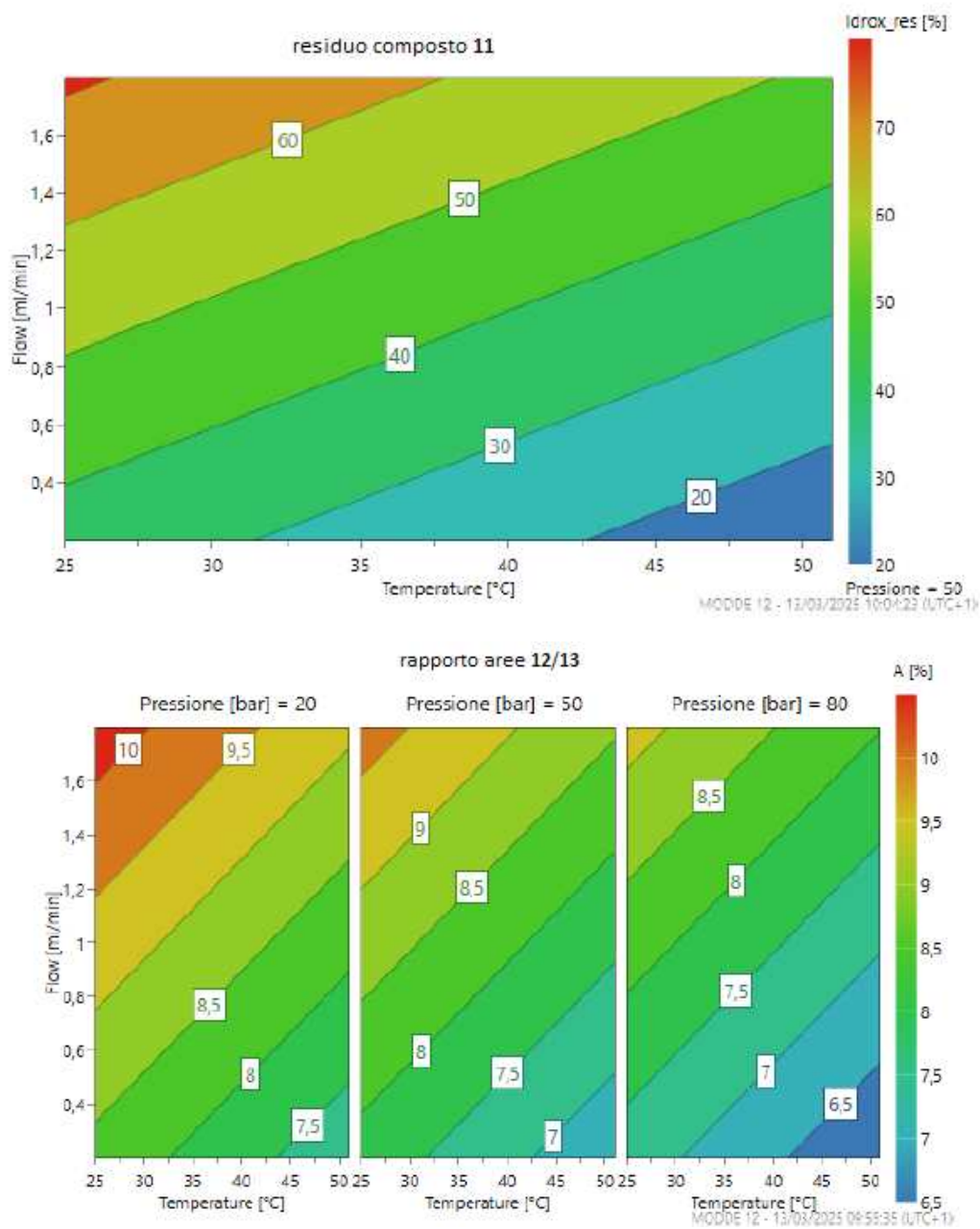


Fig. 3.33: Counterplot generati da MODDE

I *counterplot* rappresentano l'andamento delle risposte condizionatamente ai fattori. Come già ampiamente argomentato il modello, soprattutto quello relativo alla prima risposta (residuo composto **11**), ha poco potere predittivo, quindi la probabilità di errore non è trascurabile.

In generale il DoE ha fornito come risultati due principali predizioni a seconda dell'obiettivo che si vuole raggiungere:

- se l'obiettivo è avere un elevato grado di purezza di reazione di idrogenazione, quindi un rapporto di area tra **12/13** intorno a 9-10, le condizioni di reazione che devono essere applicate sono alta velocità di flusso 1.8 ml/min, 25 °C e 20 bar; di fatto per il raggiungimento di tale obiettivo il DoE ha permesso di comprendere che la pressione non è un parametro influente;
- se l'obiettivo è avere un'elevata resa di reazione, quindi una migliore conversione di **11** in **12**, le condizioni di reazione sono totalmente diverse dalle precedenti, infatti, è necessario lavorare a bassa velocità di flusso 0.2 ml/min, 50 °C e pressione 20 bar.

