

## PŘÍPAD BOSUTINIB ANEB DŮVĚŘUJ, ALE PROVĚŘUJ

STANISLAV RÁDL

Zentiva, U kabelovny 130, 102 37 Praha 10  
stanislav.radl@zentiva.cz

Došlo 15.3.13, přijato 19.6.13.

---

Klíčová slova: bosutinib, isomer bosutinibu, záměna isomerů, analytická kontrola.

---

### Obsah

1. Úvod
2. Případ bosutinib – záměna isomerů
3. Syntéza bosutinibu
4. Důsledky pochybení
5. Závěr

### 1. Úvod

Bosutinib je účinná látka ze skupiny inhibitorů tyrosinkinás, kterou zavedla v roce 2012 firma Pfizer pod názvem Bosulif pro léčbu chronické myeloidní leukemie. Probíhají další klinické studie, které by měly umožnit použití bosutinibu i v dalších onkologických indikacích. Vzhledem k aktuálnosti této léčby i k síle firmy Pfizer se na studium různých aspektů bosutinibu zaměřila řada výzkumných pracovišť.

### 2. Případ bosutinib – záměna isomerů

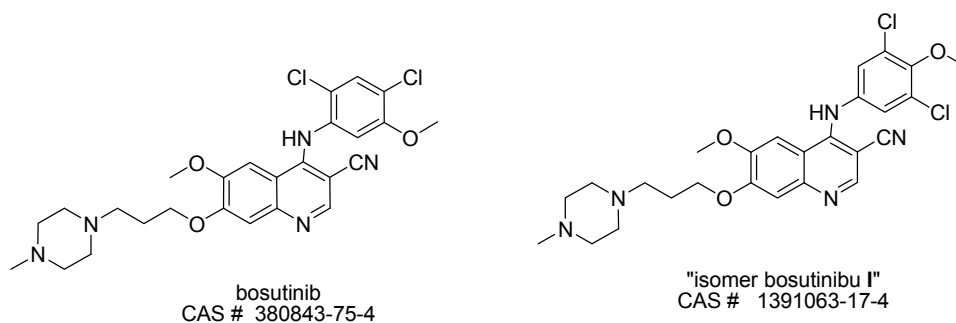
Pokud se chce nějaké pracoviště takovým výzkumem dosud neschváleného léčiva zabývat, má v podstatě tři možnosti, jak se k vývojovým vzorkům léčiva dostat. Zdánlivě nejjednodušší a cenově nejvýhodnější možností je kontaktovat farmaceutickou firmu vyvíjející dané léčivo a požádat ji o vzorek. Takové vzorky jsou obvykle bezplatné, jejich poskytnutí je ale vázáno na poměrně rozsáhlé byrokratické jednání. Žadatel musí vyplnit dotazníky, v nichž mimo jiné musí popsat, jaký výzkum chce s látkou provádět, co je cílem studie, jaké prostředky bude využívat, v rámci jakých projektů či grantů tento výzkum bude prováděn, atd. Mimo to dotazníky obsahují často i otázky na osoby řešitelů takového projektu, včetně jejich spolupráce s farmaceutickými firmami. Proto není divu, že řada

akademických pracovišť volí další možnost, kterou je nákup vzorku od komerčního dodavatele. V současné době je na Internetu řada adres nabízející vyhledání dodavatelů chemikálií, včetně farmaceutických účinných látek. Podobnou informaci lze získat i pomocí SciFinderu, takže stačí dle požadavků vybrat dodavatele a látku objednat. Nu a poslední možností je si látku v laboratoři syntetizovat. Takovou možnost ale většinou akademické instituce nemají.

Kromě akademických pracovišť jsou vývojové vzorky účinných látek velmi důležité i pro výrobce generických léčiv. Ti si velmi často v rámci vývoje syntézy sice příslušnou účinnou látku získávají vlastní syntézou, přesto je pro ně z důvodu priority důležité co nejdříve provést testování polymorfismu a pokusit se tak získat a patentově ochránit nové polymorfy, příp. soli. Celkem logicky u nich nepřipadá v úvahu získání takové látky od originátorské farmaceutické firmy a obrací se tedy často v počátečních fázích na dostupné komerční dodavatele.

