

А. Н. Балаев, В. Н. Осипов, К. А. Охманович, В. Е. Фёдоров

СИНТЕЗ АЦЕТАТА ЛЕЙПРОРЕЛИНА

ЗАО "Фарм-Синтез", Москва, Россия

Разработана технология получения ацетата лейпрорелина — синтетического агониста природного гонадотропин-рилизинг гормона с использованием методов жидкофазного пептидного синтеза. Новый метод позволяет получать целевой пептид с содержанием основного вещества > 99 % в полупромышленном масштабе.

Ключевые слова: лейпрорелин; жидкофазный синтез; производство

Лейпрорелин [1] — синтетический агонист природного гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ, гонадорелин, гонадолиберин):



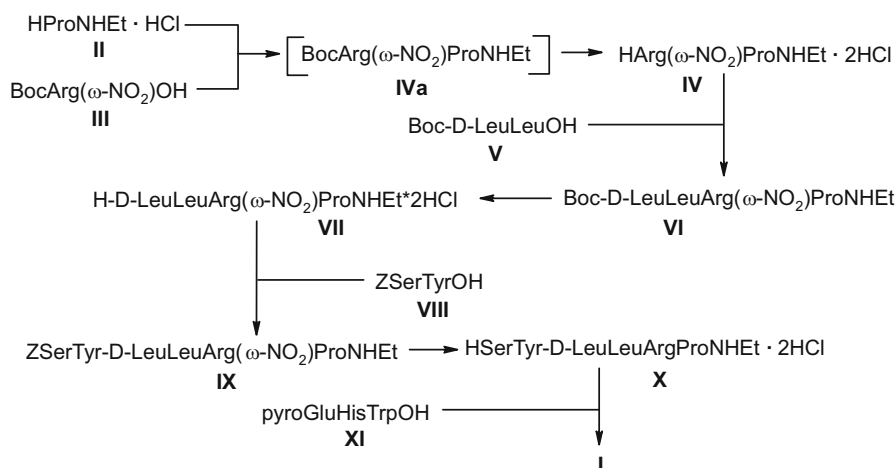
В фармацевтической практике лейпрорелин используют в виде уксуснокислой соли — ацетата лейпрорелина (I). I в 15 раз активнее по физиологическому действию в сравнении с эндогенным ГнРГ, при этом период его полураспада в организме составляет 90–120 мин, что намного превышает значение для природного гормона. I применяют при лечении гормон-зависимых опухолей (рака предстательной железы, рака молочной железы), эндометриоза, миомы матки, а также при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО).

Целью проделанной работы была разработка нового метода синтеза субстанции I, пригодного для производства в полупромышленном масштабе (1–2 кг/год). Предложенный метод основан на (1+1)+2+2+3 стратегии (схема).

Конденсация защищённой аминокислоты III и гидрохлорида этиламида L-пролина (II) с использованием дициклогексилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола в тетрагидрофуране при –5 °С даёт защищённый дипептид IVa, который без выделения дебокируют

12 % раствором хлороводорода в диоксане с образованием гидрохлорида дипептида IV. Аналогичная процедура с выделенным IV и дипептидом V приводит к бокированному тетрапептиду VI с выходом 78,2 %. Остатки непрореагировавших IV и V удаляют промыванием 5 % водным раствором лимонной кислоты и 5 % водным раствором бикарбоната натрия. Снятие Вос-защиты с VI проводят с использованием раствора хлороводорода в диоксане (выход 97,7 %). Реакция дебокированного VII и Z-защищённого дипептида VIII в диметилформамиде при 0 °С с использованием стандартного карбодиимидного метода образования пептидной связи даёт ZSerTyr-D-LeuLeuArg(ω-NO₂)-ProNHet (IX). При гидрировании IX в уксусной кислоте в присутствии гидроксида палладия происходит одновременное снятие Z и NO₂ групп. Образующийся гексапептид переводят в гидрохлорид X и очищают осаждением из ацетона. На последней стадии конденсацией X и XI получают лейпрорелин-сырец (выход 76,3 %) с содержанием основного вещества 63,3 % (ВЭЖХ). Существенным фактором успешного проведения реакции является постоянный избыток в реакционной массе 1-гидроксибензотриазола по отношению к дициклогексилкарбодиимиду, что достигается медленным добавлением (в течение 5 ч) раствора дициклогексилкарбодиимида.

Схема



Boc = трет-бутоксикарбонил

Z = бензилоксикарбонил

При быстром прибавлении (как на стадиях получения **VI** и **IX**) содержание основного вещества в полученном лейпрорелин-сырце снижается ниже 40 %. Полученный лейпрорелин-сырец очищают и переводят в укуснокислую соль с использованием методов препаративной ВЭЖХ, после чего лиофилизируют и получают готовую субстанцию **I**. Содержание основного вещества в полученном **I** равно 99,1 %. Сравнение результатов тестов стандартного образца **I** (Xiamen fine chemical import & export co., Ltd) и полученного разработанным методом приведены в таблице.