Sulla base di questi due risultati forniti dal DoE sono state eseguite due prove in flow:

- **prova A:** in questa prova sono state utilizzate le condizioni di reazione migliori per ottenere un elevato grado di purezza di reazione di idrogenazione ossia 1,8 ml/min come velocità di flusso, 25 °C e 20 bar;
- **prova B:** in questa prova sono state utilizzate le condizioni di reazione migliori per raggiungere valori di resa di reazione elevata, ossia 0,2 ml/min come velocità di flusso, 50 °C e 20 bar.

Entrambe le prove sono state eseguite in ricircolo continuo e il monitoraggio della reazione è stato eseguito mediante analisi in HPLC ogni 30 min.

*Tabella 10: Risultati della prima **prova A***

Tempo	Rapporto aree 12/13	Residuo composto 11
30 min	9,4	52,49 %
60 min	9,5	39,24 %
90 min	9,2	27,59 %
2 h	9,1	25,88 %
2h e mezza	9,4	24,14 %

L'analisi dei risultati della prova A ha confermato la previsione del DoE, secondo cui per ottenere un elevato grado di purezza, espresso come rapporto delle aree **12/13**, è necessario operare a velocità di flusso elevate (1,8 ml/min) e alla temperatura più bassa consentita dallo strumento (25 °C). La pressione, invece, si è rivelata un fattore

ininfluente per il raggiungimento di questo obiettivo. Inoltre, è stata confermata anche la previsione secondo cui tali condizioni di reazione non avrebbero permesso la completa conversione del composto **11** nel composto **12**, ossia la resa di reazione.

*Tabella 11: Risultati della **prova B***

Tempo	Rapporto aree 12/13	Residuo composto 11
30 min	7,9	21,54 %
60 min	7,1	17,84 %
90 min	6,8	14,80 %
2 h	6,1	12,71 %
2h e mezza	5,8	11,75 %

L'analisi dei risultati della prova B ha confermato che le condizioni ottimali per massimizzare la conversione del composto **11** in composto **12**, e quindi la resa di reazione, sono una bassa velocità di flusso (0,2 ml/min), una temperatura di 50 °C e una pressione di 20 bar. È stato inoltre verificato che queste condizioni determinano una riduzione della purezza del processo, poiché il rapporto tra le aree **12** e **13** risulta inferiore alla soglia ottimale compresa tra 9 e 10.

4. Conclusioni

Questo progetto di tesi ha previsto la sintesi e la caratterizzazione strutturale di alcune impurezze del Cefovecin per rispondere a richieste regolatorie. Nel dettaglio lo studio si è focalizzato sugli elementi di asimmetria del Cefovecin e i suoi relativi isomeri.

In base alla loro elevata probabilità di formazione, già osservata in altri processi di sintesi di cefalosporine analoghe, l'attenzione si è rivolta all'epimero in posizione 7 (**14**), il regisomero del doppio legame endociclico (**3**) e l'isomero *E* (**10**) dell'ossima del Cefovecin. I composti **14** e **3** coinvolgono la molecola 7-AMT, in quanto la loro formazione è strettamente correlata alle condizioni sintetiche che portano alla formazione di tale intermedio. Per quanto riguarda invece l'isomero **10** la sintesi è stata effettuata a partire dal Cefovecin, in quanto l'isomerizzazione dell'ossima può avvenire esclusivamente nel prodotto finito ed è correlata alla stabilità della molecola stessa.

La sintesi e la caratterizzazione dei composti **3** e **10** sono state eseguite con successo. Per quanto riguarda invece la sintesi dell'epimero **14** sono state valutate 4 diverse strategie sintetiche; tra queste due si sono rivelate promettenti ossia la reazione con il catalizzatore di Shvo e l'estremizzazione del protocollo di *cleavage* utilizzato dell'ultimo step di sintesi del 7-AMT. Entrambe le strategie hanno permesso di ottenere dei sottoprodotti con peso molecolare uguale al 7-AMT, che si suppone essere degli isomeri della molecola, i quali tuttavia devono ancora essere caratterizzati strutturalmente. In futuro sarà necessario condurre ulteriori prove e identificare i protocolli di purificazione adeguati per poter isolare e quindi caratterizzare gli isomeri ottenuti e comprenderne la struttura chimica.

