



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica

Direttore Ch.mo Prof. Mauro Freccero

Corso di Laurea Magistrale in Chimica

Sintesi e caratterizzazione di impurezze per
strategie di controllo regolatorio nella
produzione di Cefalosporine

Relatore:

Prof. Filippo Doria

Correlatore:

Dott.ssa Marta Rui

PhD - ACS Dobfar

Tesi di Laurea Magistrale di
Giorgia Greco



Anno Accademico 2023 / 2024

Sommario

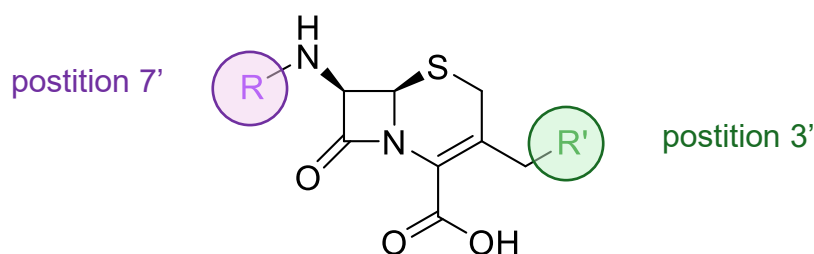
Abstract.....	III
1 Introduzione.....	1
1.1 Gli antibiotici β -lattamici.....	1
1.1.1 Scoperta degli antibiotici β -lattamici.....	4
1.2 Le cefalosporine	6
1.3 Aspetti regolatori legati alla produzione dei β -lattamici	11
1.3.1 Autorizzazione alla produzione	11
1.3.2 Autorizzazione all'Immissione in Commercio.....	12
1.4 Le impurezze	13
2 Presupposti scientifici e scopo della tesi	16
2.1 Soglie di controllo per le impurezze.....	16
2.2 Fattore di risposta relativa	18
2.3 Le <i>ATA-impurities</i>	19
2.4 Scopo della tesi.....	23
3 Discussione dei risultati.....	28
3.1 Sintesi del composto 3	28
3.1.1 <i>Coupling</i> tra 12 e 1 via NaHMDS	29
3.1.2 Sililazione del composto 4	33
3.1.3 <i>Homocoupling</i> di 4 via PyBOP	35
3.2 Sintesi del composto 2	36
3.3 Sintesi delle ATA-Cefalosporine.....	39
3.3.1 Sintesi dell'ATA-Cefovecin.....	39
3.3.2 Sintesi dell'ATA-ceftriaxone e ATA-cefotaxime	40
3.4 Sintesi del composto 9	42
3.4.1 Idrolisi del composto 17	43

3.4.2	<i>Screening</i> degli agenti di <i>coupling</i> per il composto 10	44
3.4.3	<i>Homocoupling</i> del 10 via PyBOP.....	47
3.5	Sintesi del composto 6	50
4	Conclusioni.....	51
5	Parte sperimentale.....	53
5.1	Materiali e strumenti.....	53
5.2	Preparazione del composto 14	54
5.3	Preparazione del composto 3	54
5.4	Preparazione alternativa del composto 3	55
5.5	Preparazione del composto 2	55
5.6	Preparazione dell'ATA-cefovecin.....	56
5.7	Preparazione dell'ATA-ceftriaxone	57
5.8	Preparazione dell'ATA-cefotaxime	58
5.9	Preparazione del composto 10	59
5.10	Preparazione del composto 9	59
6	Bibliografia.....	60

Abstract

β -lactams are a class of antibiotics, which represent pharmaceutical substances used to treat bacterial infections. They have a wide distribution worldwide according to their broad-spectrum activity and long-term safety, accounting for over half of antimicrobial sales.¹ They are divided into six subclasses: penicillins, cephalosporins, carbapenems, penems, carbacephems, and monobactams.²

Cephalosporins are structurally characterized by a bicyclic core with a β -lactam ring fused to a dihydrothiazine ring, enhancing stability and resistance to β -lactamases;³ moreover, the presence of two sites for the functionalization of the central core (positions C-3' and C-7') allows the introduction of various side chains, enabling the development of new Active Pharmaceutical Ingredients (API).⁴ (Scheme 1)



Scheme 1 Generic cephalosporin structure

Due to the risk of allergic reactions and the potential cross-contaminations, regulatory agencies, *e.g.* FDA (Food and Drug Administration), have established strict guidelines for the production of β -lactam antibiotics, such as all API and Finished Pharmaceutical Products (FPP) must comply with specific standards of quality, efficacy, and safety, which are ensured through Manufacturing Authorization and Marketing Authorization.

The main objective of Manufacturing Process Development in the pharmaceutical industry is to ensure the consistent production of an API that meets quality standards: the research and control of impurities is part of this development program, since they can negatively impact the quality of the API and thus, the ICH (International Council of Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) guidelines on impurity control are particularly relevant.⁵⁻⁸

All organic impurities have to be reported, both current and potential, that may form during the synthesis, purification, and storage of an API; they are classified in organic impurities, inorganic impurities and residual solvent.

The ICH also focuses on safety aspects, defining percentage limits beyond which an impurity must be reported, identified, or qualified through clinical studies.⁵ (Table 1)

Table 1 Threshold for impurities in active pharmaceutical ingredients

Maximum Daily Dose	Reporting Threshold	Identification Threshold	Qualification Threshold
≤ 2 g/day	0.05%	0.10% or 1.0 mg/day (whichever is lower)	0.15% or 1.0 mg/day (whichever is lower)
> 2 g/day	0.03%	0.05%	0.05%

If an impurity is above the reporting threshold it must be reported in the impurity profile, if it exceeds the identification threshold, it must be structurally characterized; those above the qualification threshold require toxicological and clinical studies to demonstrate their safety.

To accurately quantify impurities, it is necessary to determine their Relative Response Factor (RRF), which represents the impurity's response relative to the API's. The use of an external reference standard is the most accurate method, but to ensure sufficient accuracy, it is essential to isolate a solid standard with a high degree of purity.

The conventional method requires analyses on both the impurity and the API under identical analytical conditions, generating two calibration curves.⁹ Their slopes (indicated with b) are used to calculate the RRF:

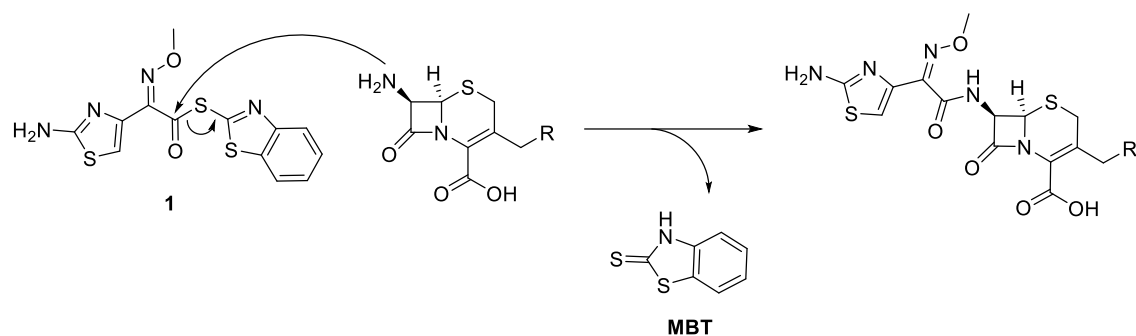
$$RRF = \frac{\text{response}_{\text{impurity}}}{\text{response}_{\text{API}}} = \frac{b_{\text{impurity}}}{b_{\text{API}}}$$

If the impurity's RF deviates significantly from the API's, a correction factor must be applied during impurity quantification; conventionally, if RRF falls between 0.8 and 1.2, it is considered unitary, as the impurity's response is not significantly different from that of the API. If a correction factor is required, additional analyses must confirm that the impurity remains within regulatory limits.

ACS Dobfar S.p.A. is among the leading international companies in the production of β -lactam antibiotics; as for all pharmaceutical companies, the preparation of external

reference standards is a crucial activity for conducting analyses and impurity characterization and quantification.

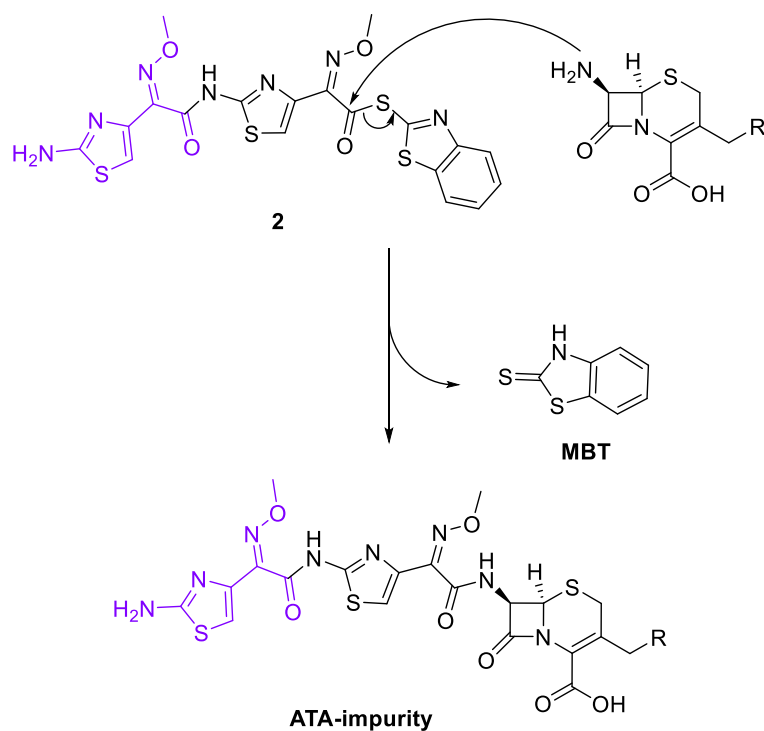
Regarding the cephalosporins produced by ACS Dobfar, some share the presence of an impurity with a molar mass 183.2 g/mol higher than their corresponding active ingredients. The uniqueness of these impurities lies in their presence across some cephalosporins that utilize S-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate, henceforth **1**, in their synthesis: an acylating agent used to functionalize the C-7' position of certain cephalosporins (Scheme 2)



Scheme 2 Coupling of 1 with the cephalosporin core

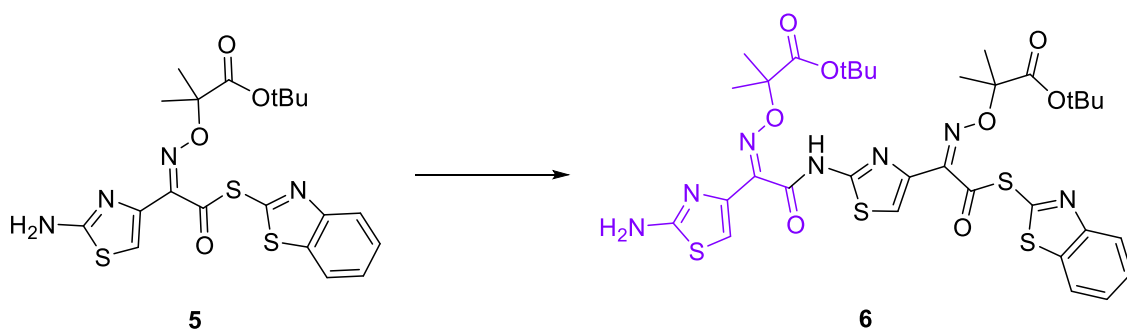
In light of this consideration, the structure of ATA-impurities (General structure, Scheme 3) was postulated, molecules similar to those of the corresponding cephalosporins, but with a dimer in the side chain at the C-7' position.

Their presence can be associated with the potential dimerization of intermediate **1**, forming the S-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate, hereafter **2**, that could react with the cephalosporin core, resulting in an ATA-impurity. (Scheme 3)



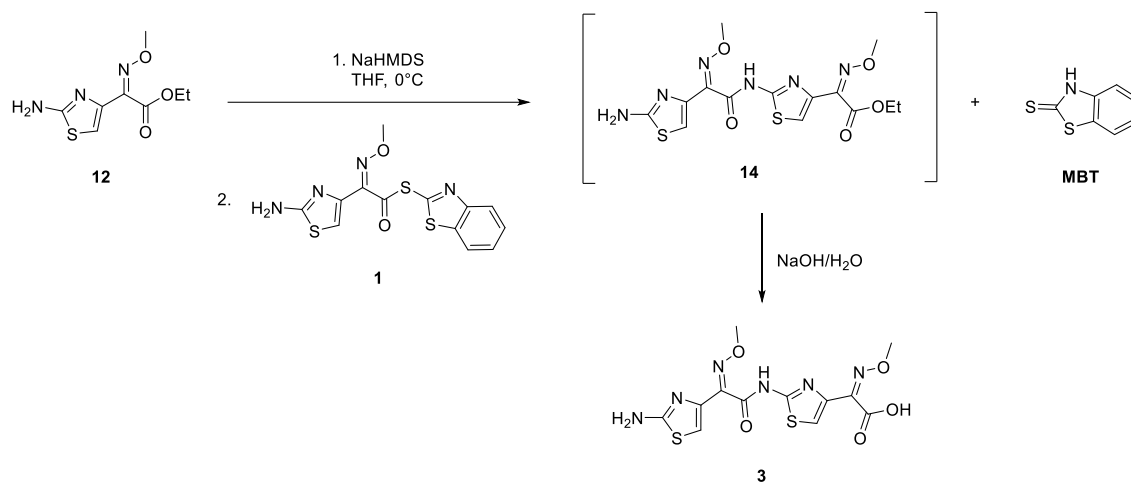
Scheme 3 Hypothetic formation of an ATA-impurity

This thesis aimed at synthesizing and characterizing three impurities (ATA-cefovecin, ATA-ceftriaxone, and ATA-cefotaxime), as well as at obtaining compound **2** for production monitoring. Additionally, a new ceftazidime impurity was postulated to arise from the dimerization of another acylating agent, the tert-butyl (Z)-2-(((1-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate, and thus some attempts to obtain the desired product **6** were performed. (Scheme 4)



Scheme 4 Ipothetic formation of 2-(((Z)-1-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate

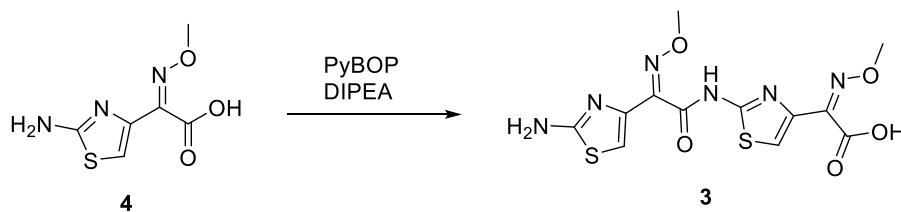
The first step involved the synthesis of (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid, the precursor of compound **2**. Among the numerous strategies adopted to obtain the molecule, the coupling between ethyl (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetate, whose amine was deprotonated with NaHMDS to increase its nucleophilicity, and compound **1**, allowed to afford the dimer. The coupling was followed by a hydrolysis step, to remove the ethyl ester. (Scheme 5)



Scheme 5 Synthesis of (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid

This strategy presented several disadvantages: there was not a complete conversion of starting materials into the product, and they were partially degraded by the base, moreover, this procedure required a hydrolysis step to obtain the desired product, as well as a purification through column chromatography, further lowering the yield.

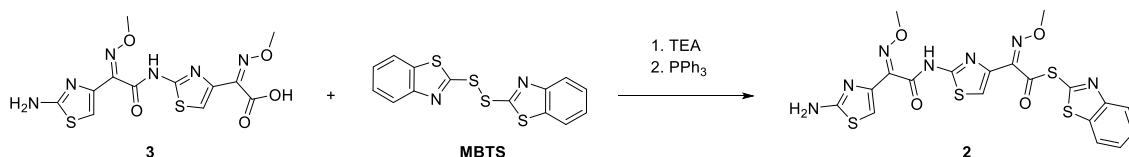
The second approach foresaw a dimerization of (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid, using PyBOP as a coupling agent. (Scheme 6)



Scheme 6 Dimerization of (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid via PyBOP activation

This synthetic route was more efficient compared to the first one, as it showed higher yields and allowed to obtain compound **3** in one step, without a purification step through column chromatography.

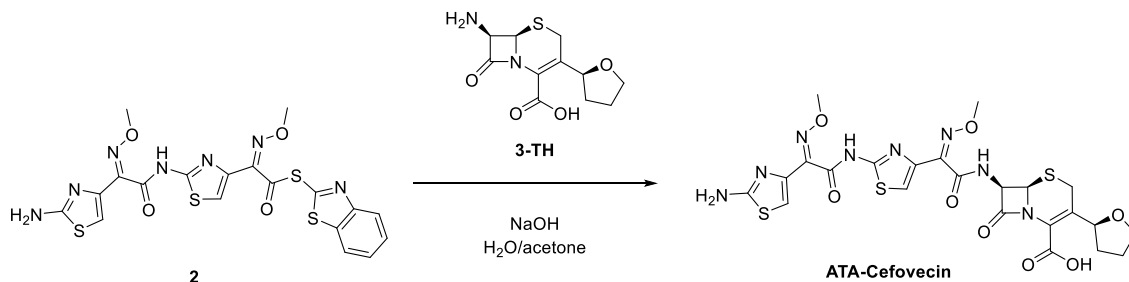
Once **3** was obtained, it was used as a substrate for the synthesis of **2**, with a thioesterification, adopting MBTS and triphenylphosphine.



Scheme 7 Thioesterification of compound 3

Once compound **2** was isolated, HPLC analysis was performed on the batches of **1**; however, it was found in negligible quantities. Therefore, ATA-impurities formation was defined as a secondary reaction, occurring during the coupling step with the cephalosporin core.

The first ATA-impurity to be synthesized was ATA-cefovecin, as it is an impurity presents above the identification threshold and required a standard for RRF determination. (Scheme 8)



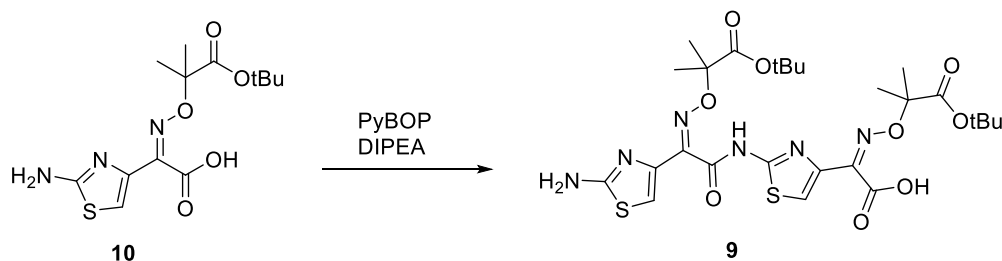
Scheme 8 Synthesis of ATA-cefovecin

The coupling was successful and after a purification *via* column chromatography, a solid standard with an adequate level of purity was obtained.

The same synthetic route was applied for the synthesis of ATA-ceftriaxone and ATA-cefotaxime, which had not been identified before, and their synthesis enabled structure characterization and RRF determination.

The second part of the project focused on the preparation of an impurity analogous to ATA-impurities, hypothesized to be present in ceftazidime due to the dimerization of acylating agent **5**, which exhibits similar reactivity to compound **1**.

A synthetic pathway was evaluated, mirroring the steps used for the synthesis of ATA-impurities: a screening of various coupling agents was performed, identifying PyBOP as the most effective reagent to promote the dimerization of (Z)-2-(2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetic acid and obtaining compound **9**. (Scheme 9)



Scheme 9 Synthesis of (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetic acid

The thioesterification of compound **9** with MBTS was expected to yield compound **6**, which would have been used to analyze starting material batches and synthesize the ceftazidime impurity. However, synthesis attempts for compound **6** were unsuccessful. Future work will require additional experiments to successfully obtain it or explore alternative activation methods to perform the coupling between dimer **9** and 7-PYCA, ultimately leading to the synthesis of the ceftazidime impurity, followed by structural characterization and response factor determination.

1 Introduzione

1.1 Gli antibiotici β -lattamici

Gli antibiotici sono una categoria di farmaci utilizzate per il trattamento delle infezioni batteriche, la maggior parte di essi agisce interferendo con le funzioni vitali dei batteri o con i loro processi di crescita. I loro meccanismi d'azione si possono raggruppare in cinque categorie²:

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

Essi vengono generalmente classificati in base ai meccanismi sopracitati, alla struttura chimica o allo spettro di attività; le principali classi sono: glicopeptidi, β -lattamici, macrolidi, tetracicline, amminoglicosidi e chinoloni.

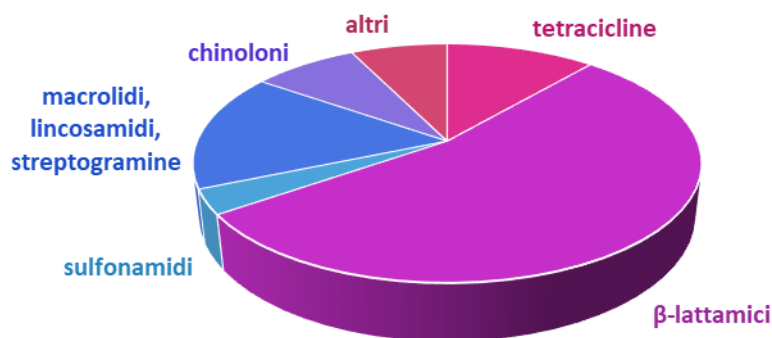
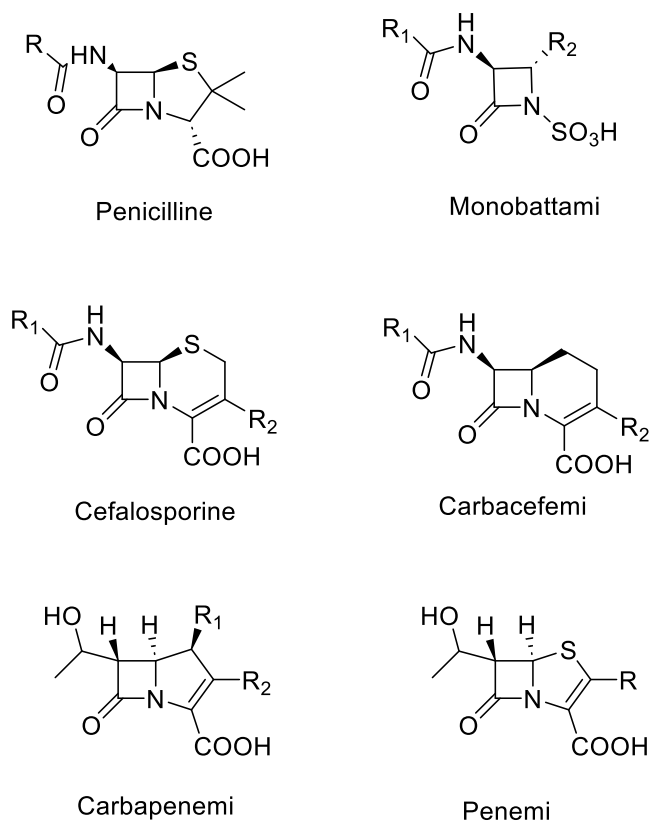


Grafico 1.1 Consumo delle varie classi di antibiotici nell'UE nel 2021

Tra queste, i β -lattamici sono considerati una delle classi di antibiotici di maggior successo nella storia della medicina, grazie al loro ampio spettro d'azione e alla loro sicurezza d'uso nel tempo, rappresentano più della metà dei farmaci antimicrobici venduti.¹ Sono a loro volta suddivisi in sei sottoclassi: penicilline, cefalosporine, carbapenemi, penemi, carbacefemi e monobattami. (Schema 1.1) Secondo alcune

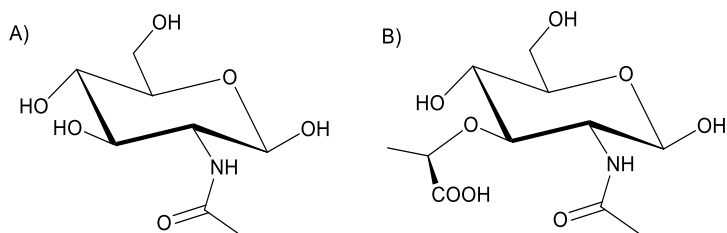
classificazioni, i carbapenemi e i penemi vengono considerati parte della stessa sottoclasse.