A po krátké vsuvce se vraťme k bosutinibu. Ten začal být komerčně dostupný zhruba od roku 2006 a řada pracovišť toho využila, bosutinib zakoupila a samozřejmě s ním prováděla různorodý výzkum. A od roku 2005 se ve větší míře začaly objevovat publikace nepocházející od firmy Pfizer popisující výsledky výzkumu bosutinibu. A zhruba před rokem se objevila první zpráva naznačující, že ne všechny výsledky publikované o této látce jinými pracovišti než je firma Pfizer musí být správné.

Vše inicioval postdoktorand na Standfordově univerzitě Nicholas Levinson. Při studiu interakcí bosutinibu s různými proteinovými kinasami pomocí rentgenové spektroskopie nemohl ve spektru identifikovat atom chloru v *ortho* poloze anilinového seskupení. Zprvu si myslel, že je to důsledkem špatného rozlišení jím naměřených spekter. Poté, co prostudoval podobné spektrum komplexu bosutinibu s c-Abl tyrosinovou kinasou uložené v databázi Protein Data Bank (PDB) skupinou prof. Knappa z univerzity v Oxfordu a zjistil tam nejen nepřítomnost atomu chloru v *ortho* poloze, ale navíc díky lepšímu rozlišení i přítomnost chloru v poloze *meta*, kde by měl mít bosutinib pouze atom vodíku, dospěl k závěru, že je něco v nepořádku. Sdělil to tedy svému konzultantovi prof. Boxerovi a ten pozastavil již přijatou publikaci týkající se předmětného výzkumu. Poté nakoupili od různých dodavatelů vzorky bosutinibu a zjistili, že se jedná o velmi vážný problém. Ze zakoupených vzorků většina nebyla skutečný bosutinib, ale jeho isomer I. Výsledkem srovnání fyzikálně-chemických vlastností, ale hlavně vazebných studií bosutinibu a jeho isomeru I s Abl tyrosinovou kinasou byla publikace open access v časopise PLoS One. Skupina prof. Knappa poté upravila údaje v PDB a oznámila přípravu publikace na toto téma<sup>3</sup>.



Postupně se ukázalo, že problém je opravdu rozsáhlý a těžko vystopovatelný. Stručné shrnutí je dostupné ve dvou článcích v časopise *The Scientist*<sup>4,5</sup>. Zatímco Oxfordská skupina zakoupila vzorek už v roce 2006 od dosud nezveřejněné firmy (původně byla jako dodavatel publikována<sup>1</sup> firma Calbiochem), Levinsonův vzorek byl zakoupen v roce 2011 od firmy LC Laboratories, která je součástí firmy PKC Pharmaceuticals. Tato firma se k problému postavila čelem a začala se jím šířeji zabývat a vlastně svým snažením dosáhla určité reklamy. Na jejích stránkách<sup>6</sup> jsou dohledatelné odkazy na relevantní články a také popis aktivit, které firma udělala v tomto případě. Mimo jiné oznámila, že vzorek isomeru bosutinibu I prodala jako bosutinib více než 120 zákazníkům. Širším průzkumem trhu pak objevila dalších 17 dodavatelů majících stejný problém. Mezi těmito firmami jsou jak nepříliš známé firmy, tak i renomovaní dodavatelé chemických látek a biochemických standardů, např. AK Scientific nebo Alfa Aesar. A ukazuje se, že seznam firem dodávajících místo bosutinibu jeho isomer je jistě rozsáhlejší. My jsme například identifikovali tento problém u čínské firmy Heta Pharm, která nám dodala místo bosutinibu jeho isomer I skoro rok po zveřejnění problému.