Nella seconda fase del mio percorso di tesi è stata valutata la fattibilità di un processo di idrogenazione mediante l'utilizzo di un reattore per chimica in flusso, l'H-Cube[®] Mini Plus (ThalesNano). In particolare, è stata analizzata la possibilità di eseguire una reazione di deprotezione, attualmente eseguita in batch, sfruttando i vantaggi offerti dalla tecnologia a flusso continuo. Per l'identificazione delle giuste condizioni di reazione è stato effettuato uno studio di *Design of Experiments* (DoE). Questo approccio ha permesso di individuare le condizioni ottimali di reazione, tra cui velocità di flusso, temperatura e pressione, per massimizzare la resa del prodotto idrogenato, impiegando questa nuova tecnologia. I risultati ottenuti dal DoE hanno permesso di capire che lo strumento utilizzato non si adatta al nostro substrato in quanto la riproducibilità è risultata

trascurabile. Si è ipotizzato che questi risultati poco soddisfacenti siano correlabili alla *life-time* della cartuccia contenente il catalizzatore, la quale durante l'utilizzo perde in efficienza. Saranno necessari in futuro ulteriori studi per ottimizzare il processo in flow.

.

5. Parte sperimentale

Le procedure sono proprietà intellettuale di ACS Dobfar, vengono quindi riportate in questa sezione in modo non dettagliato.

5.1 Materiali e strumenti

I solventi, reattivi e reagenti sono stati acquistati presso le ditte Merck (Milano), Carlo Erba Reagents Srl (Milano) e TCI Europe (Svizzera). Per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastre Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Milano). Come rivelatore è stato utilizzato l'apparecchio Spectroline Model CM-10A, munito di lampada a radiazione ultraviolette ($\lambda = 254$ e 366 nm). Per la purificazione dei composti mediante cromatografia *flash* è stato utilizzato gel di silice (Merck, Milano) 230-400 *mesh*, 60 Å. Per l'evaporazione a pressione ridotta dei solventi di reazione è stato utilizzato l'evaporatore rotante Büchi Rotavapor R-100. Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati a 300 MHz con apparecchio Bruker 300 (Germania), impiegando TMS come standard interno ($\delta = 0,00$ ppm) ed un BBI 5mm probe. Le molteplicità del segnale sono state così indicate: s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto) e m (multipletto). Per le analisi di massa è stato utilizzato lo strumento Thermo LXQ Ion Trap. Per la reazione di idrogenazione in flow è stato utilizzato il reattore H-Cube[®] Mini Plus (ThalesNano); cartridge utilizzata per l'idrogenazione a flusso Pd/C 10%. Per la reazione di fotocatalisi è stata utilizzata la lampada Rayonet (Helios Italquartz s.r.l.). Per la purificazione con cromatografia preparativa è stato utilizzato lo strumento Agilent Preparative system series 1260. Per le analisi HPLC sono stati utilizzati lo strumento Merck e lo strumento Agilent 1100 series, dotato di rivelatore UV DiodeArray, impiegando i seguenti metodi analitici:

- a) Colonna LiCrospher[®] RP-18 Endcapped, 250 mm x 4 mm, 5 μ m, $\lambda = 205$ nm, temperatura 25 °C. Fase mobile A: 1 mL acido ortofosforico 85% in 1000 mL di acqua; fase mobile B: Acetonitrile. Flusso: 1 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 25$ min = 20 % $\rightarrow$ 95 %; 25 min $\rightarrow$ 25,1 min = 95 % $\rightarrow$ 20 %; 25,1 min $\rightarrow$ 30 min = 20 %
- b) Colonna Gemini C18, 100 mm x 4.6 mm, 3 μ m, $\lambda = 254$ nm, temperatura: 25 °C. Fase mobile A: 10 mM fosfato di potassio dibasico, pH = 3.5; fase mobile B: Acetonitrile : Acqua (95:5). Flusso: 1 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 20$ min = 5% $\rightarrow$ 100%; 20 min $\rightarrow$ 20,1 min = 100% $\rightarrow$ 5%; 20,1 min $\rightarrow$ 25 min = 5%