Schema 1.1 Formule di struttura delle diverse classi di antibiotici β -lattamici

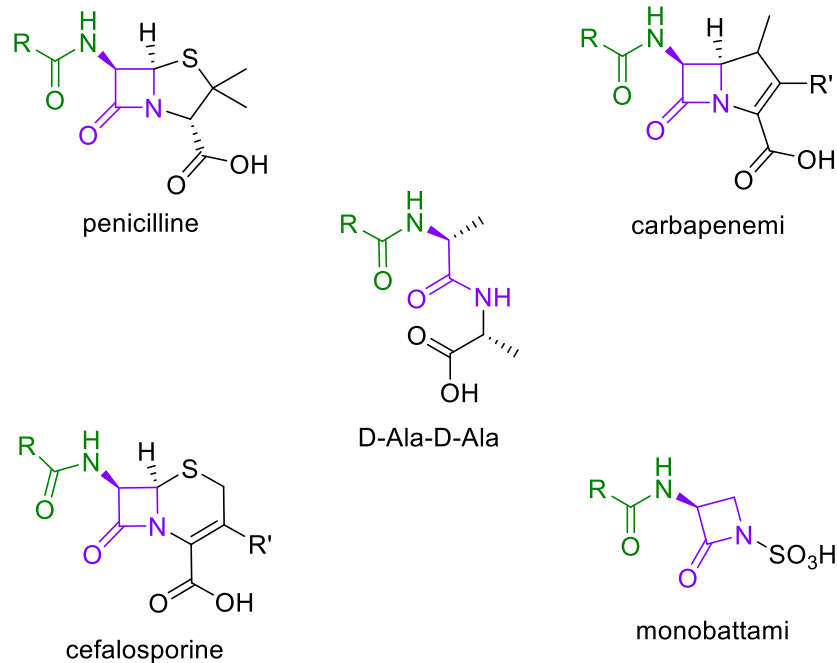
Il meccanismo d'azione degli antibiotici β -lattamici è basato sull'inibizione della biosintesi del peptidoglicano, un componente essenziale della parete cellulare batterica, che è fondamentale per garantire la stabilità strutturale della cellula.

Il peptidoglicano è un complesso polimero costituito da filamenti di polisaccaridi e polipeptidi: nella struttura del polisaccaride si alternano gli amminozuccheri N-acetilglucosammina e l'acido N-acetilmuramico, legato a quest'ultimo, all'estremità di ogni singolo filamento, vi è un peptide formato da cinque amminoacidi, che termina con il dipeptide D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala).¹⁰ (Schema 1.2)



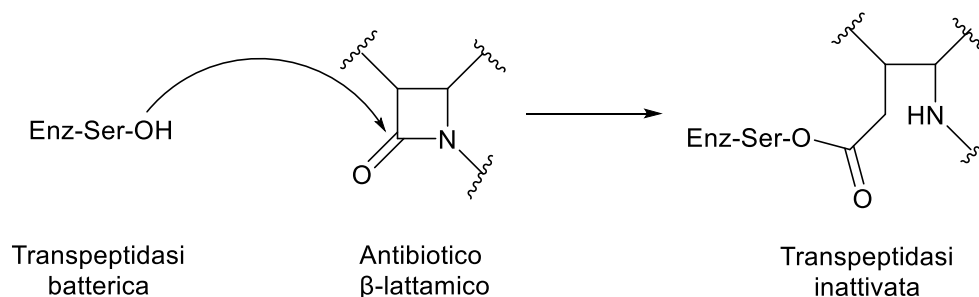
Schema 1.2 Formule di struttura di A) N-acetilglucosammina e B) acido N-acetilmuramico

L'enzima transpeptidasi (*Penicillin Binding Protein*, PBP) catalizza la formazione di legami crociati tra le estremità peptidiche di diversi filamenti; questa struttura conferisce rigidità alla parete cellulare batterica.



Schema 1.3 Analogie strutturali tra β -lattamici e D-alanil-D-alanina

Gli antibiotici β -lattamici, essendo analoghi strutturali della D-Ala-D-Ala (Schema 1.3), mostrano una particolare affinità per il sito attivo della transpeptidasi, in particolare per il residuo Ser403, legandosi in maniera irreversibile e inibendo la sintesi del peptidoglicano.¹¹ (Schema 1.4)



Schema 1.4 Meccanismo d'azione dei β -lattamici

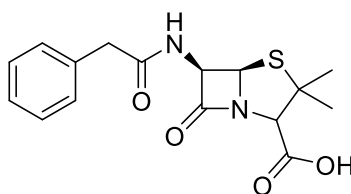
1.1.1 Scoperta degli antibiotici β -lattamici

La scoperta degli antibiotici β -lattamici ebbe inizio nel 1928, quando Alexander Fleming, mentre studiava *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.¹² Da essa fu isolata la sostanza attiva, chiamata in seguito penicillina, che diede avvio alla ricerca sugli antibiotici, rivoluzionando la medicina moderna.

Tuttavia, la scoperta di Fleming non ebbe immediatamente un'applicazione concreta: fu necessario un lungo percorso di ricerca e collaborazione tra scienziati, istituzioni e industrie farmaceutiche. Alla fine degli anni '30, Ernst Chain e Howard Florey, presso l'Università di Oxford, condussero una serie di studi fondamentali che portarono alla purificazione della penicillina e alla comprensione del suo meccanismo d'azione.¹³

Lo scoppio della Seconda Guerra Mondiale accelerò notevolmente gli sforzi per produrre questo antibiotico in grandi quantità, destinandolo soprattutto al trattamento delle infezioni nei soldati feriti al fronte. Grazie al supporto del governo statunitense e all'adozione di avanzate tecniche di fermentazione, la produzione della penicillina divenne il primo grande successo nella storia degli antibiotici β -lattamici.

Tra i vari composti isolati durante il suo sviluppo, la Penicillina G si distinse per la sua elevata efficacia contro i batteri Gram-positivi e per la sua produzione relativamente economica, sebbene risultasse meno efficace contro i patogeni Gram-negativi. (Schema 1.3)



penicillina G

Schema 1.5 Struttura della penicillina G

L'ampio impiego clinico della Penicillina G stimolò numerosi tentativi di migliorarne l'efficacia attraverso modifiche biosintetiche e chimiche. Durante gli anni '40, furono sviluppati oltre 100 derivati biosintetici della penicillina mediante l'introduzione di

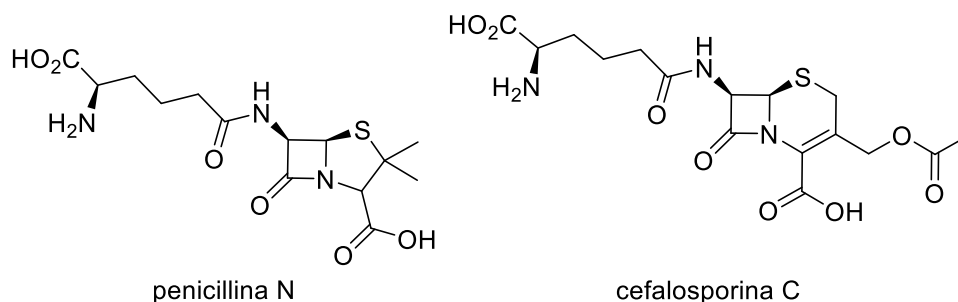
derivati degli acidi carbossilici nei brodi di fermentazione; tuttavia, nessuno di questi nuovi composti offrì vantaggi clinici significativi rispetto alla Penicillina G. Nonostante ciò, questa fase fu determinante per riconoscere il potenziale delle modifiche chimiche nella progettazione di antibiotici più efficaci, aprendo la strada allo sviluppo delle penicilline semisintetiche, caratterizzate da uno spettro d'azione più ampio e una maggiore stabilità.

L'uso esteso della penicillina portò rapidamente alla comparsa di batteri resistenti: si scoprì che alcuni di essi erano in grado di produrre enzimi chiamati β -lattamasi, capaci di distruggere l'anello β -lattamico della penicillina, che, come menzionato precedentemente, è il fulcro dell'azione battericida di questa classe di antibiotici.

Esistono anche altri meccanismi attraverso i quali i batteri sviluppano resistenza agli antibiotici, quali: l'alterazione delle PBP, con conseguente riduzione o perdita totale di affinità dei β -lattamici, la riduzione della permeabilità della parete cellulare, attraverso la quale gli antibiotici raggiungono le PBP bersaglio, e la presenza di pompe di efflusso che trasportano il farmaco all'esterno della cellula batterica.³

Tuttavia, le β -lattamasi sono il meccanismo più comune e la loro diffusione compromise gravemente l'efficacia di molti antibiotici, rendendo necessario lo sviluppo di nuove molecole più resistenti o di combinazioni di antibiotici con inibitori di questi enzimi.

Negli anni '50, il medico italiano Giuseppe Brotzu fece una scoperta rivoluzionaria: individuò un ceppo del fungo *Cephalosporium acremonium*, isolato dall'acqua marina nei pressi di uno sbocco di una fognatura, capace di produrre una sostanza con attività antibatterica contro i batteri Gram-negativi resistenti alla penicillina.¹⁴ Le successive ricerche condotte da Edward Abraham e Guy Newton portarono all'identificazione di due composti chiave: la Penicillina N, che influenzò lo sviluppo di penicilline a spettro più ampio, e la Cefalosporina C, che mostrava una resistenza naturale alle β -lattamasi batteriche.¹⁵⁻¹⁷ Quest'ultima rappresentò una vera svolta, ponendo le basi per la nascita della classe delle cefalosporine, caratterizzate da un'azione più ampia e da una maggiore resistenza alla degradazione enzimatica. (Schema 1.4)

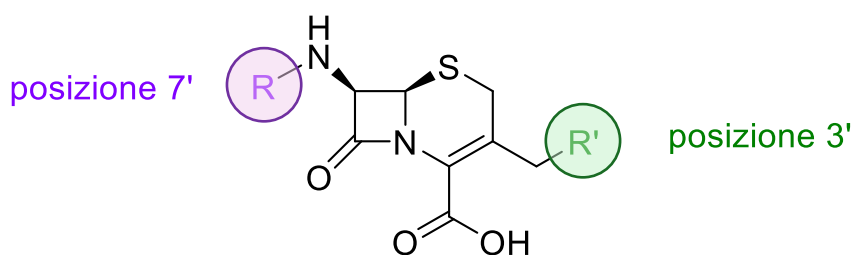


Schema 1.6 Formule di struttura della penicillina N e della cefalosporina C

1.2 Le cefalosporine

Le cefalosporine costituiscono una delle classi più rilevanti di antibiotici β -lattamici e vengono largamente impiegate nella pratica clinica per il trattamento di infezioni batteriche, grazie al loro ampio spettro d'azione, che include sia batteri Gram-positivi che Gram-negativi, e alla loro naturale resistenza alle β -lattamasi.³

Dal punto di vista strutturale presentano un nucleo biciclico composto da un anello β -lattamico legato a un anello diidrotiazinico a sei membri: questa configurazione conferisce una maggiore stabilità chimica rispetto alle penicilline e una resistenza più elevata all'azione delle β -lattamasi batteriche. (Schema 1.7) Inoltre, la presenza di due siti per la funzionalizzazione del nucleo centrale (le posizioni C-3' e C-7') consente l'introduzione di diverse catene laterali, permettendo di sviluppare nuovi principi attivi con proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche in continuo miglioramento.⁴

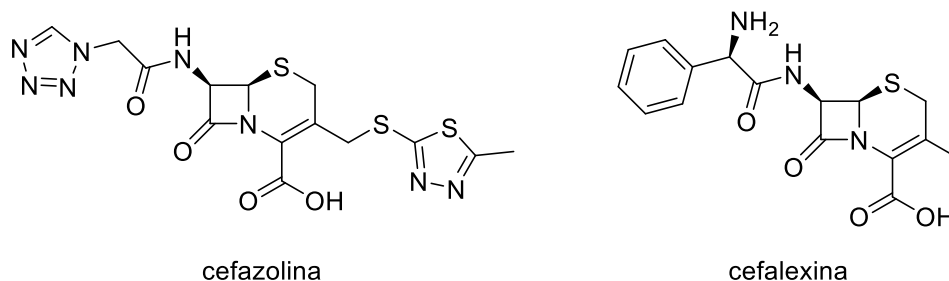


Schema 1.7 Struttura generica di una cefalosporina

Lo sviluppo farmaceutico ha così permesso di adattare questi antibiotici alle nuove sfide poste dai microrganismi resistenti, portando alla progettazione di molecole sempre più efficaci e selettive.

Le cefalosporine vengono suddivise in cinque generazioni, basate sulla sequenza cronologica in cui sono state sviluppate e di conseguenza sul progressivo miglioramento

del loro spettro antibatterico e della loro capacità di contrastare i meccanismi di resistenza. Quelle di prima generazione, introdotte tra gli anni '60 e '70, hanno segnato l'inizio della produzione e somministrazione di questa classe antibiotica. Alcuni tra i primi esempi sviluppati includono la cefalexina, destinata all'uso orale, e la cefazolina, somministrata per via parenterale. (Schema 1.8)

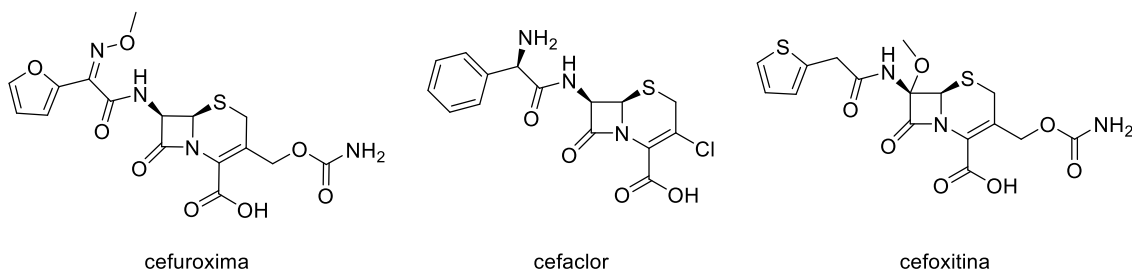


Schema 1.8 Formule di struttura di cefazolina e cefalexina

Questi farmaci si distinguono per la loro elevata efficacia contro i batteri Gram-positivi, in particolare *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibile (MSSA) e vari streptococchi; tuttavia, la loro efficacia nei confronti dei batteri Gram-negativi è piuttosto limitata e risultano suscettibili all'azione delle β -lattamasi batteriche, riducendone l'utilità in alcune tipologie di infezione.^{4,18} Inoltre, queste cefalosporine non sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, risultando inadatte al trattamento delle infezioni del sistema nervoso centrale, come le meningiti batteriche. Nonostante ciò, rimangono una scelta terapeutica valida in caso di infezioni non troppo gravi, vista la loro affidabilità e il buon profilo di tollerabilità da parte dei pazienti.

Negli anni '70 sono state sviluppate le cefalosporine di seconda generazione, con un ampliato spettro d'azione rispetto alla generazione precedente, dimostrando una maggiore efficacia nei confronti di batteri Gram-negativi. Allo stesso tempo, conservano una buona attività contro batteri Gram-positivi, tra cui *Streptococcus pneumoniae* e MSSA.

L'altro considerevole miglioramento rispetto alle cefalosporine di prima generazione è la maggiore resistenza all'idrolisi da parte delle β -lattamasi batteriche, oltre alla maggiore versatilità nelle modalità di somministrazione. Inoltre, la loro farmacocinetica migliorata, caratterizzata da una maggiore emivita e da una riduzione della frequenza di somministrazione, ne ha favorito l'uso clinico e l'aderenza terapeutica.¹⁹ Tra i composti più rappresentativi vi sono cefuroxime, cefaclor e cefoxitina. (Schema 1.9)

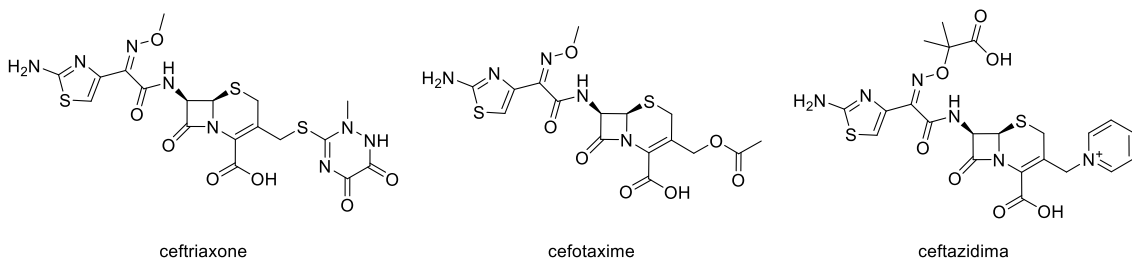


Schema 1.9 Formula di struttura di cefuroxima, cefaclor e cefoxitina

Il continuo sviluppo di questa classe di antibiotici ha permesso di ottenere cefalosporine di terza generazione, che possiedono un'ottima attività contro numerosi batteri Gram-negativi, risultando particolarmente utili nei contesti ospedalieri.²⁰

La stabilità nei confronti delle β -lattamasi è ulteriormente migliorata grazie alla presenza di una catena laterale (aminotiazolid)ossimino acetammido in posizione C-7'. Inoltre, una caratteristica chiave di alcuni composti di questa classe è la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica, un traguardo che non era ancora stato raggiunto con le precedenti generazioni.^{21,22}

Tra i principi attivi maggiormente impiegati troviamo il ceftriaxone, la ceftazidima e il cefotaxime. (Schema 1.10)



Schema 1.10 Formule di struttura di ceftriaxone, cefotaxime e ceftazidima

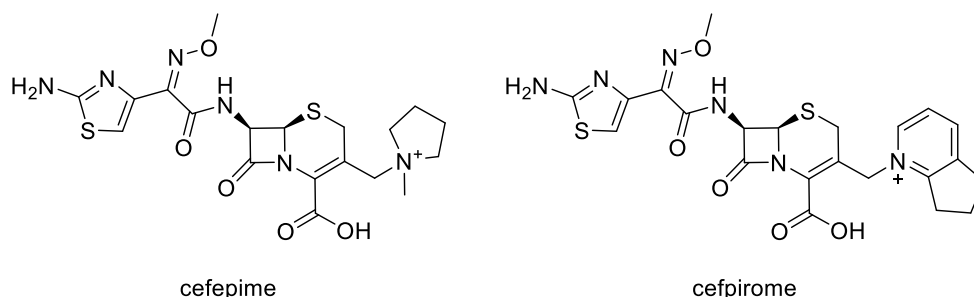
La crescente diffusione di ceppi batterici produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) ha tuttavia ridotto l'efficacia di alcune cefalosporine di terza generazione; per contrastare questo fenomeno, sono stati sviluppati farmaci combinati, come ceftazidime-avibactam, che associa l'antibiotico a un inibitore delle β -lattamasi.

Le cefalosporine di quarta generazione presentano delle modifiche a livello strutturale che hanno permesso un miglioramento ulteriore nella capacità di penetrare la membrana batterica e nella resistenza agli enzimi β -lattamasi²³: grazie alla catena laterale dotata di una carica positiva in posizione C-3', queste molecole riescono a oltrepassare più

facilmente la membrana esterna dei batteri Gram-negativi; inoltre, mostrano una ridotta affinità per le β -lattamasi, limitando il rischio di inattivazione enzimatica.

Mantengono una buona efficacia contro batteri Gram-positivi come *Streptococcus pneumoniae* e MSSA, risultando ideali per gestire infezioni miste; in generale sono antibiotici particolarmente adatti al trattamento di gravi infezioni in ambito ospedaliero.²⁴

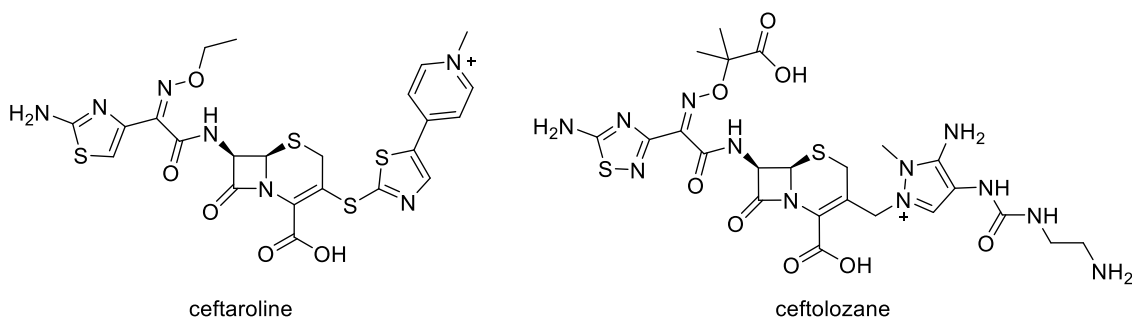
Appartengono a questa categoria il cefepime e ceftirome. (Schema 1.11)



Schema 1.11 Formule di struttura di cefepime e ceftirome

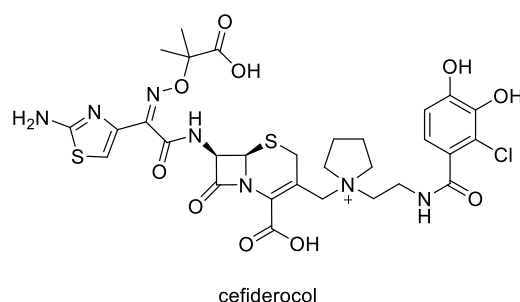
La quinta generazione di cefalosporine rappresenta una delle più recenti innovazioni nella terapia antibiotica, il loro principale vantaggio è l'attività contro *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), uno dei patogeni più problematici nelle infezioni ospedaliere.