Экспериментальная часть

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Shimadzu. Колонка — Grom-Sil 12J ODS-4HE, 5 μm , 250 \times 4,6 mm. Условия — градиент 20 % В (0 мин) 60 % В (10 мин) 70 % В (15 мин) 70 % В (30 мин). А — фосфатный буфер pH 3 (20,4 г KH_2PO_4 растворяли в 3 л дистиллированной воды и доводили pH до 3 добавлением концентрированной фосфорной кислоты), В — ацетонитрил. Спектры ESI-MS регистрировали на приборе “Agilent LC/MS 1200” при ионизации пробы электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов. Пробы готовили в системе ацетонитрил — вода 1/1, концентрация 2 мг/мл. Условия анализа — поток 1 мл/мин, давление на нибулайзере 20 psi, температура 360 °C, скорость потока осушающего газа 9 л/мин, напряжение 3500 В, целевая масса от 100 до 2000. Угол удельного вращения измеряли на автоматическом поляриметре “OTAGO” AP-300. ТСХ проводили на пластинках Merck TLC Silicagel 60 F₂₅₄, проявление нингидрином. Соединения **II** [2], **III** [3], **V** [4], **VIII** [5] и **XI** [6] получены известными ранее способами.

HArg(ω -NO₂)-ProNH₂ дигидрохлорид (IV). К 3 л тетрагидрофурана при перемешивании последовательно добавляют 533 г (1,67 моль) **III**, 298 г (1,67 моль) **II**, 260 г (1,7 моль) моногидрата 1-гидроксибензотриазола и 213 г (2,11 моль) N-метилморфолина. Охлаждают до – 5 °C и при этой температуре присыпают 400 г (1,94 моль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивают 16 ч при комнатной температуре до завершения реакции (ТСХ). Отфильтровывают выпавшую дициклогексилмочевину, промывают её на фильтре 2 раза по 300 мл тетрагидрофурана. Объединённые органические фазы упаривают на роторе досуха (< 50 °C, 15 мм рт. ст.). Маслообразный остаток растворяют в 4,5 л хлороформа и полученный раствор последовательно промывают 2 раза по 2 л насыщенного водного раствора хлористого натрия, содержащего 5 % карбоната натрия, и 1 раз 2 л насыщенного водного раствора хлористого натрия, содержащего 5 % лимонной кислоты. Органическую фазу сушат сульфатом натрия и снова упаривают в вакууме досуха (< 50 °C, 3 мм рт. ст.). Полученный карамелеобразный остаток растворяют в 1,5 л диоксана, охлаждают до 10 °C. К полученному раствору приливают при перемешивании 5 л 12 % раствора хлороводорода в диоксане, охлаждённого до 5 °C. Перемешивают 30 мин при 15 °C и затем 1,5 ч

при комнатной температуре. Отфильтровывают выпавший осадок, промывают его на фильтре 2 раза по 1 л диэтилового эфира, 2 раза по 1 л ацетона и сушат в вакууме до постоянной массы (50 °C, 3 мм рт. ст.). Получают 440 г (63,6 %) белого порошка **IV**. Содержание основного вещества 95,3 % (ВЭЖХ). $[\alpha]_D^{27} = -30,31$ (5 % раствор, вода). ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/4): $R_f(\text{III}) = 0,06$, $R_f(\text{II}) = 0,30$, $R_f(\text{IV}) = 0,09$. ESMS, m/z (I %): 344,0 [M + H]⁺ (100), 366,0 [M + Na]⁺ (2,3), 687,1 [2M + H]⁺ (5,1).