- c) Colonna LiCrosphere 100 RP-18 endcapped, 250mm x 4.6 mm, 5 μ m, λ = 220 nm, temperature: 25°C. Fase mobile A: Acido fosforico 0,1% in acqua; fase mobile B: Acetonitrile. Flusso: 1 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 20$ min = 5% $\rightarrow$ 100 %; 20,1 min $\rightarrow$ 25 min = 100%
- d) Colonna Sunfire waters, 150 mm x 30 mm i.d., 5 μ m, λ = range 256 nm, temperatura: 30 °C. Fase mobile A: 52 ml di soluzione di solfato di ammonio acetato 1M in 1000 mL di acqua; fase mobile B: Acetonitrile. Flusso: 30 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 16$ min = 5% $\rightarrow$ 40 %; 16,1 min $\rightarrow$ 17 min = 40 % $\rightarrow$ 5%; 17,1 min $\rightarrow$ 19 min = 5%
- e) Colonna Waters xbridge, 50 mm x 4.6 mm, 2,5 μ m, λ = 256 nm, temperatura: 25°C. Fase mobile A: 0,1% TFA in acqua; fase mobile B: Acetonitrile. Flusso: 1.4 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 2$ min = 5%; 2,1 min $\rightarrow$ 8 min = 5% $\rightarrow$ 60%; 8,1 min $\rightarrow$ 12 min = 60%; 12,1 min $\rightarrow$ 14 min = 60% $\rightarrow$ 5%; 14,1 min $\rightarrow$ 15 min = 5%
- f) Colonna Zorbax SB-Phenyl, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m, λ = 256 nm, temperatura: 25°C. Fase mobile A: 8 g di Acetato di Ammonio in 1000 mL di Acqua; fase mobile B: Acetonitrile. Flusso: 1.0 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 20$ min = 5% $\rightarrow$ 16 %; 20,1 min $\rightarrow$ 30 min = 16% $\rightarrow$ 46%; 30,1 min $\rightarrow$ 36 min = 46% $\rightarrow$ 70%; 36,1 min $\rightarrow$ 45 min = 5%
- g) Colonna LiCrosphere 100 RP-18 endcapped, 250mm x 4.6 mm, 5 μ m, λ = 270,8 nm, temperature: 30 °C. Fase mobile A: 1,0 g di NaH_2PO_4 in 700 mL di acqua + 300 mL di Acetonitrile, pH 4,0 $\pm$ 0,02; Fase mobile B: Acetonitrile; Flusso: 1 mL/min. Gradiente: B% $t_0 \rightarrow 5$ min = 0%; 5,1 min $\rightarrow$ 24 min = 0% $\rightarrow$ 70%; 24,1 min $\rightarrow$ 29 min = 70% ; 29,1 min $\rightarrow$ 30 min = 70% $\rightarrow$ 0%. Post corsa 15 min con 100% fase mobile A.

5.2 Preparazione composto 3

6 g di **1** vengono sospesi in 640 mL di MeOH; successivamente alla miscela vengono aggiunti 25 g di una soluzione di NaHCO_3 al 7,4% p/p in 10 min. In seguito a tale aggiunta si osserva la completa dissoluzione. In un ora vengono aggiunti 640 mL di acqua. La sospensione viene raffreddata a 3 °C e lasciata ad agitare per 2 ore. Il solido viene filtrato

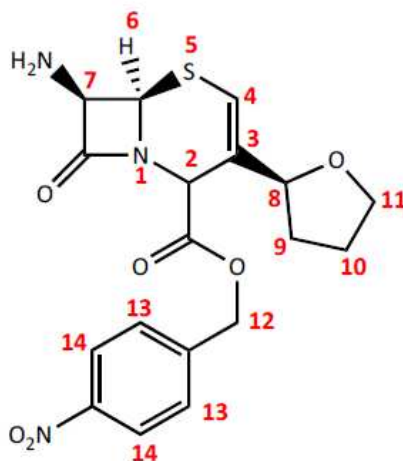
in un Büchner e il *cake* lavato con 192 mL di acqua. Il solido viene essiccato a 40 °C, sotto vuoto per 2 ore. Si ottengono 6,7 g di **2**.

6,7 g di **2** vengono sospesi in 30 mL di DCM. Alla miscela vengono aggiunti 2,5 g di TEA, mantenendo 25 °C. Si lascia la miscela sotto agitazione per 1,5 ore. IPM composto **3**: 30%. Il DCM viene evaporato a pressione ridotta e si ottengono 8 g di **3**. Il solido viene purificato su colonna cromatografica *flash*: fase stazionaria gel di silice, fase mobile etilacetato – cicloesano, gradiente: 60:40, 70:30, 80:20.

m/z: 405.87 [M+H]⁺;

metodo analitico c); RT composto **3** = 11.078 min

metodo analitico g); RT composto **3** = 13.672 min



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.19-8.15 (d, 2H, 2xCH-**14**), δ = 7.47-7.20 (d, 2H, 2xCH-**13**), δ = 6.33 (s, 1H, CH-**4**), δ = 5.20 (s, 2H, CH₂-**12**), δ = 5.10 (s, 1H, CH-**7**), δ = 4.86 (s, 1H, CH-**2**), δ = 4.53 (s, 1H, CH-**6**), δ = 4.38 (t, 1H, CH-**8**), δ = 3.75-3.67 (m, 2H, CH₂-**11**), δ = 2.09-1.62 (m, 4H, CH₂-**9**, CH₂-**10**).