Ne sono un esempio il ceftaroline (approvato nel 2010 in US) e il ceftolozane (approvato nel 2014 in US), progettati per legarsi con elevata affinità alle varianti mutate delle proteine leganti la penicillina (PBP), un altro meccanismo di resistenza batterica, presenti nei ceppi di MRSA. Inoltre, la loro struttura chimica avanzata, con una catena laterale idrofobica in posizione C-3', permette di aggirare la riduzione della permeabilità della parete cellulare presentata da alcuni batteri resistenti.^{25,26}



Schema 1.12 Formule di struttura di ceftaroline e ceftolozane

Questo tipo di resistenza è presente solo nei batteri Gram-negativi, che possiedono una membrana esterna aggiuntiva che funge da barriera contro gli antibiotici; all'interno di questa membrana si trovano le porine, canali proteici che facilitano l'ingresso di molecole idrofile, tra cui i β -lattamici. Tuttavia, mutazioni o una ridotta espressione delle porine possono limitare drasticamente l'assorbimento degli antibiotici, impedendo al farmaco di raggiungere le PBP bersaglio e aggravando gli effetti dell'azione delle β -lattamasi: la velocità di idrolisi operata dall'enzima è maggiore di quella con cui il principio attivo riesce a penetrare nella membrana.¹⁰



Schema 1.13 Formula di struttura del cefiderocol

Per contrastare questo meccanismo di resistenza, il cefiderocol (approvato nel 2019 negli US) rappresenta una soluzione innovativa, basata sulle sue caratteristiche di sideroforo, dovute alla presenza di un clorocatecolo sulla catena laterale legata in posizione C-3'. In questo modo, il cefiderocol utilizza i sistemi di trasporto del ferro dei batteri per penetrare nella cellula, superando la ridotta permeabilità della membrana esterna, motivo per cui questa strategia è denominata come “cavallo di Troia” (nome commerciale Fetroja); una volta all'interno della cellula batterica, il cefiderocol mostra un'elevata affinità di legame per la PBP, inibendo efficacemente la sintesi della parete cellulare batterica.

Questo innovativo meccanismo d'azione, unito alla sua resistenza nei confronti di un ampio spettro di β -lattamasi, rende il cefiderocol un'arma potente contro le infezioni causate da patogeni Gram-negativi multiresistenti.^{27,28}

Nonostante il loro potenziale terapeutico, l'uso di queste cefalosporine deve essere attentamente monitorato per evitare lo sviluppo di ulteriori resistenze, garantendone così l'efficacia nel tempo.

1.3 Aspetti regolatori legati alla produzione dei β -lattamici

Nonostante la loro efficacia, gli antibiotici β -lattamici sono noti per il loro potenziale sensibilizzante, potendo causare reazioni allergiche anche gravi in alcuni soggetti, che costituiscono uno degli effetti collaterali più comuni e rilevanti di questa classe di farmaci.

A causa del rischio di reazioni allergiche e della possibilità di contaminazione incrociata, le agenzie regolatorie, come la *Food and Drug Administration* (FDA) e l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), hanno stabilito rigide linee guida per la produzione degli antibiotici β -lattamici: in particolare, si raccomanda che la produzione di ogni sottoclasse avvenga in ambienti separati, per evitare contaminazioni con altre sottoclassi o con altri prodotti farmaceutici, riducendo così il rischio di esposizione accidentale e minimizzando gli effetti avversi nei pazienti.

Questo è solo uno dei tanti provvedimenti attuati per la tutela dei pazienti e che rendono di fondamentale importanza l'attività degli enti regolatori: gli antibiotici, come tutti gli *Active Pharmaceutical Ingredients* (API) e i *Finished Pharmaceutical Products* (FPP), devono rispettare determinati standard di qualità, efficacia e sicurezza, che vengono assicurati mediante l'Autorizzazione alla Produzione e all'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, concessa dalle Autorità Regolatorie Nazionali dopo un'ispezione che verifichi la conformità del produttore ai requisiti tecnico-industriali e alla disponibilità di personale qualificato. In Italia, al seguito di un'ispezione con esito positivo, l'azienda riceve la *Manufacturing Licence*, una determina autorizzativa, e il *GMP Certificate*, la certificazione di conformità alle Norme di Buona Fabbricazione.

L'autorizzazione riguarda non solo la produzione completa dei farmaci, ma anche operazioni parziali come confezionamento, controllo qualità e sostanze attive intermedie utilizzate per la produzione dei medicinali, comprese quelli importati da paesi terzi, che devono essere certificati GMP. Sono inoltre previsti controlli periodici per il rinnovo dell'autorizzazione, per garantire il continuo adeguamento delle aziende alle normative.

In Italia, l'AIFA è l'ente preposto al coordinamento delle ispezioni, ma in alcuni casi possono essere richieste dalla Commissione Europea, dall'EMA, da altri stati membri o dagli stessi produttori.

Le Norme di Buona Fabbricazione (GMP) sono un insieme di regole e procedure volte a garantire i massimi standard di sicurezza e qualità per i prodotti farmaceutici e di altri settori (alimentare, dispositivi medici, cosmetici). Le linee guida sono descritte nel documento ICH Q7²⁹, sviluppato dall'*International Council of Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), un'organizzazione internazionale che si occupa di armonizzare le diverse autorità regolatorie e le industrie farmaceutiche per discutere di aspetti tecnici e scientifici per la registrazione dei prodotti farmaceutici.

Non sono limitate alla regolamentazione del processo produttivo, ma si estendono a tanti altri aspetti che stanno alla base dei prodotti finali:

- documentazione e registrazione dettagliata di ogni fase del processo
- formazione adeguata del personale su produzione, controllo e conservazione dei prodotti.
- controllo della contaminazione attraverso specifiche procedure di sterilizzazione, decontaminazione e disinfezione
- manutenzione di strumenti e macchinari per prevenire contaminazioni dei prodotti e per garantire la sicurezza sul lavoro
- controllo del processo produttivo con *audit* interni per monitorare materie prime e materiali di imballaggio
- procedure per investigare reclami e, se necessario, ritirare i prodotti in modo efficace e tempestivo

1.3.2 Autorizzazione all'Immissione in Commercio

La sicurezza e l'efficacia di un farmaco sono garantite dall'Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC o MA), il cui richiedente, noto come *Marketing Authorization Holder* (MAH), deve presentare una documentazione completa all'ente regolatorio competente.

Il *dossier* di registrazione è presentato secondo il formato standard *Common Technical Document* (CTD), sviluppato dall'ICH³⁰, un modello introdotto per armonizzare la

documentazione, semplificare le procedure di registrazione e ridurre i tempi di valutazione da parte delle autorità regolatorie ed è suddiviso 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.

Basandosi sul *dossier* CTD, il richiedente può inoltrare la domanda di Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC) attraverso una delle procedure previste dalla regolamentazione europea: centralizzata, decentrata, mutuo riconoscimento o nazionale. Per la registrazione dei dati relativi a un principio attivo, le linee guida dell'EMA³¹ prevedono tre opzioni: il *Certificate of Suitability* (CEP), applicabile solo se il principio attivo è incluso nella farmacopea Europea, l'*Active Substance Master File* (ASMF), utilizzabile sia ai nuovi principi attivi non presenti nella Farmacopea Europea, sia a quelli inclusi, o il modulo 3 del CTD.

L'ASMF è il documento tecnico-scientifico che contiene informazioni dettagliate sulla sostanza attiva e viene utilizzato nell'Unione Europea, mentre negli Stati Uniti l'equivalente è il *Drug Master File* (DMF); la sua redazione segue le linee guida EMA^{32,33} (o le indicazioni riportate sul sito dell'FDA) e ha lo scopo di tutelare la proprietà intellettuale del produttore da parte del MAH, che si assume la responsabilità della qualità del medicinale e si occupa della stesura dell'ASMF.

1.4 Le impurezze

L'obiettivo fondamentale dello sviluppo di un processo produttivo farmaceutico (*Manufacturing Process Development*) è garantire la produzione costante di un principio attivo che rispetti gli standard di qualità; per questo motivo, nello sviluppo di un processo, la ricerca e il controllo delle impurezze sono un aspetto fondamentale, poiché esse possono inficiare la qualità e la sicurezza dell'API o del FPP.

Il *Manufacturing Process Development* prevede tre aspetti cruciali:

- Identificazione dei *Critical Quality Attributes* (CQA), ovvero caratteristiche critiche che possono inficiare qualità del principio attivo.
- Definizione di un processo produttivo adeguato.
- Implementazione di una strategia di controllo per monitorare il processo e garantire la qualità del farmaco.

I CQA comprendono proprietà fisiche, chimiche o microbiologiche, che devono rientrare in specifici limiti per assicurare la qualità del prodotto finale e possono essere ridefiniti in base a nuove conoscenze acquisite.

Le impurezze sono una classe di CQA, a causa del loro impatto sulla sicurezza e l'efficacia del principio attivo, e la ricerca finalizzata al loro controllo è fondamentale in ambito farmaceutico. Per tale ragione, assumono particolare rilevanza le linee guida dell'ICH riguardanti il controllo delle impurezze, le quali sono definite come “tutte le sostanze in un prodotto farmaceutico finito che non siano il principio attivo o gli eccipienti”⁶ e possono avere diversa natura e origine:

- Impurezze organiche che possono generarsi durante il processo di sintesi o purificazione dell'API o formarsi per degradazione nello stoccaggio, includono gli *starting materials*, catalizzatori e altri reagenti residui, i sottoprodotti, gli intermedi e i prodotti di degradazione.
- Impurezze inorganiche che invece provengono principalmente dal processo di sintesi e possono includere residui di catalizzatori e ligandi metallici, sali inorganici, residui di agenti filtranti e metalli derivanti dalla componentistica industriale (come i reattori). Approfondite nelle linee guida ICH Q3D⁸
- Solventi residui, suddivisi in tre classi di rischio e descritti nella linea guida ICH Q3C⁷

Per le prime due categorie si fa riferimento alle linee guida ICH Q3A(R2)⁵, che si focalizza sulle impurezze nei nuovi principi attivi, e ICH Q3B(R2)⁶, che invece è incentrata sul controllo dei prodotti di degradazione che possono formarsi durante la produzione e la conservazione di un farmaco finito.

Nel dossier ASMF/DMF, il richiedente deve giustificare le specifiche adottate per il principio attivo e dimostrare che i metodi analitici impiegati per rilevare e quantificare

impurezze e solventi residui siano validati, seguendo le linee guida ICH Q2A e ICH Q2B sulla validazione dei metodi analitici.³⁴

È inoltre necessario documentare tutte le impurezze organiche, attuali e potenziali, che possono formarsi durante la sintesi, la purificazione e la conservazione di un principio attivo. Questa valutazione si basa su un'analisi scientifica che comprende le reazioni coinvolte nel processo sintetico, le impurezze derivanti dai materiali di partenza e i prodotti di degradazione, seguendo le linee guida ICH Q1³⁵ per svolgere gli studi di stabilità.

Il richiedente deve riassumere gli studi di laboratorio condotti per individuare le impurezze, includendo i test sui lotti prodotti durante lo sviluppo e quelli derivanti dal processo produttivo commerciale, oltre ai risultati degli *stress test* per identificare le impurezze che possono aumentare nel tempo durante lo stoccaggio. Il profilo impurezze ottenuto nei lotti di laboratorio deve essere confrontato con quello dei lotti commerciali, e le eventuali differenze devono essere discusse nella sezione appropriata del *Common Technical Document* (CTD).

2 Presupposti scientifici e scopo della tesi

2.1 Soglie di controllo per le impurezze

Oltre ad affrontare gli aspetti chimici di classificazione e identificazione delle impurezze, l'ICH si occupa anche di aspetti di sicurezza che includono la definizione di linee guida specifiche per la loro analisi; nel documento ICH Q3A(R2)⁵ definisce alcuni limiti in percentuale oltre le quali un'impurezza deve essere riportata, identificata o qualificata con studi tossicologici. (Tabella 2.1)

Tabella 2.1 soglie di controllo per le impurezze nei principi attivi

Dose massima giornaliera	Soglia di segnalazione	Soglia di identificazione	Soglia di qualificazione
≤ 2 g/giorno	0,05%	0,10% o 1,0 mg/giorno (la più bassa tra le due)	0,15% o 1,0 mg/giorno (la più bassa tra le due)
> 2 g/giorno	0,03%	0,05%	0,05%

Come si evince dalla tabella 2.1, i limiti per le impurezze cambiano a seconda della dose massima giornaliera per l'assunzione di un farmaco, poiché maggiore è la quantità che viene somministrata, maggiore sarà la quantità di impurezza che entra in circolo nel corpo.

La soglia di segnalazione è il limite oltre il quale un'impurezza deve essere considerata nel calcolo delle impurezze totali nelle specifiche di un API o di un FPP.

La soglia di identificazione indica invece il limite oltre il quale un'impurezza deve essere identificata e caratterizzata dal punto di vista strutturale, per dimostrare che si tratta di una sostanza correlata alla sintesi dell'API e non di un contaminante. Per le impurezze al di sotto di questa soglia non è necessaria una caratterizzazione strutturale e vengono riportate nelle specifiche indicandole con una lettera (per esempio “*unidentified A*”) o una loro caratteristica analitica qualitativa (per esempio il loro tempo di ritenzione in HPLC).

La soglia di qualificazione, infine, è la soglia oltre la quale l'impurezza deve essere sottoposta a studi tossicologici per dimostrarne la sua sicurezza; se non è possibile la qualificazione di un composto è necessario ridurre la concentrazione al di sotto del limite stabilito e ottimizzare il processo di sintesi per minimizzarne la formazione. Inoltre, per le impurezze notevolmente tossiche, i limiti possono essere più stringenti.

La valutazione tossicologica viene eseguita seguendo le linee guida ICH M7, focalizzata sulle sostanze che possono causare danni al DNA, portando ad una mutazione, e che quindi sono potenziali cancerogeni.³⁶ Nel documento è anche definita la Soglia di Preoccupazione Tossicologica, indicata come TCC, per sancire l'assunzione accettabile per qualunque sostanza chimica non studiata che presenti un rischio trascurabile di cancerogenicità o tossicità; nel caso di sostanze mutagene può essere pari a 1,5 µg/giorno. Le sostanze sono classificate in base alla loro potenziale cancerogenicità e sono definite le opzioni di controllo correlate; sono anche elencate le strutture chimiche potenzialmente cancerogene, note come strutture di allerta, classificate in base al loro rischio mutageno e alle conseguenti misure di controllo. (Tabelle 2.2)

Tabella 2.2 classificazione delle impurezze in base al potenziale mutageno e cancerogeno e relative azioni di controllo

Classe	Definizione	Azione proposta per il controllo (dettagli nelle Sezioni 7 e 8)
1	Cancerogeni mutageni noti	Controllo a un livello uguale o inferiore al limite accettabile specifico per il composto
2	Mutageni noti con potenziale cancerogeno sconosciuto (mutagenesi batterica positiva*, nessun dato di cancerogenicità nei roditori)	Controllo a un livello uguale o inferiore ai limiti accettabili (TTC appropriato)
3	Struttura di allerta, non correlata alla struttura del principio attivo; nessun dato di mutagenicità	Controllo a un livello uguale o inferiore ai limiti accettabili (TTC appropriato) o esecuzione di un test di mutagenesi batterica; se non mutageno = Classe 5; se mutageno = Classe 2
4	Struttura di allerta, stesso tipo di allerta presente nel principio attivo o in composti correlati al principio attivo (es. intermedi di processo) che sono stati testati e risultano non mutageni	Trattare come impurezza non mutagenica
5	Nessuna struttura di allerta o struttura di allerta con dati sufficienti a dimostrare l'assenza di mutagenicità o cancerogenicità	Trattare come impurezza non mutagenica

*o altri dati positivi rilevanti sulla mutagenicità indicativi di reattività con il DNA, correlati all'induzione di mutazioni geniche (es. risultati positivi negli studi di mutazione genica *in vivo*).

Pertanto, nelle specifiche di un principio attivo o di un farmaco finito devono essere inclusi il profilo delle impurezze (ovvero una descrizione delle impurezze identificate e non identificate presenti) e i dati tossicologici per le impurezze sopra la soglia di qualificazione.

2.2 Fattore di risposta relativa

Le aziende farmaceutiche, per garantire la sicurezza e la qualità dei loro prodotti, devono utilizzare metodi analitici convalidati per rilevare e quantificare le impurezze, impiegando standard di riferimento adeguati e presentando i risultati in modo chiaro, indicando le impurezze rilevate nei diversi lotti.

Utilizzare uno standard esterno è il metodo più accurato per la quantificazione delle impurezze, ma per avere un'accuratezza adeguata è necessario isolare o sintetizzare uno standard solido con un grado di purezza elevato, poiché maggiore è la purezza dello standard, minore è l'errore sulla determinazione del suo titolo. Lo standard viene utilizzato per determinare l'RRF (*Relative Response Factor*) ovvero il fattore di risposta relativo dell'impurezza, rapportato a quello dell'API:

$$RRF = \frac{\text{risposta}_{\text{impurezza}}}{\text{risposta}_{\text{API}}}$$

Una tecnica analitica ampiamente utilizzata per determinare il fattore di risposta è l'HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) e il metodo convenzionale consiste nell'analizzare i due composti, in questo caso l'impurezza e l'API, con un titolo noto e un grado di purezza elevato, utilizzando le stesse condizioni analitiche (nel caso dell'HPLC ci si riferisce a parametri come il flusso, la temperatura della colonna, la lunghezza d'onda del *detector* UV, il pH dell'eluente, la fase stazionaria). Si costruiscono due curve di calibrazione, analizzando delle soluzioni a diversa concentrazione, di cui si ricava la pendenza tramite regressione lineare: il rapporto tra le due pendenze fornisce il fattore di risposta relativo.

Infatti, la relazione tra il segnale S, ovvero l'area del picco, e la concentrazione C, in un determinato intervallo di concentrazione, segue una relazione lineare:

$$S = bC + a$$

La pendenza b è determinata dalle specifiche proprietà del prodotto, dunque considerando $a \approx 0$:

$$b_{\text{impurezza}} = \frac{S_{\text{impurezza}}}{C_{\text{impurezza}}} \quad b_{\text{API}} = \frac{S_{\text{API}}}{C_{\text{API}}}$$

Pertanto, il fattore di risposta relativo si calcola come:

$$\text{RRF} = \frac{b_{\text{impurezza}}}{b_{\text{API}}} = \frac{S_{\text{impurezza}}}{S_{\text{API}}} \cdot \frac{C_{\text{API}}}{C_{\text{impurezza}}}$$

È importante notare che il fattore di risposta è fortemente influenzato dai parametri utilizzati per svolgere l'analisi, pertanto, essi dovranno coincidere con quelli del metodo analitico impiegato per l'analisi dell'API.

Se il fattore di risposta dell'impurezza è significativamente diverso da quello dell'API allora è necessario apportare un fattore di correzione al suo segnale, pari al reciproco dell'RRF, durante l'analisi dell'impurezza;⁹ convenzionalmente, se il valore dell'RRF è compreso tra 0,8 e 1,2 viene considerato unitario poiché la risposta dell'impurezza non è significativamente differente da quella del principio attivo.

Se invece è necessario il fattore di correzione allora occorre ripetere le analisi per la quantificazione dell'impurezza per verificare in quali limiti percentuali rientra: nel caso l'impurezza avesse un fattore di risposta inferiore a quello dell'analita allora potrebbe essere presente in quantità superiore a quanto ipotizzato inizialmente e pertanto è opportuno verificare che non superi la soglia di qualificazione.

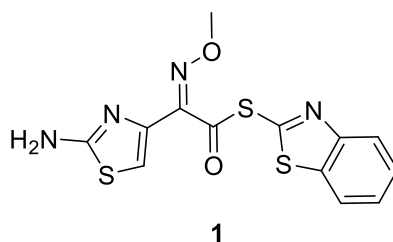
Allo stesso tempo la determinazione del fattore di risposta di un'impurezza può essere utile per rispondere ad eventuali esigenze future, quali possibili aggiornamenti delle normative in ambito regolatorio, o nel caso di cambiamenti nel processo produttivo di un principio attivo, che potrebbero causare un aumento dei quantitativi di impurezze rispetto al processo originale.

2.3 Le *ATA-impurities*

ACS Dobfar S.p.A. è tra le principali aziende internazionali per la produzione di β -lattamici e detiene nella sua pipeline numerosi antimicrobici, in particolare cefalosporine, carbapenemi e penicilline. Come è stato ampiamente discusso nel paragrafo precedente, per ACS Dobfar, così come per tutte le aziende farmaceutiche, è di fondamentale

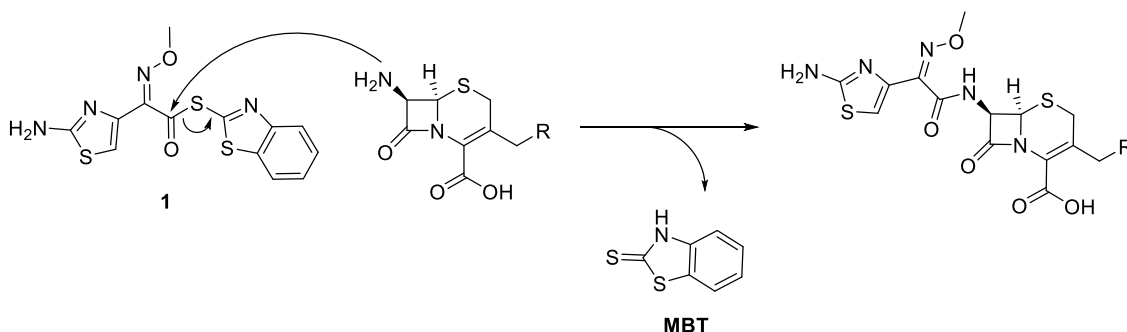
importanza la preparazione di standard esterni per effettuare le analisi e la caratterizzazione delle impurezze dei principi attivi da loro prodotti.