Boc-D-Leu-Leu-Arg(ω -NO₂)-ProNH₂ (VI). В 1,5 л диметилформамида последовательно растворяют 225 г (0,54 моль) **IV**, 190 г (0,55 моль) **V**, 113 г (0,74 моль) моногидрата 1-гидроксибензотриазола и 169 г (1,67 моль) моль N-метилморфолина. Охлаждают реакционную массу до 0 – 3 °C и при этой температуре присыпают 134 г (0,65 моль) дициклогексилкарбодиимида. Перемешивают 1 ч при 0 °C и оставляют на 15 ч при 5 °C. По окончании реакции (ТСХ) разбавляют реакционную массу 1,5 л воды, отфильтровывают выпавшую дициклогексилмочевину, промывают её 1 л этилацетата. Водно-органический фильтрат разбавляют 2 л этилацетата и 3 л насыщенного водного раствора бикарбоната, перемешивают и отделяют органический слой. Промывают его последовательно: 1 л насыщенного водного раствора бикарбоната натрия, 1 л 5 % водного раствора бикарбоната натрия, 1 л 5 % водного раствора лимонной кислоты, 1 л воды. К органической фазе добавляют 3 л диэтилового эфира, декантируют с вязкого остатка, добавляют к нему ещё 1 л диэтилового эфира и оставляют на 12 ч при 5 °C. Отфильтровывают образовавшиеся кристаллы и сушат их в вакууме до постоянной массы (50 °C, 2 мм рт. ст.). Получают 283 г (78,2 %) белого порошка **VI**. Содержание основного вещества 92,7 % (ВЭЖХ). $[\alpha]_D^{25} = -8,84$ (5 % раствор, хлороформ). ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/5): $R_f(\text{IV}) = 0,07$, $R_f(\text{V}) = 0,25$, $R_f(\text{VI}) = 0,61$. ESMS, m/z (I %): 570,6 [M-Boc+H]⁺ (3,2), 670,6 [M + H]⁺ (100), 1339,6 [2M + H]⁺ (1,2).

H-D-Leu-Leu-Arg(ω -NO₂)-ProNH₂ дигидрохлорид (VII). При энергичном перемешивании и температуре 0 °C к 600 мл 12 % раствора хлороводорода в диоксане присыпают 215 г (0,32 моль) **VI**, отогревают до комнатной температуры и перемешивают дополнительно 30 мин. Декантируют жидкую фазу с выпавше-

Сравнительные результаты анализов стандартного и полученного образцов субстанции **I**

Тест	Стандартный образец I	Полученный образец I
Растворимость	Растворим в воде	Растворим в воде
Угол удельного вращения	$[\alpha]_D^{23} = -40,05$	$[\alpha]_D^{24} = -39,14$
Содержание I (ВЭЖХ), %	98,5	99,1
Уксусная кислота, %	8,5	8,7
Вода, %	2,5	2,4
Сульфатная зола, %	0,17	0,13
Содержание родственных примесей, %	0,6	0,48
Метанол, %	0,05	< 0,01

го масла, добавляют 300 мл 12 % раствора хлороводорода в диоксане и снова перемешивают 30 мин. Сливают жидкую фазу, а остаток перемешивают с диэтиловым эфиром (3 раза по 500 мл) и затем с ацетоном (2 раза по 800 мл). Отфильтровывают образовавшийся осадок, промывают его на фильтре 2 раза по 400 мл диэтилового эфира и сушат в вакууме до постоянной массы (50 °С, 2 мм рт. ст.). Получают 168 г (81,4 %) белого мелкокристаллического VII. Содержание основного вещества 97,7 % (ВЭЖХ). $[\alpha]_D^{26} = -65,76$ (5 % раствор, хлороформ). ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/4): $R_f(\text{VI}) = 0,88$, $R_f(\text{VII}) = 0,29$. ESMS, m/z (I %): 285,6 [M+2H]²⁺ (6,6), 570,1 [M+H]⁺ (100), 608,9 [M+K]⁺ (0,7).

Z-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg(ω-NO₂)-ProNH₂ (IX). В 0,8 л диметилформамида последовательно растворяют 168 г (0,26 моль) VII, 105 г (0,26 моль) VIII, 53 г (0,35 моль) моногидрата 1-гидроксibenзотриазола и 78 г (0,77 моль) моль N-метилморфолина. После полного растворения охлаждают до 0 °С и присыпают при перемешивании 65 г (0,32 моль) мелко растёртого дициклогексилкарбодиимида. Перемешивают реакционную массу 1 ч при 0 °С и оставляют на 20 ч при 5 °С. После окончания реакции (ТСХ) выливают реакционную массу в 3 л воды и 3 л этилацетата. Добавляют гидрокарбонат натрия до pH 8. Отфильтровывают выпавшую дициклогексилмочевину, отделяют органическую фазу и промывают её 2 раза по 1,5 л насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, 1 л 5 % водным раствором лимонной кислоты и 1 л воды. Упаривают органический слой в вакууме до 0,7 л (< 50 °С) и разбавляют 3 л диэтилового эфира. Фильтруют выпавший продукт реакции, промывают его 2 раза по 300 мл диэтилового эфира и сушат сначала на воздухе, а затем в вакууме (50 °С, 2 мм рт. ст.) до постоянной массы. Получают 221 г (89 %) белого порошка IX. Содержание основного вещества 97,9 % (ВЭЖХ). $[\alpha]_D^{23} = -62,11$ (5 % раствор, хлороформ). ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/4): $R_f(\text{VII}) = 0,29$, $R_f(\text{VIII}) = 0,05$, $R_f(\text{IX}) = 0,72$. ESMS, m/z (I %): 477,8 [M+2H]²⁺ (26,1), 954,4 [M+H]⁺ (100), 976,1 [M+Na]⁺ (2,1).