5.3 Preparazione composto **6** con PPh₃, TEA e TMCS

10 g di **1** vengono sospesi in 80 ml di H₂O e la temperatura viene abbassata fino a 0-2 °C. Il pH viene corretto con una soluzione di NaOH 15% fino a pH 6,5-8, successivamente vengono aggiunti 50 ml di DCM. Alla miscela vengono aggiunti 4,58 g di para-tolil-cloruro monitorando il pH e correggendolo alla neutralità con NaOH 15%. La miscela viene separata in imbuto separatore e il DCM viene fatto evaporare a pressione ridotta. Si ottengono 10 g di un olio **4**.

10 g di **4** vengono sospesi in una miscela di 50 ml di DCM e 32 ml di MeOH. La temperatura viene abbassata fino a -20 °C e alla soluzione vengono aggiunti goccia a goccia 4,9 g di acido peracetico. Dopo 15 min la temperatura viene alzata a quella ambiente e alla miscela viene aggiunta una soluzione satura di sodio tiosolfato per il quenching dei perossidi. La miscela è stata separata in imbuto separatore e la fase organica viene fatta evaporare a pressione ridotta. Si ottengono 10 g di **5**.

10 g di **5** vengono sciolti in 50 ml di DCM e lasciati a miscelare a temperatura ambiente. Alla miscela vengono aggiunti 240 mg di PPh₃ e viene abbassata la temperatura a -5 °C. Alla miscela vengono aggiunti 5,29 g di TEA e 2,82 g di TMCS. In seguito all'aggiunta del TMCS la miscela ha cambiato colore passando da arancione a nero. La temperatura viene abbassata fino a -20 °C e la miscela viene lasciata a miscelare per 3 ore. Successivamente la temperatura viene alzata fino a -10 °C e lasciata a miscelare per altre 2 ore. Alla miscela vengono aggiunti 50 ml di DCM e 50 ml di H₂O; il pH della miscela viene portato alla neutralità utilizzando una soluzione 3 M di HCl. Si effettua la separazione in imbuto separatore e la fase organica viene fatta evaporare a pressione ridotta.

metodo analitico b); RT composto **5** = 13,726 min

5.4 Preparazione composto **6** con LDA

20 g di **1** vengono sospesi in 120 ml di H₂O e la temperatura viene abbassata fino a 0-2 °C. Il pH viene corretto con una soluzione di NaOH 15% fino a pH 6,5-8, successivamente vengono aggiunti 100 ml di DCM. Alla miscela vengono aggiunti 9,15 g di para-tolil-cloruro monitorando il pH e correggendolo alla neutralità con NaOH 15%. La miscela viene separata in imbuto separatore e il DCM viene fatto evaporare a pressione ridotta. Si ottengono 20 g di un olio **4**.

20 g di **4** vengono sospesi in una miscela di 110 ml di DCM e 65 ml di MeOH. La temperatura viene abbassata fino a -20 °C e alla soluzione vengono aggiunti goccia a goccia 10 g di acido peracetico. Dopo 15 min la temperatura viene alzata a quella ambiente e alla miscela viene aggiunta una soluzione satura di sodio tiosolfato per il quenching dei perossidi. La miscela è stata separata in imbuto separatore e la fase organica viene fatta evaporare a pressione ridotta. Si ottengono 28,7 g di **5**.

5,6 g di **5** vengono sospesi in 30 mL di THF sotto flusso di azoto. La temperatura viene abbassata fino a -78 °C. Alla miscela sono poi vengono aggiunti goccia a goccia 4,2 g di LDA. Terminata l'aggiunta a -78 °C viene effettuato il *quenching* preparando una soluzione satura di cloruro d'ammonio che viene aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione. La soluzione in seguito all'aggiunta di LDA ha cambiato colore passando da arancione a rosa. La temperatura viene alzata fino a quella ambiente e viene effettuata una separazione in imbuto separatore con dietiletere. La fase acquosa viene lavata in tre passaggi mentre la fase organica viene fatta evaporare a pressione ridotta ottenendo un olio.