Per quanto riguarda le cefalosporine prodotte da ACS Dobfar, per alcune di esse nelle analisi del prodotto finito è talvolta presente un'impurezza che possiede una massa molecolare superiore di 183,2 g/mol a quella dei principi attivi corrispondenti. La peculiarità di queste impurezze è che sono presenti in tutte quelle cefalosporine che impiegano nella loro sintesi l'*S*-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate. (Schema 2.1)



*Schema 2.1 formula di struttura dell'*S*-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate*

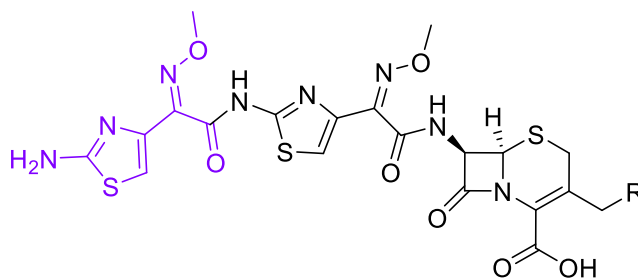
Il composto **1** è un agente acilante, impiegato per funzionalizzare la posizione C-7' del nucleo di alcune cefalosporine con una catena laterale (aminotiazolil)ossimino-acetammido; è un composto la cui reattività è basata sull'elettrofilia del carbonile, che quando subisce l'attacco di un nucleofilo libera il mercaptobenzotiazolo, indicato con l'acronimo MBT, un ottimo gruppo uscente. Viene utilizzato nell'ultimo *step* di sintesi della produzione di alcune cefalosporine, reagendo con l'ammina in posizione C-7' dei nuclei corrispondenti e formando un legame ammidico. (Schema 2.2)



Schema 2.2 Coupling di 1 con il nucleo di una cefalosporina

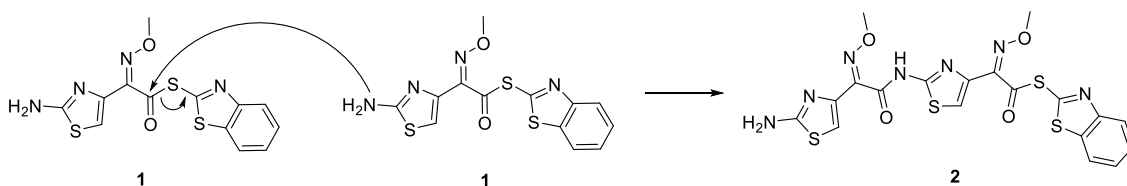
Questi presupposti hanno portato all'ipotesi della struttura delle *ATA-impurities*, ovvero impurezze che hanno una struttura simile a quella delle cefalosporine correlate, ma che

in posizione C-7' presentano il dimero della catena laterale (aminotiazolil)ossiminoacetammido: ciò è coerente con la massa molare superiore di 183,2 g/mol. (Schema 2.3)



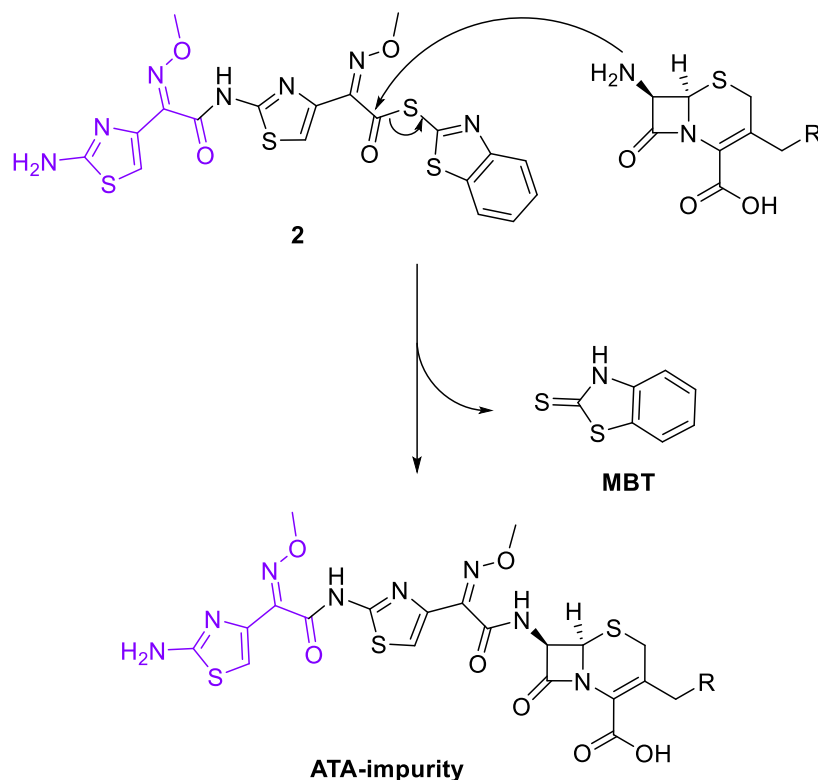
Schema 2.3 Struttura ipotizzata delle ATA-impurities

Considerando che i processi produttivi di questi API hanno in comune l'impiego dell'intermedio **1**, si è ipotizzato che la formazione di queste impurezze possa essere in qualche modo correlata ad esso; un'ipotesi sulla loro formazione si basa sulla possibile dimerizzazione di **1**, nel dettaglio il gruppo amminico di un monomero attacca l'estere attivato di un secondo monomero liberando MBT per ottenere l'*S*-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate, indicato come composto **2**. (Schema 2.4)



Schema 2.4 Ipotesi sulla formazione dell'*S*-(benzo[d]thiazol-2-yl) (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)ethanethioate

Il composto **2** ha una reattività analoga a quella del composto **1** nella posizione carbonilica, poiché anch'esso può liberare MBT se subisce un attacco nucleofilo. Pertanto, se entrasse in contatto con il nucleo di una cefalosporina nelle stesse condizioni di reazione per far avvenire il *coupling* con **1**, potrebbe subire, similmente, l'attacco da parte dell'ammina in posizione C-7' e formare un'ATA-impurity. (Schema 2.5)



Schema 2.5 Ipotetica formazione delle ATA-impurities

Sono state avanzate due ipotesi circa la formazione del composto **2**: potrebbe essere un'impurezza già presente nell'intermedio **1**; o in alternativa potrebbe trattarsi di un prodotto secondario che si forma nell'ambiente di reazione durante lo *step* di *coupling* con il nucleo delle cefalosporine. A tale scopo si è reso necessario preparare uno standard di **2** per condurre delle analisi sui lotti di **1**. Sintetizzare una sufficiente quantità di **2** inoltre, permetterebbe di effettuare delle prove di *coupling* con i nuclei di interesse per avvalorare l'ipotesi della formazione delle *ATA-impurities* attraverso la via sopracitata (Schema 2.4); le impurezze così sintetizzate potrebbero essere purificate e sfruttate anch'esse come standard esterni per analizzare i lotti dei diversi API, garantendo la loro identificazione strutturale e rendendo possibile la determinazione del loro fattore di risposta relativo (RRF).

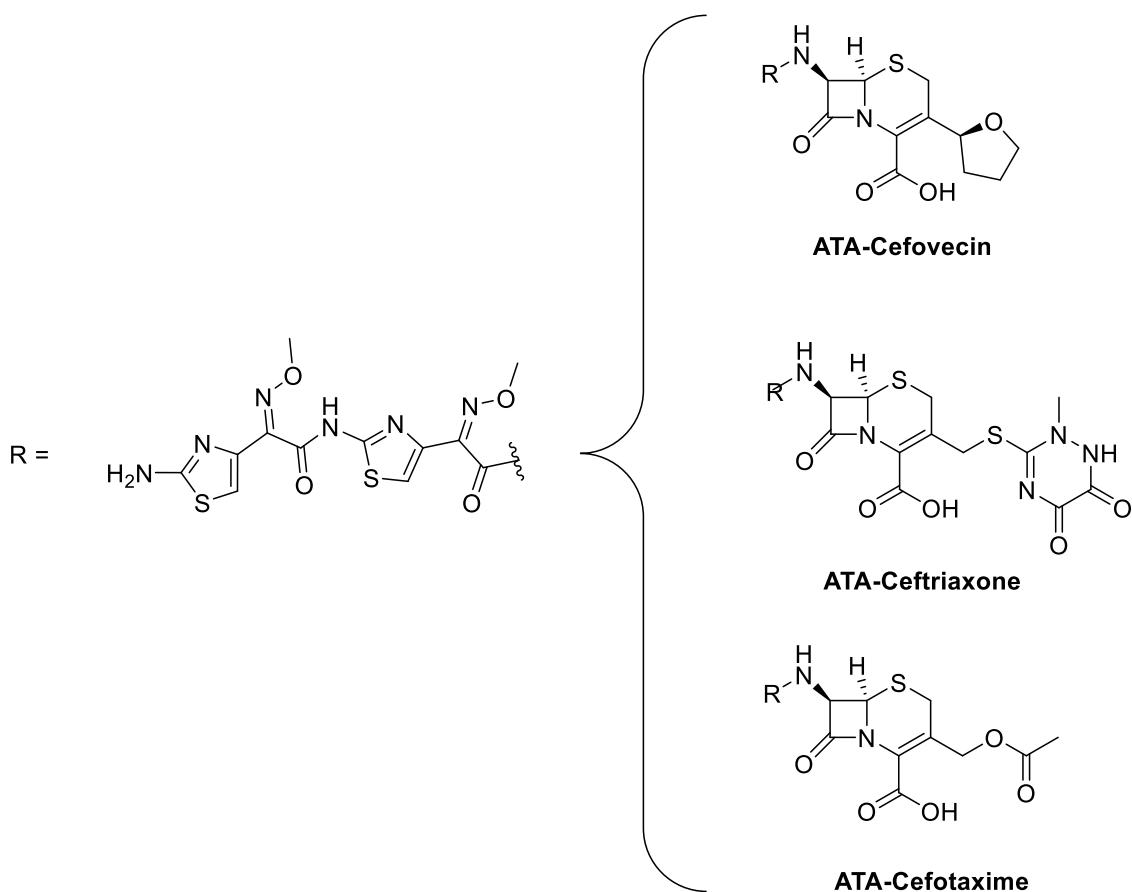
Per quanto riguarda una delle cefalosporine prodotte da ACS Dobfar, il Cefovecin, è stato necessario caratterizzare questo tipo di impurezza poiché era presente in una quantità superiore alla soglia di identificazione: la caratterizzazione è stata eseguita da un campione arricchito di ATA-cefovecin purificato tramite HPLC preparativa e l'analisi NMR ha permesso di confermare la struttura ipotizzata. (Schema 2.3) Non era stato però

determinato il suo fattore di risposta, poiché non era stata isolata una quantità sufficiente di standard di ATA-cefovecin.

2.4 Scopo della tesi

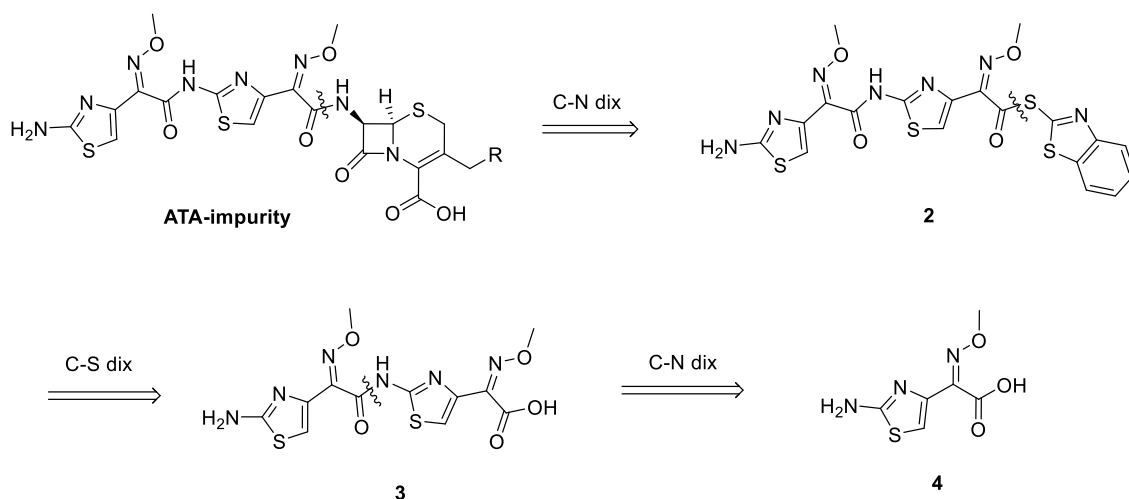
Durante la prima parte del mio percorso di tesi mi sono focalizzata sulla sintesi e la caratterizzazione di tre *ATA-impurities*: l'ATA-cefovecin, l'ATA-ceftriaxone e l'ATA-cefotaxime. Oltre alla sintesi degli standard di queste tre impurezze è risultato cruciale isolare anche il composto **2** per poter analizzare i lotti di intermedio **1**.

Una volta ottenuto il **2** è stato effettuato il *coupling* con i nuclei di queste tre cefalosporine, rispettivamente il 3-TH, il 7-ACT e il 7-ACA, per ottenere le tre impurezze sopracitate (Schema 2.6)



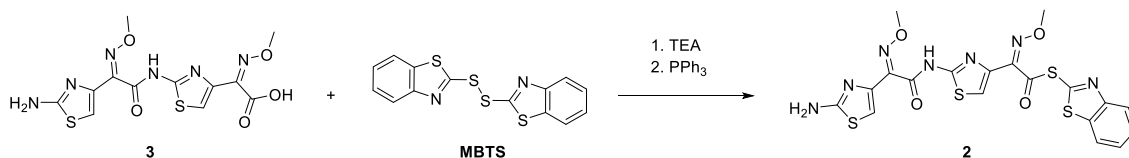
Schema 2.6 Formule di struttura di ATA-cefovecin, ATA-ceftriaxone e ATA-cefotaxime

L'analisi retrosintetica è illustrata nello schema 2.7.



Schema 2.7 Schema retrosintetico per le ATA-impurities

Il composto **2** può essere ottenuto dallo *(Z)*-2-(2-((*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid, indicato come composto **3**, mediante una tioesterificazione dell'acido carbossilico utilizzando il 2,2'-ditiobisbenzotiazolo, indicato con la sigla MBTS. (Schema 2.8)



Schema 2.8 Tioesterificazione dello *(Z)*-2-(2-((*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid con MBTS

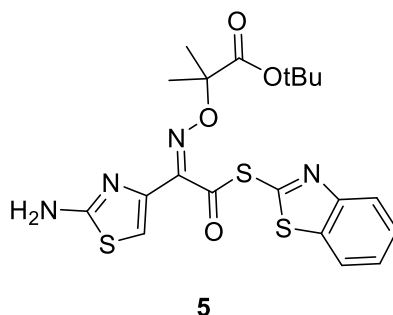
Per questa reazione è necessario impiegare un riducente come la fosfina per ridurre il disolfuro dell'MBTS ed ottenere il tioestere **2** come prodotto e MBT e trifenilfosfinossido come sottoprodotti.

Il composto **3** a sua volta è un dimero dello *(Z)*-2-(2-((*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetic acid, indicato come composto **4** (Schema 2.7). Lo step critico della sintesi è rappresentato dalla reazione di formazione del legame ammidico che coinvolge il gruppo amminico del composto **4**, il quale è dotato di scarsa nucleofilia. Nel paragrafo successivo sono trattate nel dettaglio le diverse strategie che sono state impiegate per effettuare questo *coupling*.

È importante notare che il composto **4** è commercialmente disponibile, viene impiegato come *starting material* nella produzione del composto **1**, mediante reazione di

tioesterificazione con MBTS, procedura analoga per convertire analogo il composto **3** in **2** (Schema 2.6). Dunque, la strategia sintetica per l'ottenimento delle *ATA-impurities* è basata sulla via produttiva delle cefalosporine corrispondenti, sostituendo lo *starting material* **4** con il suo dimero, il composto **3**.

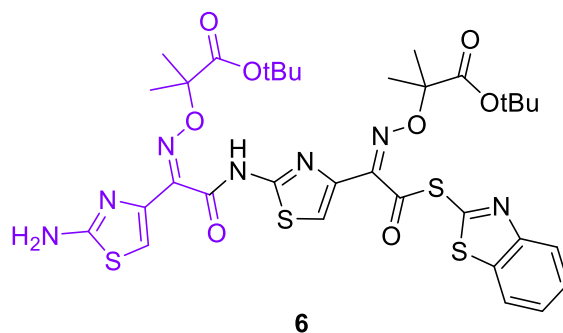
Nella seconda parte del mio percorso di tesi, mi sono focalizzata su un altro reagente acilante utilizzato per funzionalizzare la posizione C-7' dei nuclei cefalosporinici: il *tert-butyl (Z)-2-(((1-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate*. (Schema 2.9)



Schema 2.9 Formula di struttura del *tert-butyl (Z)-2-(((1-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate*

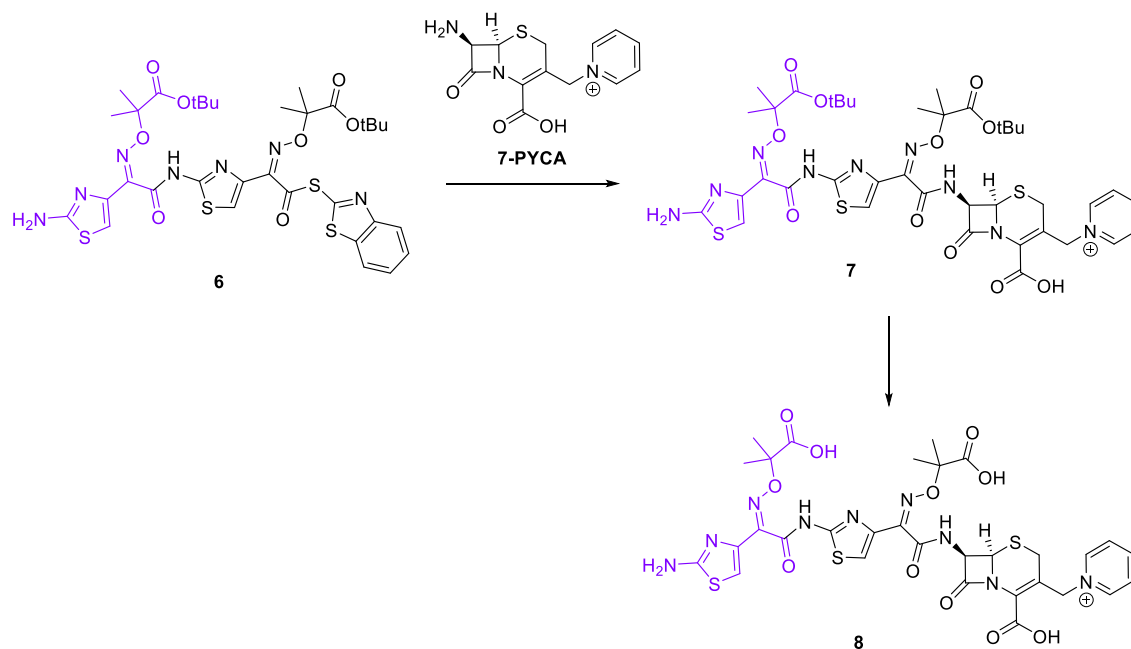
Come si evince dalla formula di struttura, il composto **5** possiede una reattività analoga a quella dell'**1**, poiché basata sul tioestere che libera MBT quando viene attaccato dall'ammina in posizione C-7' del nucleo delle cefalosporine; tuttavia, la catena laterale con cui vengono funzionalizzati possiede una struttura più complessa, in particolare in posizione dell'ossima.

Il **5** viene impiegato come intermedio nella sintesi della ceftazidima e si è ipotizzato che, parimenti alle cefalosporine nella cui produzione viene sfruttato l'**1**, si possa formare un'impurezza analoga alle *ATA-impurities* in cui in posizione C-7' è legato un dimero della catena laterale. L'origine di questa impurezza si suppone che sia connessa anche in questo caso alla dimerizzazione del composto **5** per formare il composto **6**. (Schema 2.10)



Schema 2.10 Formula di struttura del 2-(((Z)-1-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-((1-(benzo[d]thiazol-2-ylthio)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate

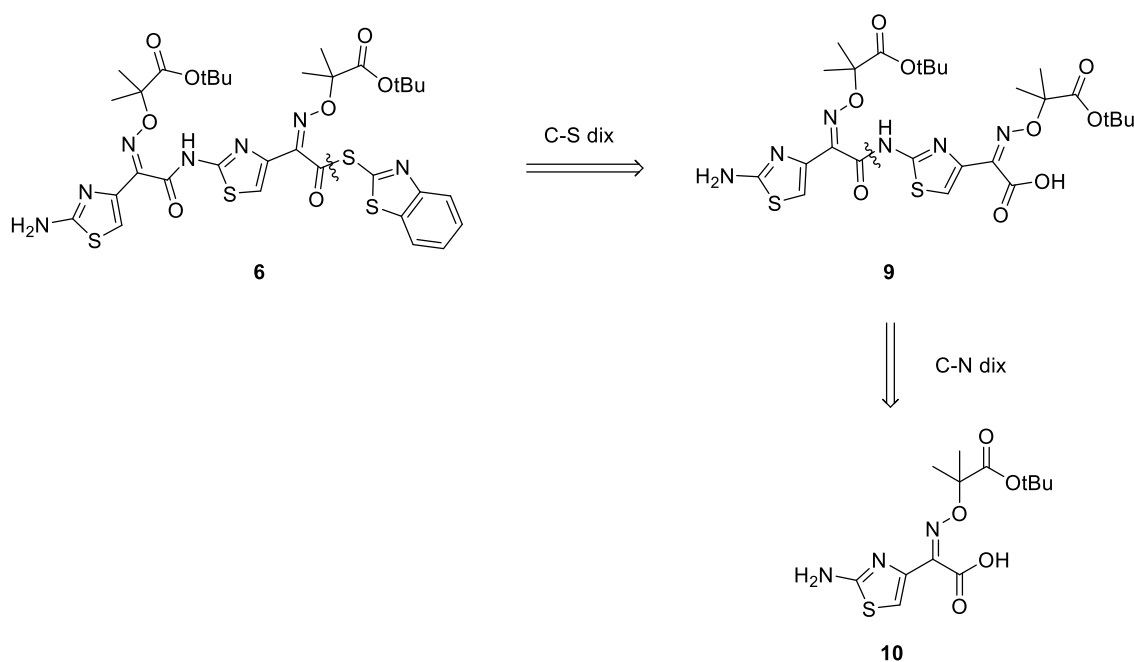
Analogamente a quanto è stato ipotizzato per le *ATA-impurities*, il composto **6** potrebbe legarsi al 7-PYCA, il nucleo della ceftazidima, formando l'impurezza **7**. L'ultimo step sintetico di questo principio attivo prevede infine l'idrolisi dell'estere terbutilico legato all'ossima; quindi, si potrebbe ipotizzare che se fosse presente il composto **7** nell'ambiente di reazione anche i suoi due gruppi esterei verrebbero idrolizzati per formare il composto **8**. (Schema 2.11)



Schema 2.11 Ipotesi formale di un'impurezza della ceftazidima

Alla luce di tali considerazioni, è stato scopo di questo lavoro di tesi sintetizzare il composto **6** per l'analisi dei lotti dell'intermedio **5** ed effettuare una prova di *coupling* con il 7-PYCA per ottenere uno standard di un'impurezza della ceftazidima.

La strategia retrosintetica per ottenere il **6** è analoga a quella del **2**: viene ricavato mediante tioesterificazione con MBT dallo (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetic acid, indicato come composto **9**, che a sua volta è il prodotto della dimerizzazione dello (Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetic acid, indicato come composto **10**. (Schema 2.12)



Schema 2.12 Retrosintesi del composto **6**

Anche in questo caso lo *step* critico è quello della dimerizzazione, poiché permane il problema della scarsa nucleofilia dell'ammina di **10**; inoltre l'estere terbutilico legato all'ossima rischia di idrolizzarsi se sottoposto a condizioni acide o basiche troppo aggressive, perciò alcune delle reazioni testate sul **4** sono state escluse per questo substrato.

3 Discussione dei risultati

3.1 Sintesi del composto 3

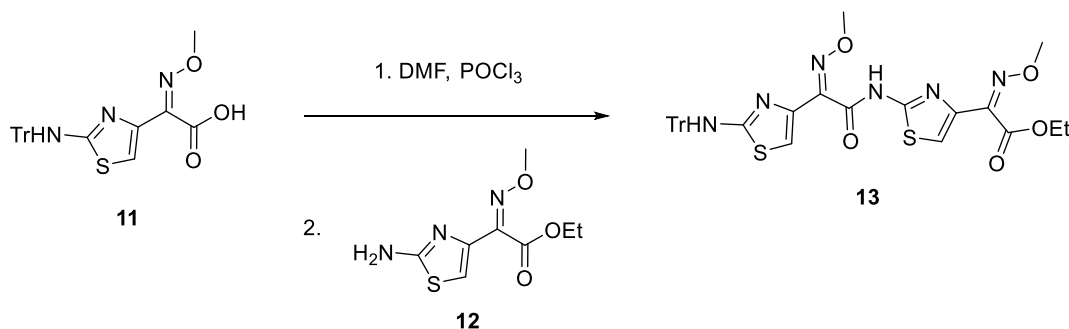
Il composto **3** è un dimero ottenuto tramite la formazione di un legame ammidico tra due molecole di **4**; tuttavia, la scarsa nucleofilia dell'ammina del monomero ha richiesto lo studio di una strategia sintetica idonea per la formazione della molecola di interesse.