### 3. Syntéza bosutinibu

Pro hlubší pochopení problematiky záměny je užitečné se zmínit o syntéze bosutinibu. V patentové literatuře, ale i v několika článcích je popsáno několik postupů vedoucích k bosutinibu. Většina z nich spočívá v konstrukci 1,4-dihydro-3-kyanochinolin-4-onového seskupení, které je pak převedeno na příslušný 4-chlorchinolinový derivát, jehož reakcí s 2,4-dichlor-5-methoxyanilinem je zaveden tento fragment do molekuly. Ve schématu 1 je uvedena nejčastěji publikovaná varianta vycházející z látky **1**. Ta je pak převedena na chlorderivát **2**, jehož reakcí s 2,4-dichlor-5-methoxyanilinem se získá intermediát **3**, který je pak reakcí s 1-methylpiperazinem převeden na bosutinib<sup>7-9</sup>.

V tomto směru je určitou výjimkou postup publikovaný firmou Pfizer, kde dochází k tvorbě chinolinového kruhu až v posledním reakčním stupni (Schéma 2)<sup>10</sup>.

Je zřejmé, že jediný způsob, jak mohlo dojít ke vzniku isomeru bosutinibu I, je – bez ohledu na použitý syntetický postup – použití nesprávného isomeru anilinu, tj. 3,5-dichlor-4-methoxyanilinu namísto 2,4-dichlor-5-methoxyanilinu.

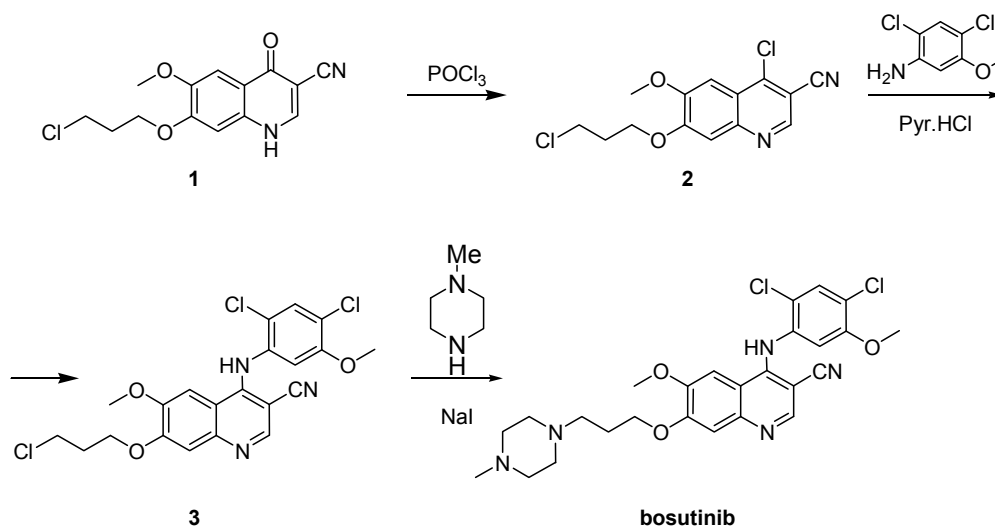


Schéma 1



Důsledkem zcela jistě negativním je to, že o některých údajích i v renomovaných časopisech bude třeba pochybovat. Vzhledem k řadě pracovišť, která omylem získaly isomer I místo bosutinibu, je pravděpodobné, že některé nesprávné výsledky byly nebo budou publikovány. Zatím se objevily jen náznaky toho, že by autoři přiznali publikování dat získaných použitím isomeru I místo bosutinibu. Jedním z těchto ojedinělých příkladů je práce německých autorů, kteří studovali nekompetitivní inhibici transportu jodthyroninu inhibitory thyrosinových kinas<sup>14</sup>. Jeden z autorů Dr. Schweizer připustil, že zřejmě ke studii použili isomer I a ne bosutinib<sup>1</sup>.

## 5. Závěr

Pravděpodobnost, že by podobný případ přešel bez povšimnutí u originátorských farmaceutických firem, je nepatrná vzhledem k velkému množství nutných studií, zkoušení řady dodavatelů výchozích látek během procesní optimalizace, atd. Na druhou stranu existuje celkem neprůhledná síť dodavatelů farmaceutických intermediátů a účinných látek, která je využívána jak farmaceutickými firmami, tak akademickou sférou. Zvláště náchylná jsou k podobným pomýlením biologická pracoviště, kde je často jediným používaným kritériem čistota měřená HPLC a identita pomocí hmotnostního spektra. Nu a jak je vidět na případu bosutinibu, to zcela nedostačuje.