Metodo analitico b); RT composto **5** = 13,726 min

5.5 Preparazione composto **7** con catalizzatore di Shvo

471,3 mg di **2** vengono pesati e caricati in un tubo di Schlenk assieme a 51,2 mg di catalizzatore di Shvo. Vengono effettuati 3 cicli di vuoto/azoto al fine di rendere l'ambiente di reazione nel tubo di Schlenk anidro. Mediante siringa vengono prelevati e aggiunti 12 ml di toluene anidro. La miscela arancione ottenuta viene riscaldata a 100 °C per 72 ore. Dopo 72 ore il toluene viene fatto evaporare a pressione ridotta.

Metodo analitico b) RT composto **2** = 15,082 min

5.6 Preparazione composto **7** aumentando la T nello step di formazione dell'imminocloruro

10 g di **2** vengono sospesi in una miscela di 120 ml di DCM e H₂O (1:1). La temperatura viene abbassata fino a 0-2 °C e il pH viene corretto con una soluzione di NaOH 15% fino a pH 7,20 - 6,5. Alla miscela vengono aggiunti goccia a goccia 9,09 g di fenil-acetil-cloruro in un'ora monitorando il pH e correggendolo fino alla neutralità con NaOH 15%. La miscela viene separata in imbuto separatore e il DCM viene fatto evaporare a pressione ridotta. Si ottengono 18,2 g di **8**.

5,9 g di **8** vengono sospesi in 60 ml di DCM e aggiunti ad una soluzione di PCl₅ in presenza di piridina sotto flusso di azoto a -15 °C. Dopo 15 min la temperatura viene alzata fino a 32 °C per 3 ore. Dopo 3 ore la temperatura viene abbassata fino a -20 °C; alla miscela vengono aggiunti 17,54 g di isopropanolo goccia a goccia. In seguito

all'aggiunta la temperatura viene alzata fino a quell'ambiente e alla miscela viene aggiunta una soluzione di cloruro di sodio. Il solido viene filtrato su un Büchner e la *cake* lavata con 20 ml di acqua. Il solido è stato essiccato a 30 °C.

Metodo analitico b); RT composto **8** = 12,264 min

5.7 Preparazione composto **10**

160 mg di **9** vengono sciolti con 160 mL di una soluzione contenente 32 mL di acqua e 128 mL di acetone. La soluzione viene divisa in 16 provette di quarzo le quali vengono disposte nell'apposito strumento, Rayonet (Helios Italquartz s.r.l.) per la reazione di fotocatalisi. Si applica una lunghezza d'onda di 254 nm, per 4 ore.

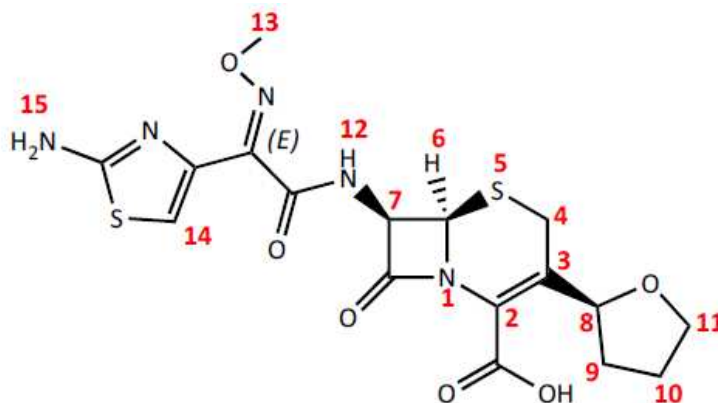
IPM composto **10**: 38-42%. L'acetone viene evaporato a pressione ridotta, ottenendo una soluzione acquosa ricca. Una parte di questa soluzione viene sottoposta a separazione tramite HPLC preparativa. Dopo 6 corse preparative, sono stati isolati alcuni mg del composto **10**, che sono stati liofilizzati sei volte per eliminare l'acetato di ammonio.

m/z: 454.06 [M+H]⁺;

metodo analitico d); RT composto **10** = 10.872 min

metodo analitico e); RT composto **10** = 6.238 min

metodo analitico f); RT composto **10** = 26.058 min



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 13.44 (s, 1H, OH), δ = 9.41-9.390 (d, 1H, NH-12), δ = 7.47 (s, 1H, CH-14), δ = 5.77-5.73 (m, 1H, CH-7), δ = 5.15-5.14 (d, 1H, CH-6), δ = 4.78-4.74 (m, 1H, CH-8), δ = 3.98 (s, 3H, CH-13), δ = 3.93-3.79 (m, 2H, CH₂-11), 3.57-3.44 (m, 2H sistema AB, CH₂-4), δ = 2.14-1.62 (m, 4H, CH₂-9, CH₂-10)