Alla luce di tale considerazione, sono stati valutati due possibili approcci: i) l'attivazione dell'acido carbossilico; ii) la deprotonazione dell'ammina per aumentare la sua nucleofilia.

La prima strategia ha previsto uno *screening* di diversi agenti di *coupling*

Una prima prova è stata svolta utilizzando l'EDC per promuovere la condensazione tra lo *(Z)*-2-(methoxyimino)-2-(2-(tritylamino)thiazol-4-yl)acetic acid, analogo al **4**, ma con l'ammina protetta da un gruppo tritilico, e l'*ethyl (Z)*-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetate, ovvero l'estere etilico del **4**. Sono stati selezionati questi due substrati protetti per evitare problemi di trimerizzazione durante la reazione di *coupling*. Questa reazione avrebbe permesso di ottenere il composto **13**, che, a seguito dell'idrolisi dell'estere etilico e della deprotezione dell'ammina, avrebbe portato al prodotto desiderato **3**. Tuttavia, non si è rivelata una reazione efficace: si ipotizza che questo agente di *coupling* non sia in grado di attivare sufficientemente l'acido carbossilico, per tale ragione è stato scartato.

Utilizzando gli stessi substrati, è stata testata l'attivazione tramite il reattivo di Vilsmeier, generato in situ da DMF e POCl₃; anche in questo caso però non si è osservata la formazione del prodotto **13** e anche questa strategia di attivazione è stata scartata. (Schema 3.1)



Schema 3.1 Sintesi del composto *ethyl (Z)*-2-(methoxyimino)-2-(2-((*Z*)-2-(methoxyimino)-2-(2-(tritylamino)thiazol-4-yl)acetamido)thiazol-4-yl)acetate utilizzando il reattivo di Vilsmeier

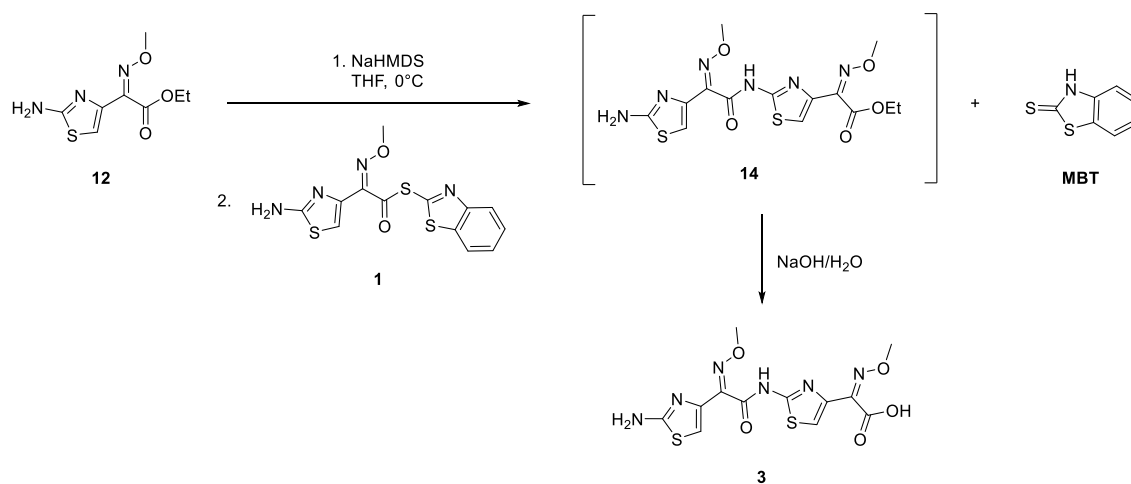
I tentativi fallimentari di attivazione dell'acido carbossilico hanno spinto a cambiare approccio e a condurre delle prove per aumentare la nucleofilia dell'ammina. Per raggiungere questo scopo è stata impiegata una base organica molto forte, la sodio esametildisilazide, NaHMDS, per deprotonarla e formare un'ammiduro molto reattivo; come *partner* per questo *coupling* è stato individuato il composto **1**, che è un buon elettrofilo.

L'NaHMDS però non può essere utilizzata per deprotonare l'ammina del composto **4**, poiché essendo presente anche un acido carbossilico libero reagirebbe con esso per primo, rendendo ancora più difficile una seconda deprotonazione con l'ammina. A tale scopo sono stati valutati diversi gruppi protettivi dell'acido carbossilico, per mascherare la sua reattività in presenza del reagente: l'estere etilico, il TMS e il TBDMS.

3.1.1 *Coupling* tra **12** e **1** via NaHMDS

La prima via sintetica funzionante si basa sul *coupling* tra **12** e **1**.

Il **12** è stato trattato con NaHMDS, che deprotona la funzione amminica, trasformandola in uno ione ammiduro. A tale intermedio, in seguito, è stato aggiunto goccia a goccia l'**1**, che subisce l'attacco nucleofilo dell'ammiduro, formando un legame ammidico e liberando MBT.



Schema 3.2 Sintesi di **3** utilizzando **12**, **1** e NaHMDS

Il dimero esterificato non isolato, indicato come composto **14**, è stato successivamente sottoposto a reazione di idrolisi basica, con formazione del composto di interesse **3**. (Schema 3.2)

Il grezzo di **3** subisce una purificazione mediante colonna cromatografica, per limitare il contenuto di impurezze e sottoprodotti che possono compromettere il passaggio sintetico successivo. È particolarmente rilevante rimuovere il composto **4**, derivante dalla degradazione dell'**1** o dall'idrolisi del **12** residuo, poiché consumerebbe reagente nello *step* di sintesi successivo formando **1**.

Sono riportate le prove per ottenere **3**; la resa è calcolata su due *step*, *coupling* ed idrolisi (tabella 3.1)

Tabella 3.1 Ottimizzazione della sintesi di **3**

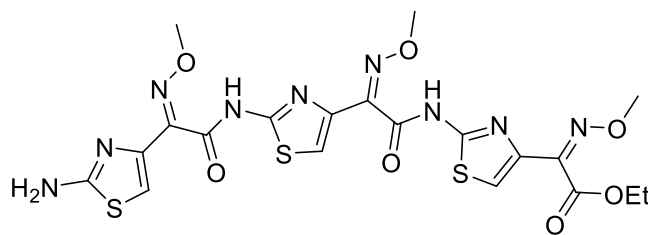
Prova	eq 12	eq NaHMDS	eq 1	T aggiunta NaHMDS (°C)	Resa %
1	1	1,1	1	0	10,8%
2	1	1,5	1	0	\
3	1	1,1	1,1	0	25,7%
4	1	1,1	1,1	-10	23,7%
5	1	1,1	1,1	-10	26,9%

La prima prova ha portato ad una resa piuttosto scarsa e considerando che erano presenti ancora **1** e **12** residui si è ipotizzato che la problematica fosse legata agli equivalenti di base, che dunque sono stati aumentati a 1,5; tuttavia, ciò ha provocato la degradazione totale dell'**1**, ottenendo **4** e MBT, che quindi non ha potuto reagire con il **12** per formare il prodotto (prova 2, tabella 3.1).

In seguito, per contrastare la degradazione di **1**, è stata effettuata una prova utilizzandone un lieve eccesso, con conseguente miglioramento della resa (prova 3, tabella 3.1).

Sono state poi valutate le migliori condizioni per l'aggiunta della base, prendendo in considerazione due parametri: la temperatura e il tempo di aggiunta di NaHMDS.

Le prove sono state condotte utilizzando 1 eq di **12** e 1,1 eq di NaHMDS in THF: in queste condizioni il composto **12**, oltre a deprotonarsi per formare lo ione ammiduro d'interesse, può reagire con sé stesso e dimerizzare, ottenendo il composto **14**, o trimerizzare, formando il composto **15** (Schema 3.3); inoltre, in minima parte, può idrolizzarsi e formare **4**.



15

Schema 3.3 Formula di struttura dell'ethyl (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(methoxyimino)acetate

Per valutare le condizioni migliori quindi si è considerata la percentuale di **12** residuo, stimata utilizzando l'area% all'HPLC, con l'obiettivo di massimizzarla per preservare il substrato e far avvenire il coupling con l'**1**. Viene calcolata con la seguente formula:

$$\mathbf{12\ residuo\%} = \frac{\text{area}_{12}}{\text{area}_{12} + \text{area}_{15} + \text{area}_4 + \text{area}_3} \cdot 100$$

Tabella 3.2 Prove di ottimizzazione dell'aggiunta di NaHMDS

Prova	T (°C)	t (min)	% 12 residuo
1	0	0	52,9%
2	0	15	52,2%
3	0	30	56,5%
4	10	30	35,1%
5	-10	30	76,8%

Le condizioni migliori si rivelano essere quelle della quinta prova: temperatura più bassa e aggiunta più lenta; entrambe permettono di ridurre la degradazione di **12** e di renderlo pertanto disponibile per il *coupling* con l'**1**. Queste condizioni, si sono rivelate efficaci per limitare le reazioni secondarie, idrolisi a formare **4** o trimerizzazione, a cui può andare incontro **12** in presenza di NaHMDS. Nel dettaglio, l'aggiunta veloce favorisce tutte e tre queste reazioni, mentre la temperatura più elevata facilita la dimerizzazione e trimerizzazione.

È importante notare che seppur il **14** sia il prodotto di interesse del *coupling* tra **12** e **1**, le condizioni di aggiunta della base che favoriscono la sua formazione (prova 1 e 4, tabella 3.2) promuovono anche la formazione di **15**.

Inoltre, nonostante le condizioni di aggiunta della base siano state ottimizzate per preservare lo *starting material* **12**, le prove successive (prove 4-5, tabella 3.1) non hanno avuto una resa significativamente più alta; si ipotizza che possa essere dovuto alla progressiva degradazione dell'NaHMDS, dovuta alla sua particolare sensibilità all'aria, che ha compromesso quindi la sua reattività.

Questa strategia sintetica presenta diverse criticità, attribuibili all'inefficienza dello *step* di *coupling*. L'NaHMDS è una base molto aggressiva e l'ammiduro che genera è una specie altamente instabile: questo rende la reazione difficile da controllare, suscettibile alla formazione di sottoprodotti indesiderati e alla degradazione degli *starting material* da parte della base; pertanto, risulta necessario uno *step* di purificazione su colonna una volta sintetizzato il composto **3**.

La reazione di *coupling*, inoltre, non va a completamento: non vengono totalmente consumati i reagenti di partenza (il **12** e l'**1**) e prolungare il tempo di reazione comporta la degradazione del composto **1** a formare **4** e MBT.

Per quanto concerne lo *step* di purificazione è stata sfruttata la cromatografia a fase inversa, utilizzando una resina polimerica a base di stirene e divinilbenzene come fase stazionaria e l'acqua come eluente; questo per via della presenza di gruppi funzionali notevolmente polari nella molecola, quali l'acido carbossilico e l'ammina, che rendono inadeguata la purificazione su silice.

Le prime colonne sono state effettuate con un'eluizione isocratica, impiegando come fase mobile solo l'acqua. La colonna isocratica, tuttavia, non si è rivelata adatta allo scopo, poiché il composto **3** faticava ad eluire e questo ha portato alla raccolta di numerose frazioni; è stato pertanto necessario introdurre un gradiente di eluizione, utilizzando delle miscele di acqua ed acetonitrile. Per isolare il prodotto, le frazioni pulite sono state raccolte, è stato rimosso l'acetonitrile mediante evaporazione a pressione ridotta, e il pH della soluzione acquosa è stato portato a 3 per promuovere la precipitazione del composto **3**. Questo tipo di cristallizzazione comporta tuttavia, la presenza di elevate percentuali di acqua nel solido, con conseguenti complicazioni nello *step* successivo, che richiederebbe delle condizioni anidre.

Nonostante il prodotto sia stato sottoposto ad essiccamento in stufa anche per diversi giorni, la percentuale di acqua nel prodotto è sempre rimasta costante. Questo ha portato all'ipotesi che il composto **3** ottenuto fosse un cristallo idrato.

Sono stati valutati alcuni solventi organici (DCM, acetato di etile, toluene, THF, isopropanolo ed etanolo) per sciogliere il prodotto e anidrificare la soluzione con degli agenti essiccanti come Na_2SO_4 o MgSO_4 . Infatti, qualora **3** sia stato effettivamente ottenuto sotto forma di cristallo idrato, scioglierlo in un solvente organico permetterebbe una rimozione più efficace dell'acqua: la dissoluzione romperebbe il reticolo cristallino e libererebbe le molecole d'acqua che in parte lo costituiscono. Tali molecole sarebbero poi adsorbite da agenti essiccanti, che possono essere facilmente filtrati, e il solvente andrebbe rimosso tramite evaporazione a pressione ridotta o distillazione, ottenendo così un cristallo con una percentuale d'acqua inferiore.

Tuttavia, non si è potuta applicare questa strategia per via della scarsa solubilità di **3** nei solventi sopracitati.

Un ulteriore svantaggio di questa strategia sintetica è la necessità di utilizzare il composto **12** al posto del **4**, il che comporta l'aggiunta di uno *step* di idrolisi per ottenere il prodotto desiderato. Nonostante l'idrolisi avvenga con una buona conversione, si tratta comunque di uno *step* aggiuntivo, che determina l'abbassamento della resa totale.

3.1.2 Sililazione del composto **4**

In alternativa all'impiego del **12** come reagente di partenza è stata valutata anche l'ipotesi di proteggere l'acido carbossilico del composto **4** tramite sililazione, per poi procedere al *coupling* utilizzando NaHMDS e **1**.

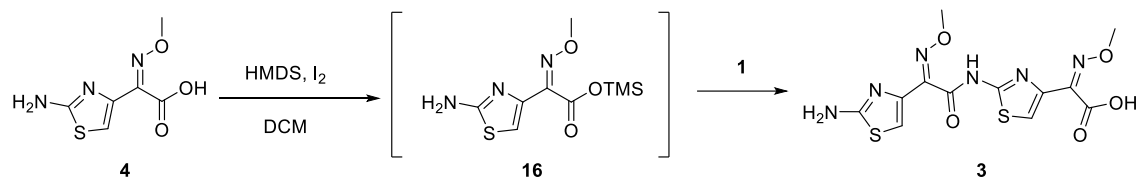
Sono stati testati diversi agenti sililanti: TMS-Cl, HMDS e TBDMS-Cl.

Il TMS è un gruppo protettivo instabile in colonna HPLC, poiché la fase acquosa acida che viene utilizzata per seguire la reazione è sufficiente per idrolizzarlo; pertanto, l'HPLC non è un metodo valido per monitorare la sililazione mediata dai primi due reagenti.

La labilità del TMS, tuttavia, potrebbe essere considerato un vantaggio per la sintesi di **3**, poiché il *work-up* acquoso alla fine della reazione *coupling* permette una sua rimozione agevole, senza dover ricorrere ad ulteriori *step* sintetici.

Il passaggio di protezione è stato monitorato mediante osservazione del cambio di aspetto della miscela di reazione, in particolare la presenza o meno di un solido in sospensione.

Il composto **4**, infatti, non è solubile in THF, ma una volta sililato (composto **16**, schema 3.4) si solubilizza nel solvente di elezione, dando origine ad una soluzione limpida, indice che la reazione è andata a completamento. Questo non si è verificato quando è stato utilizzato il TMS-Cl come sililante, segno che la protezione non fosse avvenuta (prove 1 e 2, tabella 3.3); viceversa, nelle prove in cui è stato utilizzato HMDS era tutto, o parzialmente, in soluzione (prove 4, 5 e 6, tabella 3.3).



Schema 3.4 Schema di reazione della sintesi del **3** tramite sililazione del **4** e coupling con l'**1**

A seguito della protezione sono stati aggiunti 1,1 eq di NaHMDS e 1,1 eq di **1** per promuovere lo *step* di *coupling*; tuttavia, iniettando all'HPLC, erano visibili solo il picco del **4** e dell'MBT, non era visibile il picco del prodotto **3** e quello del reagente **1** era praticamente scomparso, segno di una sua possibile degradazione ad opera della base. Pertanto, la protezione con il TMS non si è rivelata una strategia efficace per ottenere il prodotto **3**.

Un altro agente sililante che è stato testato è il TBDMS-Cl: in questo caso è stato possibile monitorare la reazione tramite HPLC poiché il TBDMS è più stabile del TMS e quindi non rischia di essere idrolizzato in colonna.

Tuttavia, non si è dimostrata una strategia efficace poiché non sembra essere avvenuta la reazione di protezione e lo *starting material* **4** sembra andare incontro a degradazione. (Prova 3, tabella 3.3)

Tabella 3.3 Prove di sililazione **4**

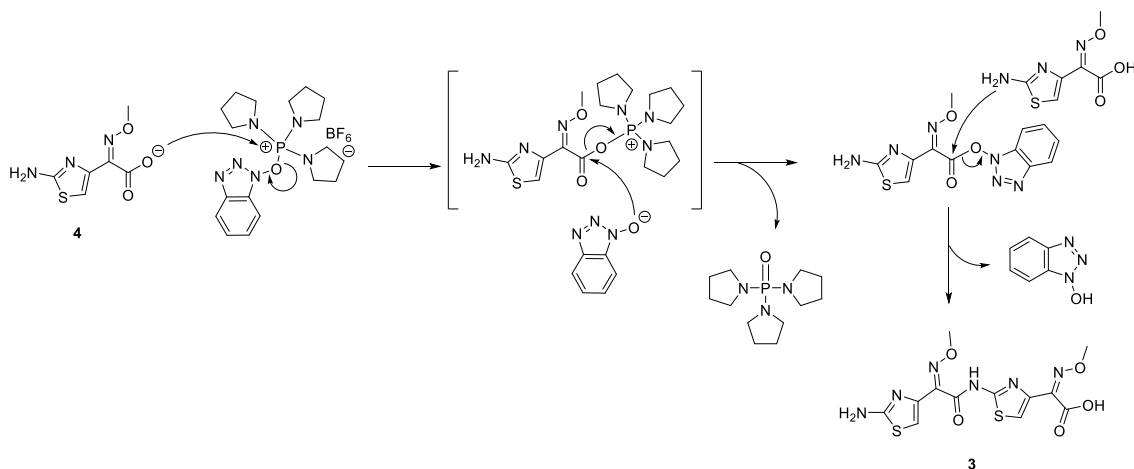
Prova	Sililante	eq Sililante	Base	eq Base	Solvente
1	TMS-Cl	1,1	TEA	1,1	THF
2	TMS-Cl	1,1	TEA	1,1	THF
3	TBDMS-Cl	1,2+1	Imidazolo	2,5+1	DMF
4	HMDS, I ₂	2,5	\	\	DCM
5	HMDS, I ₂	2,5	\	\	DCM
6	HMDS, I ₂	2,5	\	\	DCM

In conclusione, queste tre strategie di sililazione non si sono rivelate sinteticamente utili ai fini dell'ottenimento di **3**, poiché in alcuni casi non è avvenuta la reazione di protezione e negli altri, nonostante l'acido carbossilico **4** fosse protetto, non è avvenuto il coupling con **1**, che si è semplicemente degradato.

3.1.3 Homocoupling di **4** via PyBOP

La seconda via sintetica che ha garantito l'ottenimento di **3** ha previsto l'impiego del PyBOP, un sale di fosfonio, come agente di *coupling*.

Il PyBOP attiva l'acido carbossilico del composto **4**, a cui lega un idrossibenzotriazolo, il quale, essendo un eccellente gruppo uscente, rende il carbonio carbossilico più elettrofilo, quindi predisposto all'attacco dell'ammina di una seconda molecola **4**. (Schema 3.5)



Schema 3.5 Meccanismo di reazione del PyBOP

Come prodotti secondari si formano l'idrossibenzotriazolo e il tripirrolidin-fosfinossido. Quando si impiegano gli agenti di *coupling* tra due molecole zwitterioniche che possiedono sia una funzione amminica che una carbossilica può essere necessario proteggere i due gruppi funzionali che non sono interessati nella formazione del legame ammidico.

In questo caso, trattandosi di un *homocoupling*, non è richiesta la protezione dell'acido carbossilico poiché il PyBOP può attivare solo il composto **4**; per quanto riguarda l'ammina, ci sarebbe il rischio che non proteggendola si ottenga la formazione anche di un trimero; tuttavia, è stato sperimentalmente dimostrato che ciò non si verifica.

Sono state effettuate diverse prove per individuare le condizioni di reazione migliori. (Tabella 3.4) Aumentare gli equivalenti di PyBOP non ha portato ad un miglioramento della resa (prova 3), mentre condurre la reazione a 70°C in MeTHF è risultato in un notevole peggioramento (prova 4).

Tabella 3.4 Prove per ottimizzare il coupling del **4** con PyBOP

Prova	eq 4	eq PyBOP	Solvente	T (°C)	Resa%	% 4 residuo
1	2	1	THF	60	34,8%	14%
2	2	1	THF	60	45,8%	5,7%
3	2	1,2	THF	60	44,0%	6,9%
4	2	1	MeTHF	70	25,6%	6%

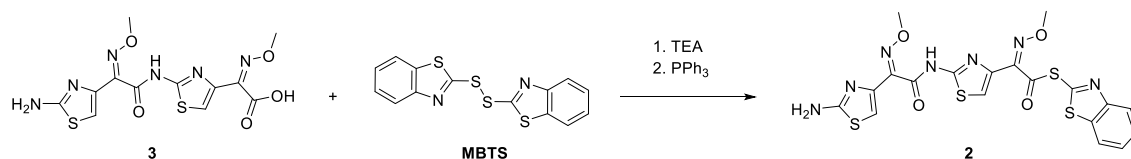
Questo metodo per ottenere il composto **4** è risultato essere molto più efficiente rispetto al primo menzionato: le rese di reazione sono notevolmente più alte e tramite il *work-up* è possibile isolare il prodotto con un grado di purezza elevato.

Inoltre, poiché il reagente di partenza è il **4** e non il **12**, il tutto avviene in un unico passaggio, senza dover ricorrere ad uno *step* di idrolisi.

Permane però la problematica legata alla percentuale d'acqua contenuta nel prodotto, che risulta essere troppo elevata per lo *step* successivo, poiché anche in questo caso il dimero viene cristallizzato da una soluzione acquosa acida e sono risultati inefficaci i tentativi di essiccamento in stufa.

3.2 Sintesi del composto **2**

Una volta ottenuto, il composto **3** è stato sottoposto alle stesse condizioni di reazione per la produzione di **1** per isolare il composto **2**. Come anticipato, si tratta di una tioesterificazione con MBTS, in cui viene impiegata la trifenilfosfina per ridurre il disolfuro e la TEA come base.