H-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-ProNH₂ дигидрохлорид (X). Растворяют 160 г (0,17 моль) IX в 1,2 л ледяной уксусной кислоты, добавляют 1,5 г 20 % водной пасты гидроксида палладия и при энергичном перемешивании гидрируют 45 – 48 ч до окончания реакции (ТСХ). Отфильтровывают катализатор гидрирования. Отгоняют в вакууме растворитель (50 °С, 2 мм рт. ст.). Маслообразный остаток растирают с 2 л этилацетата, декантируют этилацетат, остаток растворяют в 800 мл метилового спирта и добавляют 200 мл 12 % раствора

хлороводорода в диоксане. Отгоняют растворители в вакууме, к остатку добавляют 1 л ацетона, отфильтровывают выпавший продукт, промывают его 2 раза по 300 мл ацетона и сушат в вакууме (45 °С, 2 мм рт. ст.) до постоянной массы. Получают 105 г (74 %) белого аморфного X. Содержание основного вещества 89,1 % (ВЭЖХ). ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/4): $R_f(\text{IX}) = 0,71$, $R_f(\text{X}) = 0,03$. ESMS, m/z (I %): 388,4 [M+2H]²⁺ (100), 775,5 [M+H]⁺ (17,2).

Лейпрорелин ацетат (I). В 350 мл диметилформамида при комнатной температуре последовательно растворяют 85 г (0,1 моль) X, 45 г (0,1 моль) XI, 20 г (0,13 моль) моногидрата 1-гидроксibenзотриазола и 20 г (0,2 моль) моль N-метилморфолина. После полного растворения в течение 5 ч прикапывают при перемешивании раствор 20 г (0,1 моль) дициклогексилкарбодиимида в 100 мл диметилформамида. Перемешивают реакционную массу 2 ч до окончания реакции (ТСХ) и добавляют 100 мл воды. Перемешивают дополнительно 30 мин, отфильтровывают выпавшую дициклогексилмочевину и упаривают растворители в вакууме (45 – 50 °С, 2 мм рт. ст.). Маслообразный остаток 3 раза перемешивают с 1 л этилацетата до порошкообразного состояния. Фильтруют, промывают 300 мл этилацетата и сушат в вакууме (40 °С, 2 мм рт. ст.) до постоянной массы. Получают 129 г серого аморфного порошка. Содержание основного вещества 63,3 % (ВЭЖХ). Выход 76,3 %. ТСХ (MeOH/CHCl₃ 1/1): $R_f(\text{X}) = 0,13$, $R_f(\text{XI}) = 0,17$, $R_f(\text{I}) = 0,81$.

Растворяют полученное вещество в 1,9 л воды, фильтруют, очищают с помощью препаративной ВЭЖХ, переводят в уксуснокислую соль и лиофилизируют. Получают 64 г белого, объёмного, аморфного порошка ацетата I. Содержание основного вещества 99,1 % (ВЭЖХ). $[\alpha]_D^{24} = -39,14$ (2 % раствор, 1 % уксусная кислота); ESMS, m/z (I %): 605,4 [M+2H]²⁺ (100), 1210,1 [M+H]⁺ (3,2).

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications*, Thieme, Germany (2009), pp. 775 – 778.
2. Патент КНР CN 101195653 A; *Chem. Abstr.*, **149**, 129090 (2008).
3. G. Etemad-Moghadam, D. Delebassee, J. P. Maffrand, *Eur. J. Med. Chem.*, **23**(6), 577 – 585 (1988).
4. R. A. Rodriguez, P. Pan, C. Pan et al., *J. Org. Chem.*, **72**(6), 1980 – 2002 (2007).
5. M. J. O. Anteuinis, C. Becu, F. Becu, et al., *Bul. Soc. Chim. Belg.*, **96**(2), 133 – 136 (1987).
6. Патент ГДР DD 226895; *Chem. Abstr.*, **106**, 19051 (1987).

Поступила 21.05.13

SYNTHESIS OF LEUPRORELIN ACETATE

A. N. Balaev, V. N. Osipov, K. A. Okhmanovich, and V. E. Fedorov

Pharm-Sintez Co., Moscow, 111024 Russia

A new process for the synthesis of leuprorelin acetate (synthetic agonist of natural gonadotropin-releasing hormone) has been developed. Using this method, it is possible to obtain the target peptide with purity above 99% on a semi-industrial scale.

Keywords: leuprorelin; liquid-phase synthesis; preparation