^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.62$ ($\text{CH}_2\text{-S}$), $\delta = 26.40$ [CH_2 (idrofurano)], $\delta = 31.57$ [CH_2 (idrofurano)], $\delta = 58.27$ [CH-O (idrofurano)], $\delta = 59.26$ [CH (β -lattame)], $\delta = 63.35$ (CH_3O), $\delta = 69.04$ [$\text{CH}_2\text{-O}$ (idrofurano)], $\delta = 77.71$ [CH (β -lattame)], $\delta = 116.19$ [CH (tiazolo)], $\delta = 124.12$ (C -alchene- COOH), $\delta = 131.32$ (C -alchene), $\delta = 163.51$ (COOH), $\delta = 164.18$ (CONH), $\delta = 164.43$ [CO (β -lattame)], $\delta = 167.06$ [C-NH_2 (tiazolo)]

5.8 Preparazione composto **12**

534 mg di **11** vengono sospesi in 19,6 g di acetone e lasciati miscelare. Alla soluzione vengono aggiunti 215 μL di DIPEA. La soluzione viene fatta fluire all'interno dell'H-Cube in presenza di H_2 , generata dall'elettrolisi di acqua distillata, e Pd/C al 10%. Per il recupero della soluzione all'interno delle tuberie viene effettuato un lavaggio con 15,7 g di acetone.

Metodo analitico a) RT composto **12** = 6,090 min

6. Bibliografia

1. Abushaheen, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Dis.-Mon. DM* **66**, 100971 (2020).
2. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report for 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-consumption-eueea-esac-net-annual-epidemiological-report-2023> (2024).
3. Bertram G. Katzung. *Farmacologia Generale e Clinica*;
4. Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G. & Barreiro, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112829 (2020).
5. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819856211>.
6. Giusti, M. & Cerutti, E. Antibiotic stewardship programs and the internist's role. *Ital. J. Med.* **10**, 329–338 (2016).
7. 71544355.pdf.
8. Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226–236 (1929).
9. Abraham, E. P. & Chain, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **146**, 837–837 (1940).
10. Rolinson, G. N. & Geddes, A. M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**, 3–8 (2007).
11. Abraham, E. P. & Newton, G. G. F. The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* **79**, 377–393 (1961).
12. Newton, G. G. F. & Abraham, E. P. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem. J.* **58**, 103–111 (1954).
13. Sbaffi, C., Olmastroni, E. & Tragni, E. ANTIBIOTICO-RESISTENZA: CAUSE, CONSEGUENZE, STRATEGIE DI RICERCA E POLITICHE SANITARIE PER CONTRASTARLA.
14. Ho, C. S. *et al.* Antimicrobial resistance: a concise update. *Lancet Microbe* **6**, 100947 (2025).
15. Fernandes, R., Amador, P. & Prudêncio, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. (2013).
16. Majiduddin, F. K., Materon, I. C. & Palzkill, T. G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 127–137 (2002).
17. Harrison, C. J. & Bratcher, D. Cephalosporins: A Review. *Pediatr. Rev.* **29**, 264–273 (2008).
18. Lin, X. & Kück, U. Cephalosporins as key lead generation beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **106**, 8007–8020 (2022).

19. Page, M. G. P. Beta-Lactam Antibiotics. in *Antibiotic Discovery and Development* (eds. Dougherty, T. J. & Pucci, M. J.) 79–117 (Springer US, Boston, MA, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-1400-1_3.
20. Tartaglione, T. A. & Polk, R. E. Review of the new second-generation cephalosporins: cefonicid, ceforanide, and cefuroxime. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **19**, 188–198 (1985).
21. Klein, N. C. & Cunha, B. A. Third-generation cephalosporins. *Med. Clin. North Am.* **79**, 705–719 (1995).
22. Sullins, A. K. & Abdel-Rahman, S. M. Pharmacokinetics of antibacterial agents in the CSF of children and adolescents. *Paediatr. Drugs* **15**, 93–117 (2013).
23. Barriere, S. L. & Flaherty, J. F. Third-generation cephalosporins: a critical evaluation. *Clin. Pharm.* **3**, 351–373 (1984).
24. Okamoto, M. P., Nakahiro, R. K., Chin, A., Bedikian, A. & Gill, M. A. Cefepime: a new fourth-generation cephalosporin. *Am. J. Hosp. Pharm.* **51**, 463–477; quiz 541–542 (1994).
25. Fourth-generation cephalosporins: a review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14642543>.
26. Cho, J. C., Fiorenza, M. A. & Estrada, S. J. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy* **35**, 701–715 (2015).
27. Zhanel, G. G. *et al.* Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs* **69**, 809–831 (2009).
28. Zagursky, R. J. & Pichichero, M. E. Cross-reactivity in β -Lactam Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **6**, 72–81.e1 (2018).
29. Franceschini, F., Caimmi, S., Caffarelli, C., Peroni, D. G. & Crisafulli, G. Le reazioni di ipersensibilità agli antibiotici beta-lattamici.
30. Agency, E. M. ICH Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q7-good-manufacturing-practice-active-pharmaceutical-ingredients-scientific-guideline> (2000).
31. Agency, E. M. ICH M4 Common technical document (CTD) for the registration of pharmaceuticals for human use - organisation of CTD - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m4-common-technical-document-ctd-registration-pharmaceuticals-human-use-organisation-ctd-scientific-guideline> (2004).
32. Agency, E. M. Summary of requirements for active substances in the quality part of the dossier - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/summary-requirements-active-substances-quality-part-dossier-scientific-guideline> (2005).
33. Guideline on Active Substance Master File Procedure.