Schema 3.6 Sintesi di **2**

La prima prova (prova 1, tabella 3.5) è stata condotta utilizzando gli stessi equivalenti di reagente che vengono utilizzati per la preparazione di **1**: 1,1 eq MBTS, 1 eq TEA, 1,2 eq PPh₃; tuttavia, la reazione non procedeva e le quantità di reagente sono state aumentate gradualmente fino al raggiungimento di 3 eq ciascuno. Tutte le prove successive (prove 2-7, tabella 3.5), pertanto, sono state eseguite fin da subito impiegando 3 eq di MBTS, TEA e PPh₃.

Si ipotizza che la motivazione per l'utilizzo di questo largo eccesso di reagente risieda nell'inferiore reattività di **3** rispetto a **4** e nella percentuale d'acqua contenuta nel substrato decisamente più elevata, che influisce molto in una reazione sensibile all'umidità come questa.

Da precedenti esperimenti, risulta che la condizione ottimale per produrre l'**1**, necessita di uno *starting material*, il composto **4**, con percentuale d'acqua < 1% (nello specifico quello del lotto utilizzato per le prove di *coupling* ha una percentuale d'acqua, determinata tramite titolazione con Karl Fischer, pari allo 0,25%), viceversa, il composto **3** ha un quantitativo d'acqua che varia dal 5% fino ad arrivare al 10%. Nonostante ciò, l'impiego di reagenti in eccesso garantisce una completa conversione nel prodotto di interesse, con una percentuale di **3** residuo inferiore all'1%.

Il punto critico di questo *step* sintetico è la cristallizzazione del prodotto: una volta che la reazione è terminata, si abbassa la temperatura a 0 °C e si dovrebbe osservare la precipitazione di **2**, che viene quindi filtrato e lavato con metanolo a freddo per eliminare l'MBT e il trifenilfosfinossido residui; tuttavia, in alcune prove, la cristallizzazione è risultata difficoltosa oppure non è avvenuta affatto. (Tabella 3.5)

In particolare, in entrambe le prove effettuate con **3** sintetizzato via PyBOP (prove 4-5, tabella 3.5) non è stato possibile isolare il prodotto: si ipotizza che possa essere causato dalla mancanza di un passaggio intermedio di purificazione su colonna, che non ha permesso di eliminare delle impurezze non UV visibili o sali potenzialmente interferenti con la cristallizzazione.

Effettuare un cambio di solvente da diclorometano a metanolo non si è rivelata una strategia efficace poiché il composto **2** si degrada prima che possa avvenire la precipitazione, formando l'estere metilico di **3**: il carbonile attivato di **2** subisce attacco nucleofilo dal solvente, eliminando MBT.

Tabella 3.5 Prove per ottimizzare la sintesi di 2

Prova	Sintesi di 3	Cristallizzazione	Resa %
1	via NaHMDS	avvenuta	31,0%
2	via NaHMDS	avvenuta	64,0%
3	via NaHMDS	avvenuta	61,5%
4	via PyBOP	\	\
5	via PyBOP	\	\

Tuttavia nelle prove in cui la precipitazione è avvenuta (prove 1-3, tabella 3.5) è stato possibile isolare il prodotto con un elevato grado di purezza. Come già anticipato, sintetizzare **2** ha permesso di fornire uno standard con cui analizzare i lotti di **1**. (Tabella 3.6)

Tabella 3.6 Analisi dei lotti di 1

Lotto	Quantità di 2
1	0,014%
2	0,013%
3	0,007%
4	0,029%
5	0,036%
6	0,020%
7	0,030%
8	0,027%
9	0,061%

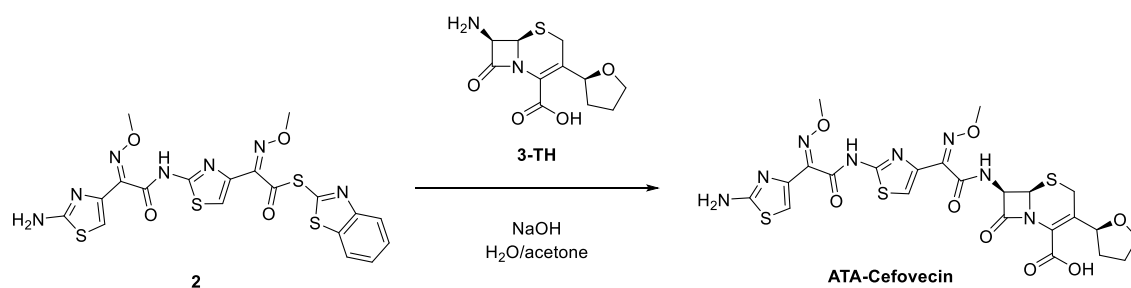
I lotti sono stati analizzati all'HPLC, utilizzando il metodo analitico specifico per il composto **1**, i risultati espressi in tabella sono le aree percentuali del picco di **2**. Come si può dedurre dai dati, le percentuali di **2** nei diversi lotti analizzati sono esigue e non si ritiene che possano costituire l'origine delle *ATA-impurities*. Pertanto, si suppone che la loro formazione avvenga anche successivamente nello step di coupling con il nucleo delle cefalosporine.

3.3 Sintesi delle ATA-Cefalosporine

Analogamente a quanto è stato fatto per la sintesi di **2**, le *ATA-impurities* sono state ottenute impiegando le stesse condizioni di reazione utilizzate per la sintesi delle diverse cefalosporine, ma sostituendo il composto **1** con il **2**.

3.3.1 Sintesi dell'ATA-Cefovecin

La prima ATA-cefalosporina ad essere stata sintetizzata è l'ATA-cefovecin, facendo reagire il composto **2** con il nucleo 3-TH. Avendo seguito la metodica per la produzione del cefovecin è stato utilizzato 1 eq di 3-TH e 1,12 eq di **2**; tuttavia la presenza di una percentuale residua del composto **2** residuo, ha richiesto l'aggiunta di 0,5 eq di 3-TH per portare la reazione a completamento, con una percentuale di **2** residuo inferiore all'1% (prove 2-3, tabella 3.6).



Schema 3.7 Sintesi ATA-cefovecin

La modifica principale rispetto al metodo originale è nel *work-up*: a fine reazione si aggiunge acetone per promuovere la cristallizzazione del cefovecin, tuttavia l'ATA-cefovecin essendo più lipofilo ha una solubilità maggiore in acetone e quindi non si è osservata alcuna precipitazione. Per isolare il prodotto, pertanto, sono stati valutati due approcci diversi: la liofilizzazione e la precipitazione da fase acquosa acidificando a pH=4. (Tabella 3.6)

Tra i due metodi il migliore si è rivelato la liofilizzazione, poiché l'ATA-cefovecin ha subito in parte una degradazione in ambiente acido e questo ha portato ad ottenere un prodotto più impuro. È importante sottolineare che liofilizzando il prodotto, i sali contenuti nella fase acquosa costituiscono parte del peso del solido finale, mentre ciò non accade se il solido viene fatto cristallizzare acidificando, poiché questi rimarranno nelle acque madri.

Alla luce di queste considerazioni, non è sensato paragonare le rese tra le prove in cui il solido è stato liofilizzato con quella in cui è stato fatto cristallizzare acidificando, poiché la resa nelle prove con liofilizzazione è ponderale ed è più alta di quella reale, tenendo presente che non è stato determinato il titolo del solido e dunque il quantitativo di sali inorganici presenti.

Anche liofilizzando però era comunque presente del 3-TH residuo, dunque è stato necessario un passaggio di purificazione su colonna impiegando come fase stazionaria una resina polimerica a base di stirene e divinilbenzene e come fase mobile miscele di acqua e acetonitrile, effettuando l'eluizione con un gradiente; le frazioni pulite sono state raccolte e liofilizzate nuovamente.

Tabella 3.6 Prove per la sintesi di ATA-Cefovecin

Prova	eq 2	eq 3-TH	<i>Work-up</i>
1	1,12	1	Precipitazione acidificando
2	1,12	1 + 0,5	Liofilizzazione
3	1,12	1 + 0,5	Liofilizzazione

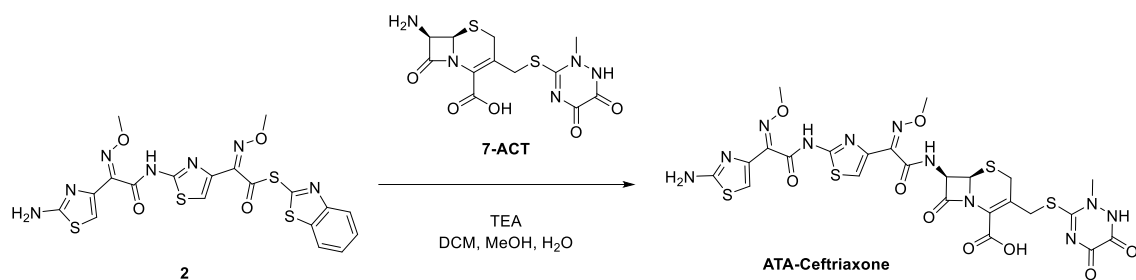
L'ATA-Cefovecin puro è stato analizzato nel sistema HPLC specifico per l'analisi delle impurezze del cefovecin, confermando il suo tempo di ritenzione. Anche l'analisi NMR ha confermato la sua struttura,

Il solido puro permetterà la sua standardizzazione e determinazione dell'RRF, assicurando che l'impurezza si trovi al di sotto dei limiti di qualificazione.

3.3.2 Sintesi dell'ATA-ceftriaxone e ATA-cefotaxime

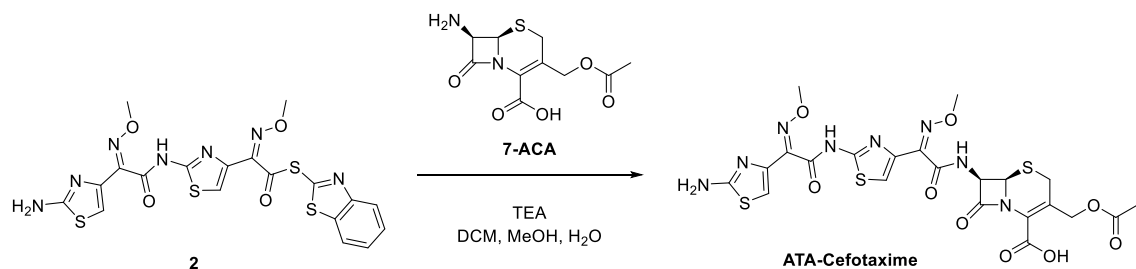
Per sintetizzare l'ATA-ceftriaxone e l'ATA-cefotaxime, invece di utilizzare gli equivalenti di *starting material* indicati nelle procedure dei corrispondenti API, sono stati impiegati 1 eq di composto **2** e 1 eq di 7-ACT/7-ACA;

L'utilizzo di queste quantità di reagenti ha permesso alla reazione di andare a completamento, con una percentuale di **2** residuo inferiore all'1%.



Schema 3.8 Sintesi ATA-ceftriaxone

Nel caso dell'ATA-ceftriaxone è stato necessario fare una modifica nel *work-up*, nel dettaglio non è stato possibile effettuare una cristallizzazione da acetone, come previsto da procedura del ceftriaxone, in quanto l'ATA-impurezza possiede un'elevata solubilità in tale solvente. Inoltre, forti dell'esperienza con l'ATA-cefovecin, non è stata effettuata la precipitazione in ambiente acido; pertanto la liofilizzazione si è rivelata la procedura di isolamento migliore per ottenere il prodotto di interesse.



Schema 3.9 Sintesi ATA-cefotaxime

Nel caso dell'ATA-cefotaxime il prodotto è stato isolato acidificando esattamente come da procedura per la sintesi del cefotaxime stesso; tuttavia, anche in questo caso, sono state apportate delle modifiche alla procedura iniziale, dovute alla più bassa polarità di questa impurezza rispetto al suo principio attivo corrispondente.

In primo luogo, a fine reazione il cefotaxime viene estratto dalla fase organica facendo dei lavaggi con acqua a 3-5°C, ma per estrarre l'ATA-cefotaxime sono stati necessari quattro lavaggi anziché due.

Una volta estratto il principio attivo, prima di procedere con l'acidificazione, si aggiungono acetato di etile e isopropanolo, ma nel caso dell'ATA-cefotaxime hanno causato una perdita abbassato la resa a causa della sua maggiore solubilità nei solventi organici, dunque sarebbe stato meglio ometterli.

Tabella 3.7 Prove per la sintesi di ATA-ceftriaxone e ATA-cefotaxime

Prova	eq 2	eq nucleo	Work-up
1	1	1	Liofilizzazione
2	1	1	Precipitazione acidificando

Anche in questo caso è rilevante quanto discusso precedentemente riguardo i prodotti liofilizzati: non avendo determinato il titolo di questi solidi la resa calcolata è superiore a quella reale, poiché non tiene conto della quantità di sali residui dalla liofilizzazione, pertanto non è sensato paragonare la resa ponderale a quella di altre prove.

Per queste due impurezze non è stata necessaria una purificazione su colonna cromatografica come per l'ATA-cefovecin: i due solidi isolati avevano un grado di purezza sufficiente per degli standard a scopo identificativo.

Entrambe le impurezze sono state caratterizzate iniettandole nel sistema HPLC di riferimento dei rispettivi API, mostrando un tempo di ritenzione corrispondente a quello delle *ATA-impurities*, inoltre la loro struttura è stata confermata tramite NMR. I due campioni sintetizzati potranno essere standardizzati per poi ricavare il fattore di risposta relativo.

3.4 Sintesi del composto 9

La seconda parte del progetto ha riguardato la sintesi del dimero del composto **5**, un agente acilante come l'**1**, impiegato per funzionalizzare il nucleo delle ceftazidima, il cui dimero potrebbe dare origine a un'impurezza analoga alle *ATA-impurities*.

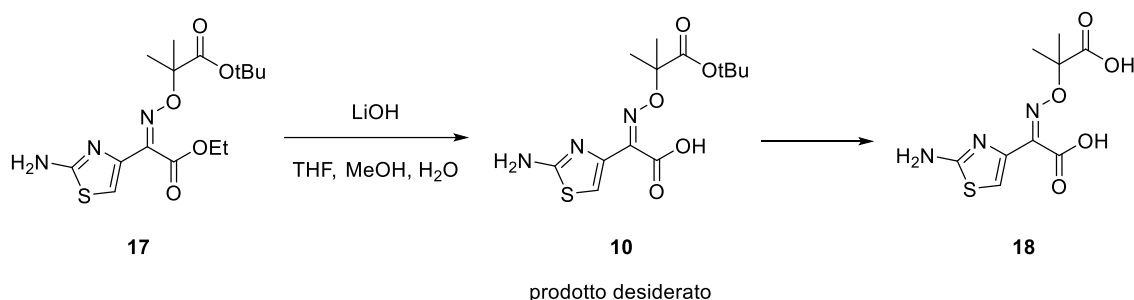
La strategia utilizzata per sintetizzarlo è la stessa seguita per il **2**: ottenere il dimero del **10**, l'acido carbossilico precursore del composto **5**, e attivarlo facendo una tioesterificazione con MBTS.

Il **10** però è un substrato con una struttura più complessa del **4**, in particolare presenta un estere terbutilico legato all'ossima che potrebbe andare incontro ad idrolisi; per tale ragione, la strategia sintetica che ha previsto l'impiego di NaHMDS per deprotonare l'ammina è stata esclusa per questo substrato.

Sono stati valutati diversi agenti di coupling per poter definire le condizioni di reazione ideali; avendo però a disposizione solo il *tert-butyl (Z)-2-(((1-(2-aminothiazol-4-yl)-2-ethoxy-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate*, ovvero l'estere etilico del **10**, è

stato prima necessario mettere a punto un metodo efficace per idrolizzarlo selettivamente, lasciando intatti l'estere terbutilico.

3.4.1 Idrolisi del composto **17**



Schema 3.10 Idrolisi del tert-butyl (Z)-2-(((1-(2-aminothiazol-4-yl)-2-ethoxy-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate

L'aspetto cruciale dell'idrolisi del composto **17** è la selettività verso l'estere etilico in presenza di uno terbutilico, per raggiungere questo scopo sono state testate diverse condizioni. (Tabella 3.8)

Inizialmente come base è stata utilizzata l'NaOH, che si è rivelata troppo aggressiva, poiché oltre ad idrolizzare l'etile, ha idrolizzato ulteriormente parte del **10** ottenuto, fornendo lo (Z)-2-(((2-aminothiazol-4-yl)(carboxy)methylene)amino)oxy)-2-methylpropanoic acid, indicato come composto **18**, già dopo 2 ore di reazione (prova 1). Sono state anche valutate le stesse condizioni di reazione usate per idrolizzare il composto **14**, ma il **17** non è solubile in acqua e in sospensione la reazione non procede; pertanto, è stato necessario aggiungere come solvente il THF per solubilizzare il substrato (prova 2). Il LiOH si è dimostrato essere la base più adatta poiché idrolizza il terbutile più lentamente; tuttavia, anche la temperatura si è rivelata un parametro influente, poiché a 55 °C il terbutile si idrolizza già dopo 30 minuti di reazione. (prova 3). La resa è migliorata notevolmente nel caso della reazione svolta a temperatura ambiente (prova 4). Sono state poi effettuate delle prove a bassa temperatura, a 5 °C e a 10 °C, per cercare di evitare del tutto l'idrolisi del terbutile (prove 5 e 6); tuttavia, non si è rivelata una strategia efficace, in quanto i tempi di reazione si allungavano e avveniva comunque la degradazione del **10**.

Da tali esperimenti è emersa l'instabilità del composto **10** nell'ambiente di reazione, anche a basse temperature, con formazione di **18**; di conseguenza per ovviare alla

formazione del sottoprodotto è fondamentale *quenchare* la reazione non appena va a completamento, portando il pH alla neutralità. Questo ha influito sulla resa di alcune prove in cui il *work-up* non è stato eseguito a conclusione della reazione, promuovendo una parziale degradazione del prodotto ottenuto (prove 3 e 5).

Sono state così definite le condizioni ideali: LiOH come base, THF, MeOH, H₂O come solventi e temperatura ambiente, prestando attenzione a neutralizzare immediatamente la base una volta conclusa la reazione per evitare la degradazione del prodotto (prove 7-9).

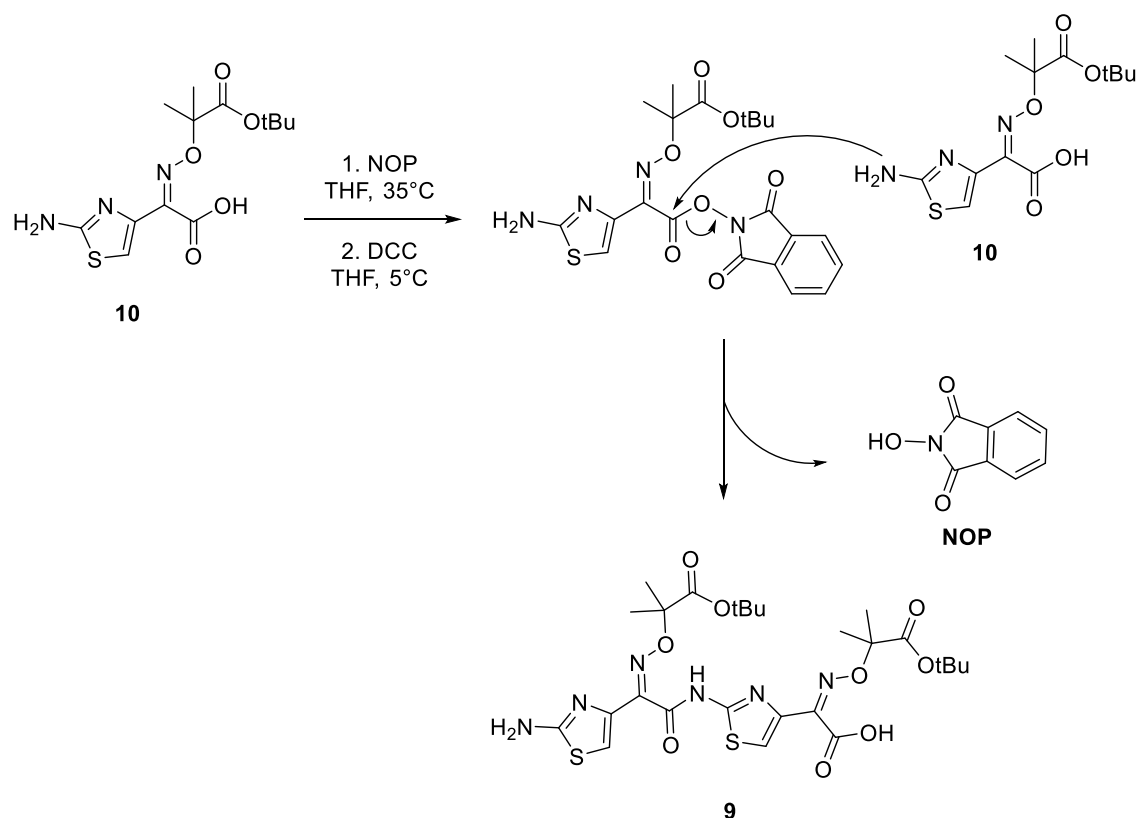
Tabella 3.8 Prove per l'ottimizzazione dell'idrolisi di **17**

Prova	Base	Solvente	T (°C)	Work-up	Resa %
1	NaOH	THF, MeOH, H ₂ O	55	Non è stato isolato	\
2	NaOH	H ₂ O	55	\	\
3	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	55	Non svolto immediatamente	27,7%
4	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	25		69,8%
5	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	5	Non svolto immediatamente	56,7%
6	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	10		72,3%
7	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	25		74,5%
8	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	25		69,6%
9	LiOH	THF, MeOH, H ₂ O	25		72,8%

3.4.2 Screening degli agenti di *coupling* per il composto **10**

Come già anticipato, il **10** è un substrato più complesso da trattare per via dell'estere terbutilico legato all'ossima, che rischia di idrolizzarsi; dunque, sono stati valutati diversi agenti di *coupling* in grado di promuovere la reazione, evitando acidi o basi forti (tabella 3.9). Fra questi è stata selezionata la DCC, uno degli agenti di *coupling* più economici, impiegata sia in presenza di NOP, per generare l'estere attivo (prova 1), che di DMAP, per promuovere un'ammidazione *Steglich-like* (prova 3). Tuttavia, entrambe le strategie si sono rivelate fallimentari: nel caso della DCC con il NOP il passaggio di attivazione è avvenuto con successo, poiché l'analisi all'HPLC-MS ha confermato la formazione dell'estere attivato con NOP (Schema 3.11), ma si suppone che non fosse sufficientemente

elettrofilo per subire un attacco da parte dell'ammina scarsamente reattiva del **10**; mentre nella prova con la DCC e la DMAP non è avvenuto nemmeno il passaggio di attivazione.