Na případ bosutinib se přišlo víceméně náhodou a je značná pravděpodobnost, že podobná věc se v minulosti stala a nebyla odhalena i u jiných látek. Málokdo si asi uvědomuje, že většina dodavatelských firem má v případě dodání nesprávného vzorku jedinou povinnost, a to nahradit vzorek správným. Nikdo už nenahradí peníze a čas ztracený výzkumem zcela nezajímavé látky.

Co by tedy mělo být pro nás všechny poučením? Jak uvádím v titulku – důvěřuj, ale prověřuj. Koupené intermediáty i účinné látky by měly být důkladně analyticky prověřeny dříve, než se s nimi začne pracovat. A v případě jakékoli pochybnosti je namísto analyzovat i výchozí látky dodávané ověřenými dodavateli.

## LITERATURA

1. Halford B.: Chem. Eng. News 90, 34 (2012).
2. Lewinson N. M., Boxer S. G.: PLoS One 7, e29828 (2012).
3. Vollmar M., Szklarz M., Chaikwad A., Elkins J., Savitsky P., Azeez K. A., Salah E., Krojer T., Canning P., Muniz J. R. C., Bountra

- C., Arrowsmith C. H., Weigelt J., Edwards A., Von Delft F., Knapp S.: Protein Data Bank Entry 4BC6; doi:10.2210/pdb4bc6/pdb.
4. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32084/title/Mismarketed-Chemical-Causes-Concern/>, staženo 13.5.2013.
5. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/32132/title/Bogus-Isomer-Vendors-Identified-/>, staženo 13.5.2013.
6. <http://www.pkcpharma.com/TwoOrMoreBosutinibs.html>, staženo 13.5.2013.
7. Wissner A., Johnson B. D., Reich M. F., Floyd M. B., Kitchen D. B., Tsou H.-R. (American Cyanamid Co.) US patent 6002008 (1999).
8. Boschelli D. H., Ye F., Wang Y. D., Dutia M., Johnson S. L., Wu B., Miller K., Powell D. W., Yaczko D., Young M., Tischler M., Arndt K., Discafani C., Etienne C., Gibbons J., Grod J., Lucas J., Weber J. M., Boschelli F.: J. Med. Chem. 44, 3965 (2001).
9. Yin X. J., Xu G. H., Sun X., Peng Y., Ji X., Jiang K., Li F.: Molecules 15, 4261 (2010).
10. Withbroe G. J., Seadeek C., Girard K. P., Guinness S. M., Vanderplas B.C., Vaidyanathan R.: Org. Proc. Res. Dev. 17, 500 (2013).
11. [http://acdlabs.typepad.com/my\\_weblog/2012/06/the-bosutinib-isomer-a-case-for-nmr-asv.html](http://acdlabs.typepad.com/my_weblog/2012/06/the-bosutinib-isomer-a-case-for-nmr-asv.html), staženo 13.5.2013.
12. [http://acdlabs.typepad.com/my\\_weblog/2012/05/bosutinib-a-case-of-what-could-have-been.html](http://acdlabs.typepad.com/my_weblog/2012/05/bosutinib-a-case-of-what-could-have-been.html), staženo 13.5.2013.
13. Golotvin S. S., Vodopianov E., Pol R., Lefebvre B. A., Williams A. J., Rutkowske R. D., Spitzer T. D.: Magn. Reson. Chem. 45, 803 (2007).
14. Braun D., Kim T. D., le Coutre P., Köhrle J., Hershman J. M., Schweizer U.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 97, E100 (2012).

## S. Rádl (Zentiva Co., Prague): The Bosutinib Case – Trust but Check Out

Bosutinib is a selective kinase inhibitor introduced in 2012 by Pfizer Co. for treatment of chronic myeloid leukemia. Bosutinib is widely used in medicine and basic research. Some information indicated that researchers purchasing Bosutinib from a wide range of sources may have unwittingly been using an isomer of Bosutinib instead of Bosutinib itself. The aim of the review is to describe this serious case of marketing as well as to outline possible reasons and consequences of this case.