34. Agency, E. M. ICH Q3B (R2) Impurities in new drug products - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3b-r2-impurities-new-drug-products-scientific-guideline> (2003).
35. Agency, E. M. ICH Q3D Elemental impurities - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3d-elemental-impurities-scientific-guideline> (2022).
36. ICH Q3C (R9) Residual solvents - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3c-r9-residual-solvents-scientific-guideline>.
37. Agency, E. M. ICH Q3A (R2) Impurities in new drug substances - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3a-r2-impurities-new-drug-substances-scientific-guideline> (2002).
38. Agency, E. M. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (2024).
39. Agency, E. M. ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and drug products - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline> (2003).
40. Koenig, S. G. *et al.* A Green Chemistry Continuum for a Robust and Sustainable Active Pharmaceutical Ingredient Supply Chain. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 16937–16951 (2019).
41. Principi della chimica verde. <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/green-chemistry-principles?srsId=AfmBOoo2dynVYFD5UnQm1Qjx5FGIxL-ut5O5f2hJyi84n1z8LBi5zzVy>.
42. Fortunak, J. M. Current and future impact of green chemistry on the pharmaceutical industry. *Future Med. Chem.* **1**, 571–575 (2009).
43. Vaccaro, L., Lanari, D., Marrocchi, A. & Strappaveccia, G. Flow approaches towards sustainability. *Green Chem.* **16**, 3680–3704 (2014).
44. Harmsen, J. Process intensification in the petrochemicals industry: Drivers and hurdles for commercial implementation. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **49**, 70–73 (2010).
45. Heider, P. L. *et al.* Development of a Multi-Step Synthesis and Workup Sequence for an Integrated, Continuous Manufacturing Process of a Pharmaceutical. *Org. Process Res. Dev.* **18**, 402–409 (2014).
46. Britton, J., Majumdar, S. & Weiss, G. A. Continuous flow biocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 5891–5918 (2018).
47. Santis, P. D., Meyer, L.-E. & Kara, S. The rise of continuous flow biocatalysis – fundamentals, very recent developments and future perspectives. *React. Chem. Eng.* **5**, 2155–2184 (2020).

48. Hessel, V. *et al.* Sustainability of flow chemistry and microreaction technology. *Green Chem.* **26**, 9503–9528 (2024).
49. Akwi, F. M. & Watts, P. Continuous flow chemistry: where are we now? Recent applications, challenges and limitations. *Chem. Commun.* **54**, 13894–13928 (2018).
50. J. Cossar, P., Hizartzidis, L., I. Simone, M., McCluskey, A. & P. Gordon, C. The expanding utility of continuous flow hydrogenation. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 7119–7130 (2015).
51. Guidi, M., Seeberger, P. H. & Gilmore, K. How to approach flow chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 8910–8932 (2020).
52. Heterogeneous Catalytic Hydrogenation Reactions in Continuous-Flow Reactors. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cssc.201000354> doi:10.1002/cssc.201000354.
53. Conley, B. L., Pennington-Boggio, M. K., Boz, E. & Williams, T. J. Discovery, Applications, and Catalytic Mechanisms of Shvo's Catalyst. *Chem. Rev.* **110**, 2294–2312 (2010).
54. Pàmies, O., Éll, A. H., Samec, J. S. M., Hermanns, N. & Bäckvall, J.-E. An efficient and mild ruthenium-catalyzed racemization of amines: application to the synthesis of enantiomerically pure amines. *Tetrahedron Lett.* **43**, 4699–4702 (2002).
55. Thalén, L. K. *et al.* A Chemoenzymatic Approach to Enantiomerically Pure Amines Using Dynamic Kinetic Resolution: Application to the Synthesis of Norsertraline. *Chem. – Eur. J.* **15**, 3403–3410 (2009).
56. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström & S. Wold. *Design of Experiments Principles and Applications*.