Schema 3.11 Meccanismo dell'attivazione con DCC e NOP

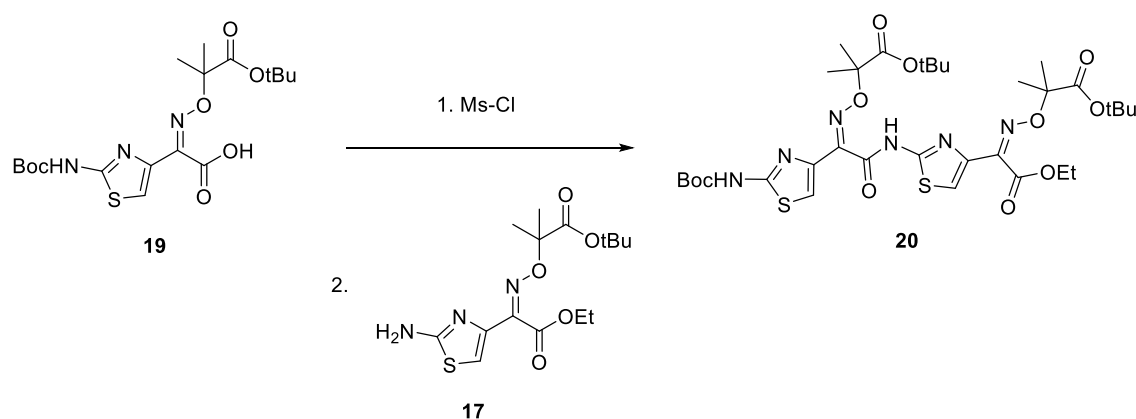
È stata testato anche l'HBTU (prova 4), un reattivo che, come il PyBOP, attiva gli acidi carbossilici, a cui lega un idrossibenzotriazolo: è avvenuta l'attivazione del **10**, ma non la sua dimerizzazione.

Tabella 3.9 Prove di coupling per ottenere il **9**

Prova	Starting material	Agente coupling	T (°C)	Solvente
1	10 (2 eq)	NOP (1 eq), DCC (1,5 eq)	5	THF
2	10 (2 eq)	DCC (1,1 eq), DMAP (5%)	5	THF
3	10 (2 eq)	HBTU (1,3 eq)	80	DMF
4	19 (1,1 eq), 17 (1 eq)	Ms-Cl (1,19 eq)	tra -10 e 0	DMAC, ACN
5	10 (1 eq), 17 (1,2 eq)	PyBOP (1,4 eq)	60	THF

E' stata valutata anche una strategia alternativa con substrati diversi dalla molecola **10**: il *coupling* tra lo (Z)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)thiazol-4-yl)acetic acid, l'analogo del composto **10** con l'ammina protetta dal Boc, e il composto **18** mediante un attivazione dell'acido carbossilico del **19** con il mesilcloruro. (Schema 3.12)

Lo svantaggio di questa strategia è la necessità di introdurre uno step di idrolisi dell'estere etilico e un passaggio di deprotezione del Boc per arrivare al prodotto desiderato, il composto **9**; tuttavia qualora fosse stato ottenuto il composto **20**, questo sarebbe risultato più semplice da purificare su colonna cromatografica di silice, , rispetto al **9**, in quanto quest'ultimo, possedendo sia la funzione amminica che quella carbossilica libere, è in grado di interagire con la silice e richiede condizioni particolari per l'eluizione.



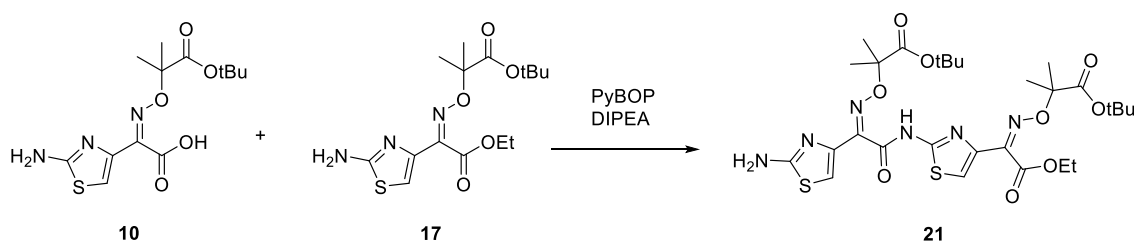
Schema 3.12 Sintesi del tert-butyl 2-(((Z)-1-(2-((Z)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)thiazol-4-yl)acetamido)thiazol-4-yl)-2-ethoxy-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate

Il composto **19** mesilato è altamente instabile, pertanto non è possibile monitorare la reazione iniettando il crudo all'HPLC: per poterlo fare, è necessario prima funzionalizzarlo con n-propilammina per poter formare la propilammide del composto **19**, che è visibile all'UV e ha un tempo di ritenzione diverso dal reagente di partenza.

Durante la mesilazione si è osservata la scomparsa del picco del **19** all'HPLC e la comparsa di un nuovo picco, che si suppone essere la propilammide, indicando che l'attivazione è avvenuta con successo. Tuttavia, come confermato da HPLC-MS, lo step di reazione successivo non ha portato alla formazione del prodotto di *coupling* **20**.

Un'altra strategia che è stata testata è il *coupling* tra il **10**, precedentemente attivato con il PyBOP, e il **17**. (Schema 3.13) Il prodotto **21**, avendo l'estere etilico al posto dell'acido

carbossilico presenterebbe anch'esso dei vantaggi rispetto al **9** se dovesse essere necessaria una purificazione su colonna di silice.

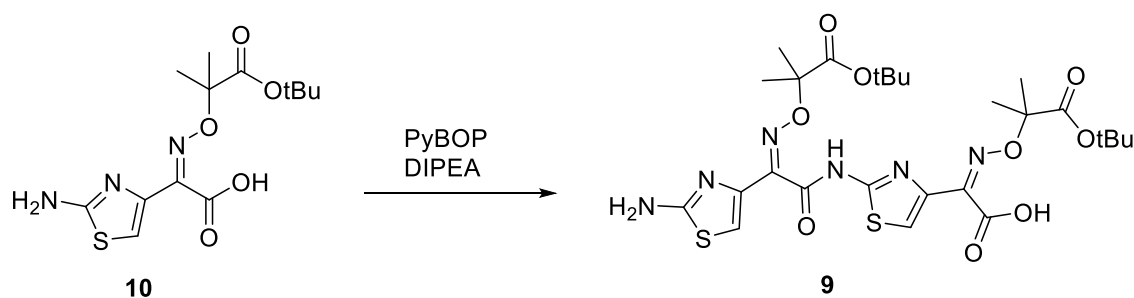


Schema 3.13 Sintesi del *tert-butyl 2-((((Z)-1-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-ethoxy-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate*

Questa strategia, tuttavia, si è rivelata fallimentare, poiché la successiva reazione di attivazione del composto **10** con il PyBOP, ha promosso la dimerizzazione sia con il **17** che con il **10** stesso, ottenendo una miscela di prodotti di *coupling* che non si è rivelata sinteticamente utile.

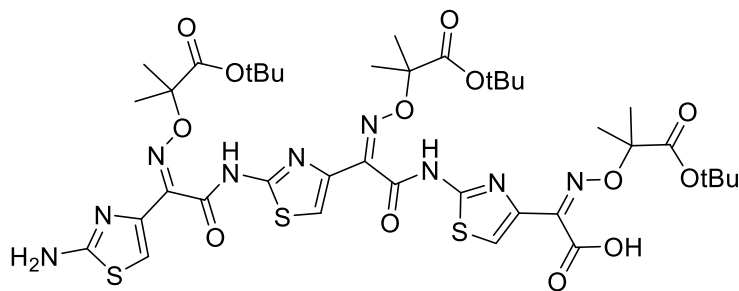
3.4.3 Homocoupling del **10** via PyBOP

Anche per il **10**, così come per il **4**, la strategia vincente è risultata quella dell'*homocoupling* utilizzando il PyBOP (schema 3.14), tuttavia, in questo caso la reazione è stata più difficoltosa a causa dell'inferiore reattività di **10**.



Schema 3.14 Dimerizzazione di **10** via PyBOP

Come parametri per definire le condizioni di reazione migliori sono stati considerati la percentuale di **10** residuo e la percentuale di trimero **22** che si forma, un'impurezza che nel caso di **3** non si otteneva. (Schema 3.15)



22

Schema 3.15 Struttura del (Z)-2-(2-((Z)-2-(2-((Z)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetamido)thiazol-4-yl)-2-(((1-(tert-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)acetic acid

La percentuale di **10** residuo è stata calcolata a partire dall'area dei diversi picchi all'HPLC applicando la seguente formula:

$$\mathbf{10} \text{ residuo}\% = \frac{\text{area}_{\mathbf{10}}}{\text{area}_{\mathbf{10}} + \text{area}_9 + \text{area}_{\mathbf{22}}} \cdot 100$$

Invece per calcolare la percentuale di **22** presente è stata impiegata la formula:

$$\% \mathbf{22} = \frac{\text{area}_{\mathbf{22}}}{\text{area}_{\mathbf{22}} + \text{area}_9}$$

È importante considerare entrambi i parametri poiché la percentuale di **10** residuo non indica la conversione nel prodotto desiderato perché è influenzata anche dalla quantità di trimero che si è formata.

Sono state valutate diverse condizioni per cercare di ottimizzare la reazione, in tutte le prove sono stati utilizzati 2 eq di **10** (tabella 3.10): in primo luogo sono state applicate le stesse utilizzate per la dimerizzazione del **4**, ma la reazione non è andata a completamento né utilizzando 1 eq di PyBOP (prova 1) né con 1,4 eq di PyBOP (prova 2). La conversione del **10** è inferiore rispetto a quella del **4**: oltre allo *starting* residuo, anche il **10** attivato con il benzotriazolo non reagisce del tutto e con 1,4 eq di PyBOP si forma anche del trimero.

Considerando che il PyBOP, come molti agenti di *coupling*, è sensibile all'umidità, è stata fatta una prova impiegando dei setacci molecolari per adsorbire l'acqua al loro interno e sottrarla dall'ambiente di reazione: inizialmente si è formato il prodotto, ma dopo quattro ore e mezza si è degradato (prova 3).

Cambiando il solvente con il MeTHF si possono raggiungere temperature più alte e questo ha portato ad una maggiore conversione, ma anche ad una percentuale più alta di trimero (prova 4).

Passando dal MeTHF alla DMF e aumentando la temperatura a 90°C la reazione è stata notevolmente più veloce e la percentuale di **10** residuo è stata considerevolmente più bassa; tuttavia, si ottiene una percentuale più alta di trimero (prova 5).

Notare come utilizzando 1,4 equivalenti di PyBOP si ottiene una minore quantità di **10** residuo, ma una maggiore percentuale di trimero, pertanto, risulta vantaggioso impiegare solo 1 equivalente ogni 2 equivalenti di **10** (prova 6).

È stata anche confermata la presenza dell'effetto solvente della DMF (prova 7), conducendo una prova in cui tutti gli altri parametri, eccetto il solvente, erano identici alla prova in MeTHF (prova 4): la reazione è risultata più veloce.

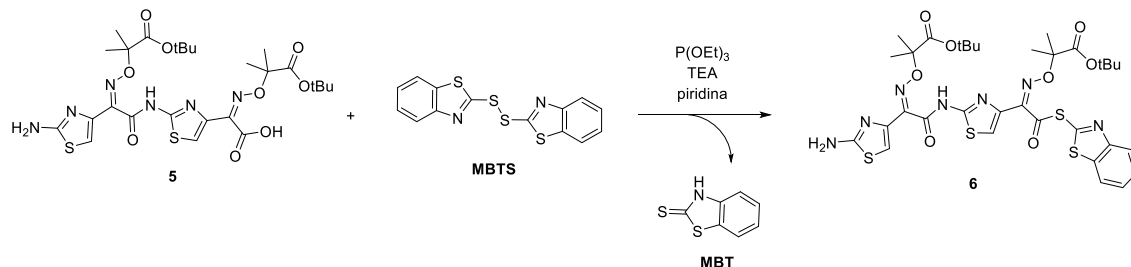
Tabella 3.10 Ottimizzazione del coupling del **10** con PyBOP

Prova	eq PyBOP	T (°C)	Solvente	% 10 residuo	% 22
1	1	60	THF	17,0%	\
2	1,4	60	THF	14,7%	13,4%
3	1,4 + setacci	60	THF	\	\
4	1,4	60	THF	12,6%	14,1%
5	1	60	THF	13,6%	11,1%
6	1	70	MeTHF	10,3%	16,3%
7	1	90	DMF	8,1%	20,5%
8	1,4	90	DMF	4,9%	31,5%
9	1	70	DMF	9,0%	18,9%

In conclusione, è stato individuato un metodo per sintetizzare il **9**, tuttavia non è stato possibile isolarlo durante il *work-up*, si è resa, invece necessaria una purificazione su colonna cromatografica in fase diretta. Sono state valutate numerose fasi mobili, quella che ha garantito una separazione ed eluizione dei diversi componenti è quella composta da DCM e Metanolo.

3.5 Sintesi del composto 6

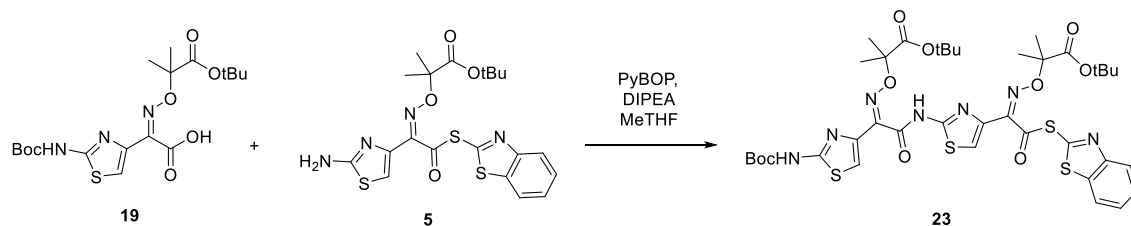
La sintesi del composto **6** è stata effettuata impiegando l'MBTS e un riducente quali trifenilfosfina, come nella procedura produttiva dell'**1**, o trietilfostito, come in quella del composto **5**. (Schema 3.16)



Schema 3.16 Tioesterificazione con MBTS del **5**

Le diverse strategie sintetiche sono state testate sul substrato più semplice **10**, ottenendo con successo il composto **5**; tuttavia, una volta che le stesse condizioni sono state applicate al **9**, le analisi HPLC-MS hanno evidenziato che il prodotto desiderato era presente solo in tracce.

Alla luce di tali risultati è stato adottato un altro approccio, ovvero effettuare il *coupling* tra il **19** e il **5** utilizzando il PyBOP, ottenendo il composto **23** (schema 3.17), che tramite una deprotezione del Boc permette di sintetizzare il **6**.



Schema 3.17 Sintesi del *tert*-butyl 2-((((*Z*)-2-((4-((*Z*)-2-(benzo[*d*]thiazol-2-ylthio)-1-(((1-(*tert*-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)-2-oxoethyl)thiazol-2-yl)amino)-1-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)thiazol-4-yl)-2-oxoethylidene)amino)oxy)-2-methylpropanoate

Le condizioni utilizzate per questo coupling sono quelle impiegate per l'*homocoupling* del composto **10**: 1 eq di PyBOP, MeTHF come solvente e 70 °C come temperatura di reazione. Tuttavia, anche in questo caso, le analisi HPLC-MS hanno evidenziato che il prodotto era presente solo in tracce ed erano risultati solo dei prodotti di degradazione.

4 Conclusioni

Questo progetto di tesi ha previsto la sintesi di impurezze presenti in alcune cefalosporine prodotte da ACS Dobfar, al fine di effettuare una loro caratterizzazione strutturale e ottenere degli standard con un grado di purezza elevato, per determinare il loro fattore di risposta.

In fase preliminare, è stato ipotizzato che la formazione di queste impurezze, denominate *ATA-impurities*, fosse dovuta alla dimerizzazione dell'agente acilante **1**, impiegato per funzionalizzare i nuclei delle cefalosporine in posizione C-7'. Si assumeva infatti che il composto **2** fosse un'impurezza presente nei lotti dell'intermedio **1**; pertanto, si è reso necessario sintetizzare il composto **2** e condurre delle analisi HPLC per avvalorare tale ipotesi.

È stata messa a punto una via di sintesi del composto **2** a partire dal *coupling* di **4**, commercialmente disponibile, con una successiva tioesterificazione con MBTS.

Sono state valutate due strategie sintetiche per eseguire il coupling:

- Reazione tra i composti **12** e **1**, deprotonando **1** con NaHMDS, seguita da idrolisi dell'estere etilico
- Dimerizzazione di **4** tramite PyBOP

La seconda via è risultata essere più efficiente in termini di conversione dei reagenti e di purezza del prodotto ottenuto.

Isolato il composto **2**, sono stati analizzati i lotti di **1** all'HPLC: il metodo analitico utilizzato per l'analisi di **1** è risultato idoneo per separare il picco di **2** dall'**1**, tuttavia si è riscontrato che il composto **2** è presente in quantità esigua; pertanto si è concluso che le *ATA-impurities* si formano in seguito a reazioni secondarie che avvengono durante lo *step* di *coupling* con il nucleo delle cefalosporine.

L'ottenimento del composto **2** ha permesso di sintetizzare le seguenti impurezze: ATA-cefovecin, ATA-ceftriaxone e ATA-cefotaxime. Il primo era già stato precedentemente caratterizzato, poiché presente all'interno dell'API in quantità superiori alla soglia di identificazione, la preparazione di uno standard però permetterà di ricavarne il fattore di risposta e fornire una quantificazione più accurata; per quanto riguarda le altre due impurezze, gli standard sintetizzati sono stati utilizzati per effettuare una

caratterizzazione strutturale via HPLC-MS e NMR e saranno anch'essi funzionali alla determinazione dei fattori di risposta.

La seconda parte del progetto ha riguardato la preparazione di un'impurezza analoga alle *ATA-impurities* che si ipotizza possa essere presente nella ceftazidima per via della dimerizzazione dell'agente acilante **5**, avendo una reattività simile a quella del composto **1**.

È stata quindi valutata una via sintetica che ripercorresse gli *step* impiegati per l'ottenimento delle *ATA-impurities*, sfruttando la strategia di *coupling* via PyBOP per far dimerizzare il composto **10** ed ottenere il **9**.

Non avendo a disposizione il composto **10** è stato necessario mettere a punto un'idrolisi del **17**, ovvero il suo estere etilico, lasciando intatto l'estere terbutilico presente sull'ossima: le condizioni migliori prevedono di condurre la reazione a temperatura ambiente, utilizzando LiOH come base.

È stato poi effettuato uno *screening* di diversi agenti di *coupling*, che ha permesso di considerare il PyBOP come il reagente migliore; in quanto ha promosso la formazione del dimero **9**.

La tioesterificazione di **9** con MBTS avrebbe permesso di ottenere il composto **6**, che sarebbe stato impiegato per analizzare i lotti di *starting material* e per sintetizzare l'impurezza della ceftazidima; tuttavia, le prove di sintesi del composto **6** sono risultate fallimentari.

In futuro sarà necessario condurre ulteriori prove per cercare di ottenere il composto **6** o esaminare attivazioni alternative per effettuare il *coupling* tra il dimero **9** e il 7-PYCA, in modo tale da ottenere l'impurezza della ceftazidima, con conseguente caratterizzazione strutturale e determinazione del fattore di risposta.

5 Parte sperimentale

5.1 Materiali e strumenti

I solventi e i 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 usate lastre Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Milano). Come rivelatore è stato utilizzato l'apparecchio Spectroline Model CM-10A, munito di lampada a radiazioni ultraviolette ($\lambda = 253$ nm e 366 nm). Per l'evaporazione a pressione ridotta dei solventi di reazione è stato utilizzato l'evaporatore rotante Büchi Rotavapor R-100. Per la liofilizzazione è stato utilizzato un liofilizzatore Lio 5P. Per monitorare colonne è stato utilizzato il rivelatore UV Hitachi Chromaster 5410 UV detector. 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 5 mm probe. Le molteplicità del segnale sono state così indicate: s (singoletto), d (doppietto), dd (doppio doppietto), t (tripletto), q (quartetto) e m (multipletto). Per le analisi di massa è stato utilizzato lo strumento Thermo LXQ Ion Trap. Per quantificare il contenuto d'acqua nelle polveri e nelle soluzioni è stato utilizzato lo strumento 701 KF Titrino. Per la sintesi di alcuni composti è stato utilizzato lo strumento EasyMax 402 di Mettler Toledo. 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 YMC Pack ODS-AQ, 150 x 4,6 mm, 3 μ m; $\lambda = 220$ nm; temperatura: 25°C. Fase mobile A: acqua, 0,1% acido fosforico; fase mobile B: acetonitrile. 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%
- b) Colonna LiCrosphere 100, RP-18 endcapped, 250 x 4 mm, 5 μ m; $\lambda = 220$ nm; temperatura: 25°C. Fase mobile A: acqua, 0,1% acido fosforico; fase mobile B: acetonitrile. Flusso: 1 mL/min. Gradiente, B%: $t_0 \rightarrow 5$ min = 5% $\rightarrow$ 30%; 5 min $\rightarrow$ 20 min = 30% $\rightarrow$ 40%; 20 min $\rightarrow$ 28 min = 40% $\rightarrow$ 80%; 28 min $\rightarrow$ 30 min = 80%; 30 min $\rightarrow$ 30,1 min = 80% $\rightarrow$ 5%; 30,1 min $\rightarrow$ 35 min = 5%
- c) Colonna LiCrosphere 100, RP-18 endcapped, 250 x 4 mm, 5 μ m; $\lambda = 220$ nm; temperatura: 25°C. Fase mobile A: acqua, 0,1% acido fosforico; fase mobile B:

acetonitrile. Flusso: 1 mL/min. Gradiente, B%: $t_0 \rightarrow 20 \text{ min} = 5\% \rightarrow 100\%$; $20 \text{ min} \rightarrow 25 \text{ min} = 100\%$; $25 \text{ min} \rightarrow 25,1 \text{ min} = 100\% \rightarrow 5\%$; $25,1 \text{ min} \rightarrow 30 \text{ min} = 5\%$

d) Colonna LiCrosphere 100, RP-18 endcapped, 250 x 4 mm, 5 μm ; $\lambda = 220 \text{ nm}$; temperatura: 25°C. Fase mobile A: acqua, 0,1% acido fosforico; fase mobile B: acetonitrile. Flusso: 1 mL/min. Gradiente, B%: $t_0 \rightarrow 10 \text{ min} = 50\% \rightarrow 90\%$; $10 \text{ min} \rightarrow 12 \text{ min} = 90\% \rightarrow 100\%$; $12 \text{ min} \rightarrow 20 \text{ min} = 100\%$; $20 \text{ min} \rightarrow 20,1 \text{ min} = 100\% \rightarrow 50\%$; $20,1 \text{ min} \rightarrow 25 \text{ min} = 50\%$

5.2 Preparazione del composto **14**

80 g di **12** vengono sospesi in 480 mL (6 mL/g₁₂) di THF sotto atmosfera di azoto. La miscela di reazione viene raffreddata a -10°C. Si aggiungono 176 g di NaHMDS (1,1 mol/mol₁₂) in 30 min, la sospensione diventa arancione. A fine aggiunta, la temperatura viene portata a 0°C.

Si prepara una soluzione con 134,5 g (1,1 mol/mol₁₂) di **1** in 1300 mL (9,7 mL/g₁) di THF e la si aggiunge al crudo di reazione, mantenendo la temperatura a 0°C. A fine aggiunta si mantiene in agitazione a 0°C per 4 h. IPM: **12** residuo < 10 g/L.

Si caricano 1600 mL di AcOEt e 1600 mL d'acqua. Si porta a pH = 4 con HCl 15%, la sospensione diventa rosso scuro. Il sistema bifasico è mantenuto in agitazione per 10 min. la fase organica è separata da quella acquosa ed evaporata a pressione ridotta, ottenendo un olio.

Metodo analitico a; RT **14** = 10,6 min

Metodo analitico b: RT **14** = 17,1 min

5.3 Preparazione del composto **3**

All'olio ***14** viene aggiunta una soluzione di 80 g (5,75 mol/mol₁₂) di NaOH in 800 mL (10 mL/g₁₂) d'acqua. Si riscalda a 65 °C e si mantiene in agitazione per 1 h. IPM: **14** residuo < 1,0%.

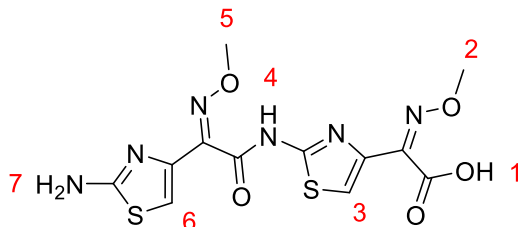
Si raffredda a temperatura ambiente. Si porta a pH = 7 con HCl 15%. Si lascia precipitare e si filtra su büchner MBT. Si portano le acque madri a pH = 3 con HCl 15%, si lascia precipitare e si filtra su büchner. Si ottiene un solido arancione, che viene essiccato 24 h in stufa a 45°C sottovuoto e flusso di azoto.

Il solido è stato purificato su colonna cromatografica: fase stazionaria resina HP20SS, fase mobile H₂O → H₂O/ACN 8:2

Metodo analitico a; RT **3** = 6,7 min

Metodo analitico b: RT **3** = 7,1 min

m/z = 385,02 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 13,10 (s, 1H, NH-**4**), δ = 7,59 (s, 1H, CH-**6**), δ = 7,23 (s, 2H, NH₂-**7**), δ = 6,92 (s, 1H, CH-**3**), δ = 3,92 (s, 3H, CH₃-**5**), δ = 3,88 (s, 3H, CH₃-**2**)

Il segnale COOH-**1** non è visibile perché scambia con l'acqua

5.4 Preparazione alternativa del composto **3**

5,0 g di **4** e 6,5 g (1 mol/mol₄) di PyBOP vengono sospesi in THF (15 mL/g₄) sotto atmosfera di azoto. Si aggiungono 5,4 mL (2,5 mol/mol₄) di DIPEA. Si scalda a refluxo, mantenendo in agitazione per 23 h. IPM: **4** residuo < 6,0%.

Si raffredda a temperatura ambiente. Vengono aggiunti 100 mL di acqua e 50 mL di AcOEt. Separo le due fasi e aggiungo 50 mL di AcOEt alla fase acquosa. Separo nuovamente e aggiungo 50 mL alla fase acquosa. Separo e acidifico a pH = 3 con HCl 15%. Lascio precipitare e filtro su büchner. Si ottiene un solido giallo chiaro, lascio essiccare per 24 h in stufa a 45°C sottovuoto e flusso di azoto.

Metodo analitico b; RT **3** = 7,1 min

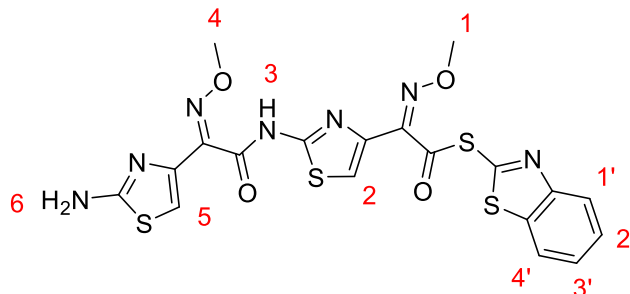
5.5 Preparazione del composto **2**

1 g di **3** e 2,6 g (3 mol/mol₃) di MBTS vengono sospesi in 60 mL di DCM (60 mL/g₃) sotto atmosfera di azoto. Si scalda a 30°C. Vengono aggiunti 1,08 mL (3 mol/mol₃) di TEA e si mantiene in agitazione per 20 min. Si aggiungono 2,1 g (3 mol/mol₃) di PPh₃, si ottiene una soluzione rosso scuro. Si mantiene in agitazione per 1 h. IPM: **3** residuo < 1,0%.

Si raffredda a 0°C. Si lascia precipitare e si filtra su büchner. Il solido viene lavato con MeOH freddo. Si ottiene un solido biancastro, che viene essiccato sottovuoto e flusso di azoto per 24 h.

Metodo analitico a; RT **2** = 13,7 min

m/z = 534,01 [M+H]⁺



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 13,19 (s, 1H, NH-**3**), δ = 8,25-8,22 (d, 1H, CH-**4'**), δ = 8,10-8,08 (d, 1H, CH-**1'**), δ = 7,76 (s, 1H, CH-**5**), δ = 7,64-7,55 (m, 2H, CH-**2'**, CH-**3'**), δ = 7,23 (s, 2H, NH₂-**6**), δ = 6,93 (s, 1H, CH-**2**), δ = 4,03 (s, 3H, CH₃-**4**), δ = (s, 3H, CH₃-**1**)

5.6 Preparazione dell'ATA-cefovecin

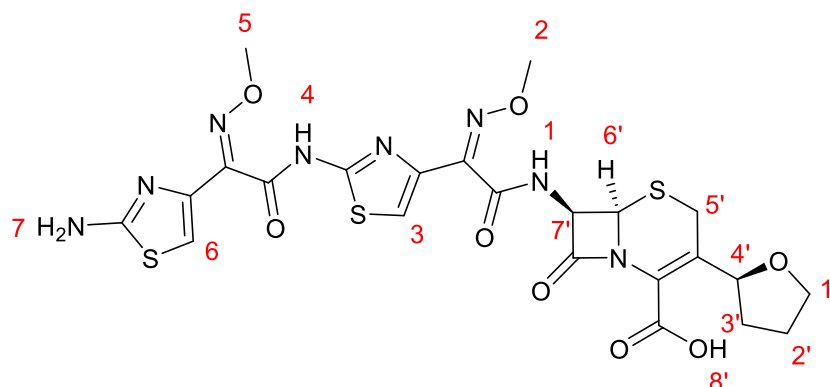
2,5 g di **2** e 1,7 g (1,34 mol/mol₂) di 3-TH vengono sospesi in 67 mL (27 mL/g₂) di acetone e 35 mL (14 mL/g₂) di acqua. Si scalda a 35°C. Il pH viene mantenuto tra 8,4 e 8,6 utilizzando NaOH 15%. Si mantiene sotto agitazione per 6 h. IPC: **2** residuo ≤ 1,0%, se questo valore non viene raggiunto si aggiungono 0,5 eq di 3-TH.

Si filtra su büchner, il solido viene scartato. Si rimuove l'acetone dalle acque madri mediante evaporazione a pressione ridotta. Si porta il pH a 7 con HCl 15%. Si lascia precipitare e si filtra su büchner: il solido è MBT e si scarta. Le acque madri vengono congelate e liofilizzate, ottenendo un solido bianco.

Il solido è stato purificato su colonna cromatografica: fase stazionaria resina HP20SS, fase mobile H₂O → H₂O/ACN 7:3

Metodo analitico a; RT ATA-cefovecin = 9,5 min

m/z = 637,19 [M+H]⁺



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,50$ (s, 1H, NH-1), $\delta = 7,16\text{-}6,78$ (m, 4H, $\text{NH}_2\text{-7}$, CH-6 , CH-3), $\delta = 5,56$ (m, 1H, CH-7'), $\delta = 4,99$ (m, 1H, CH-S-6'), $\delta = 4,90$ (m, 1H, CH-O-4'), $\delta = 3,87\text{-}3,78$ (m, 7H, $\text{CH}_3\text{-O-2}$, $\text{CH}_3\text{-O-5}$, $\text{CH}_2\text{-O-1'}$), $\delta = 3,63\text{-}3,58$ (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-O-1'}$), $\delta = 3,39\text{-}3,18$ (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S-5'}$), $\delta = 2,08\text{-}1,49$ (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-2'}$, $\text{CH}_2\text{-3'}$)

I segnali $\text{NH}_2\text{-4}$ e COOH-8' non sono visibili.

5.7 Preparazione dell'ATA-ceftioxaone

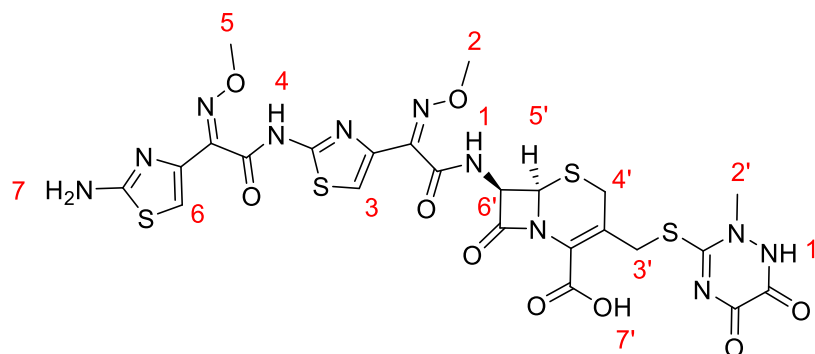
1 g di **2** e 0,7 g (1 mol/mol₂) di 7-ACT vengono sospesi in 14 mL (14 mL/g₂) di DCM, 1,5 mL d'acqua (1,5 mL/g₂) e 6 mL (6 mL/g₂) di MeOH. Si raffredda 3-5°C. si aggiungono 0,55 mL (2,1 mol/mol₂) di TEA e si agita per 6 h. IPM: **2** residuo < 4,0%.

Si aggiungono 15 mL d'acqua, 5 mL di DCM e 1,3 g di NaCl. Si porta il pH a 8 con 0,1 mL (0,5 mol/mol₂) di TEA. Si attende 15 min e le due fasi vengono separate. Alla fase organica si aggiungono 15 mL d'acqua e si separa nuovamente. Le due fasi acquose vengono riunite, congelate e liofilizzate, ottenendo un solido bianco.

Metodo analitico a; RT ATA-ceftioxaone = 9,0 min

$m/z = 759,78$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$m/z = 781,80$ $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 13,10$ (s, 1H, **NH-4**), $\delta = 11,05$ (s, 1H, **NH-2'**), $\delta = 9,06$ (d, 1H, **NH-1**), $\delta = 7,44$ (s, 1H, **CH-6**), $\delta = 7,26$ (s, 2H, **NH₂-7**), $\delta = 6,89$ (s, 1H, **CH-3**), $\delta = 5,63$ (d, 1H, **CH-6'**), $\delta = 5,05$ (s, 1H, **CH-S-5'**), $\delta = 4,42-4,13$ (dd, 2H, **CH₂-S-3'**), $\delta = 3,87$ (s, 6H, **CH₃-O-2**, **CH₃-O-5**), $\delta = 3,60-3,40$ (m, 2H, **CH₂-S-4'**)

Il segnale **COOH-7'** non è visibile perché scambia con l'acqua, il segnale **CH₃-2'** non è visibile poiché è coperto da quello del solvente.

5.8 Preparazione dell'ATA-cefotaxime

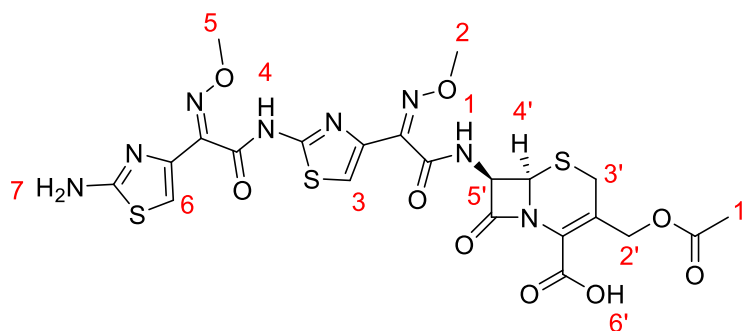
1 g di **2** e 0,52 g (1 mol/mol₂) di 7-ACA sono sospesi in 20 mL (20 mL/g₂) di DCM. Si raffredda a 3-5°C e si mantiene in agitazione per 5 min. Si aggiungono 0,41 mL (1,54 mol/mol₂) di TEA, 2 mL (2 mL/g₂) di MeOH e 1 mL (1 mL/g₂) d'acqua. Si mantiene in agitazione a 3-5°C per 5 h. IPM: **2** residuo < 1,0%.

Si aggiungono 20 mL di acqua precedentemente raffreddata a 3-5°C. si separano le due fasi. La fase organica viene lavata altre tre volte con tre porzioni da 20 mL d'acqua.

Le fasi acquose vengono riunite e portate a pH = 5 con qualche goccia di acido acetico 80%. Si elimina il DCM tramite evaporazione a pressione ridotta.

Metodo analitico c: RT ATA-cefotaxime = 10,1 min

$m/z = 639,20$ $[\text{M}+\text{H}]^+$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 13,19$ (s, 1H, **NH-4**), $\delta = 9,74$ (d, 1H, **NH-1**), $\delta = 7,50$ (s, 1H, **CH-6**), $\delta = 7,28$ (s, 2H, **NH₂-7**), $\delta = 6,95$ (s, 1H, **CH-3**), $\delta = 5,89-5,85$ (m, 1H, **CH-5'**), $\delta = 5,22$ (d, 1H, **CH-S-4'**), $\delta = 5,05-4,75$ (dd, 2H, **CH₂-O-2'**), $\delta = 3,96$ (s, 3H, **CH₃-O-5**), $\delta = 3,94$ (s, 3H, **CH₃-O-2**), $\delta = 3,71-3,38$ (dd, 2H, **CH₂-S-3'**), $\delta = 2,09$ (s, 3H, **CH₃-CO-OR-1'**)

Il segnale **COOH-6'** non è visibile perché scambia con l'acqua.

5.9 Preparazione del composto **10**

30 g di **17** vengono sciolti in 150 mL (5 mL/g₁₇) di THF e 120 mL (4 mL/g₁₇) di MeOH. Si prepara una soluzione con 10,1 g (5 mol/mol₁₇) di LiOH in 150 mL d'acqua (5 mL/g₁₇) e la si aggiunge al crudo di reazione in 25 min. Si mantiene in agitazione a temperatura ambiente per 3h30 min.

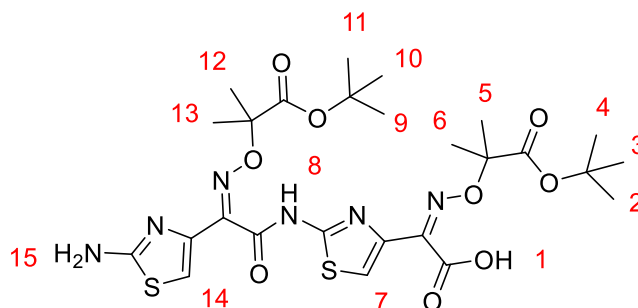
Si raffredda a 0°C e si porta a pH = 7 con 263 mL di HCl 1 M in 40 min. Si rimuove il THF tramite evaporazione a pressione ridotta. Si porta a pH = 9 con qualche goccia di K₂CO₃ 30%. Si aggiungono 300 mL di AcOEt e si separano le due fasi. La fase acquosa viene portata a pH = 4 con 100 mL di HCl 1 M, si lascia precipitare e si filtra su büchner, ottenendo un solido giallino che viene seccato in stufa a 60°C sottovuoto e flusso di azoto. Metodo analitico c: RT **10** = 8,6 min

5.10 Preparazione del composto **9**

2,2 g di **10** e 1,74 g (1 mol/mol₁₀) di PyBOP vengono sospesi in 33 mL (15 mL/g₁₀) di MeTHF sotto atmosfera di azoto. Si aggiungono 1,45 mL (2,5 mol/mol₁₀) di DIPEA. Si scalda a refluxo e si mantiene in agitazione per 9h30 min. IPM: **10** residuo < 11%.

Si raffredda a temperatura ambiente e si aggiungono 30 mL d'acqua e 15 mL di AcOEt. Si separano le due fasi e si aggiungono 30 mL di Na₂CO₃ 10% alla fase organica. Si separa nuovamente e si raffredda la fase organica a < 10°C. Si aggiungono 30 mL di HCl 1 M alla fase organica e si separa nuovamente. Il prodotto è stato purificato tramite cromatografia *flash*: fase mobile DCM/MeOH 95:5 → 9:1

Metodo analitico c: RT **9** = 16,6 min



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 12,97 (s, 1H, NH-**8**), δ = 7,32 (s, 1H, CH-S-**14**), δ = 7,23 (s, 2H, NH₂-**15**), δ = 6,79 (s, 1H, CH-S-**7**), δ = 1,44-1,36 (m, 30H, 10CH₃)

Il segnale COOH-**1** non è visibile perché scambia con l'acqua.

6 Bibliografia

- (1) *Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report for 2021*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2021> (accessed 2025-03-03).
- (2) Amador, P.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Duarte, I. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics (Basel)* **2019**, *8* (1), 23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010023>.
- (3) Fernandes, R.; Amador, P.; Prudêncio, C. B-Lactams: Chemical Structure, Mode of Action and Mechanism of Resistance. *Med Microbiol.* **2013**, *24* (1), 7–17.
- (4) Harrison, C. J.; Bratcher, D. Cephalosporins: A Review. *Pediatr Rev* **2008**, *29* (8), 264–267; quiz 273. <https://doi.org/10.1542/pir.29-8-264>.
- (5) Committee of Human Medicinal Products. CPMP/ICH/2737/99 ICH Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances.
- (6) Committee of Human Medicinal Products. CPMP/ICH/2738/99 ICH: Q3B (R2): Impurities in New Drug Products.
- (7) EMA/CHMP/ICH/82260/2006 Corr. ICH Guideline Q3C (R8) on Impurities: Guideline for Residual Solvents.
- (8) EMA/CHMP/ICH/353369/2013 ICH Q3D on Elemental Impurities.
- (9) Épshtein, N. A. Correction Factors in Formulas for Calculating Impurity Contents: Essence and Determination Methods and Their Limitations. *Pharm Chem J* **2019**, *53* (5), 477–482. <https://doi.org/10.1007/s11094-019-02023-x>.
- (10) Bertram, G. K. *Farmacologia Generale e Clinica*; Masters SB, Trevor A.J., Preziosi P., 2012.
- (11) Yocum, R. R.; Rasmussen, J. R.; Strominger, J. L. The Mechanism of Action of Penicillin. Penicillin Acylates the Active Site of Bacillus Stearothermophilus D-Alanine Carboxypeptidase. *J Biol Chem* **1980**, *255* (9), 3977–3986.
- (12) Fleming, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ. *Br J Exp Pathol* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (13) Abraham, E. P.; Chain, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146* (3713), 837–837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>.
- (14) Brotzu, G. Ricerche Su Di Un Nuovo Antibiotico. **1948**, *Lavori dell'istituto d'Igiene di Cagliari*, 1–11.
- (15) Abraham, E. P.; Newton, G. G. F. The Structure of Cephalosporin C. *Biochem J* **1961**, *79* (2), 377–393.
- (16) Abraham, E. P. History of β -Lactam Antibiotics. In *Antibiotics: Containing the Beta-Lactam Structure*; Demain, A. L., Solomon, N. A., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1983; pp 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81966-7_1.
- (17) Newton, G. G. F.; Abraham, E. P. Degradation, Structure and Some Derivatives of Cephalosporin N. *Biochem J* **1954**, *58* (1), 103–111.
- (18) *Antibiotic Discovery and Development*; Dougherty, T. J., Pucci, M. J., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1>.
- (19) McLeod, D. C.; Tartaglione, T. A.; Polk, R. E. Review of the New Second-Generation Cephalosporins: Cefonicid, Ceforanide, and Cefuroxime. *Drug*

- Intelligence & Clinical Pharmacy* **1985**, *19* (3), 188–198.
<https://doi.org/10.1177/106002808501900304>.
- (20) Klein, N. C.; Cunha, B. A. Third-Generation Cephalosporins. *Medical Clinics of North America* **1995**, *79* (4), 705–719. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30034-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30034-7).
 - (21) Sullins, A. K.; Abdel-Rahman, S. M. Pharmacokinetics of Antibacterial Agents in the CSF of Children and Adolescents. *Paediatr Drugs* **2013**, *15* (2), 93–117. <https://doi.org/10.1007/s40272-013-0017-5>.
 - (22) Barriere, S. L.; Flaherty, J. F. Third-Generation Cephalosporins: A Critical Evaluation. *Clin Pharm* **1984**, *3* (4), 351–373.
 - (23) Okamoto, M. P.; Nakahiro, R. K.; Chin, A.; Bedikian, A.; Gill, M. A. Cefepime: A New Fourth-Generation Cephalosporin. *Am J Hosp Pharm* **1994**, *51* (4), 463–477; quiz 541–542.
 - (24) Garau, J.; Wilson, W.; Wood, M.; Carlet, J. Fourth-Generation Cephalosporins: A Review of in Vitro Activity, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Utility. *Clinical Microbiology and Infection* **1997**, *3*, S87–S101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00649.x>.
 - (25) Zhanel, G. G.; Snizek, G.; Schweizer, F.; Zelenitsky, S.; Lagacé-Wiens, P. R. S.; Rubinstein, E.; Gin, A. S.; Hoban, D. J.; Karlowisky, J. A. Ceftaroline: A Novel Broad-Spectrum Cephalosporin with Activity against Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Drugs* **2009**, *69* (7), 809–831. <https://doi.org/10.2165/00003495-200969070-00003>.
 - (26) Cho, J. C.; Fiorenza, M. A.; Estrada, S. J. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **2015**, *35* (7), 701–715. <https://doi.org/10.1002/phar.1609>.
 - (27) Wang, C.; Yang, D.; Wang, Y.; Ni, W. Cefiderocol for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Systematic Review of Currently Available Evidence. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 896971. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.896971>.
 - (28) Terreni, M.; Taccani, M.; Pregnolato, M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules* **2021**, *26* (9), 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>.
 - (29) Committee of Human Medicinal Products. CPMP/ICH/4106/00 ICH Q7 Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredient, 2000.
 - (30) EMA/CPMP/ICH/2887/1999 ICH Guideline M4 (R4) on Common Technical Document.
 - (31) Committee of Human Medicinal Products. CHMP/QWP/297/97 Guideline on Summary of Requirements for Active Substances in the Quality Part of the Dossier.
 - (32) Committee of Human Medicinal Products. CHMP/QWP/227/02 Guideline on Active Substance Master File.
 - (33) Committee of Veterinary Medicinal Products. EMEA/CVMP/134/02 Guideline on Active Substance Master File Procedure.
 - (34) Committee of Human Medicinal Products. EMA/CHMP/ICH/804363/2022 ICH Q2(R2) Guideline on Validation of Analytical.
 - (35) Committee of Human Medicinal Products. CPMP/ICH/2736/99 ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products.

- (36) Committee of Human Medicinal Products. EMA/CHMP/ICH/83812/2013 ICH M7(R2) Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk.
- (37) International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products. VICH GL10(R) Impurities in New Veterinary Drug Substances.