

# Методы синтеза и технология производства лекарственных средств

© Коллектив авторов, 2013

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

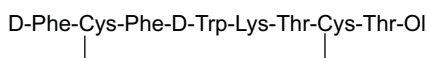
## НОВЫЙ ЖИДКОФАЗНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ОКТРЕОТИДА

ЗАО "Фарм-Синтез", Москва, Россия

Разработана технология получения октреотида — синтетического аналога природного гормона соматостатина методом жидкофазного пептидного синтеза с использованием 4 + 2 + 2 стратегии. Новый метод является легко масштабируемым и позволяет получать целевой пептид с выходом 56,4 %.

**Ключевые слова:** октреотид, жидкофазный синтез, производство.

Октреотид (I) — синтетический аналог природного гормона соматостатина [1], обладающий сходным с ним, но более продолжительным фармакологическим действием:



Октреотид, взаимодействуя со специфическими рецепторами соматостатина в различных тканях (ЦНС и ЖКТ), подавляет патологически повышенную секрецию гормона роста и пептидов, продуцируемых в гастроэнтеропанкреатической эндокринной системе. Применяется при лечении акромегалии, при опухолях, экспрессирующих рецепторы к соматостатину (эндокринные опухоли ЖКТ и поджелудочной железы), для лечения панкреатита и для профилактики и лечения

осложнений после операций на органах брюшной полости.

Для получения I могут быть использованы как методы жидкофазного синтеза пептидов [2], так и синтез на твёрдой фазе [3]. При производстве I в полупромышленном масштабе (1 – 2 кг/год) синтез в растворе более предпочтителен. Разработанный метод основан на 4 + 2 + 2 стратегии с последующим деблокированием и окислительной циклизацией (схема).

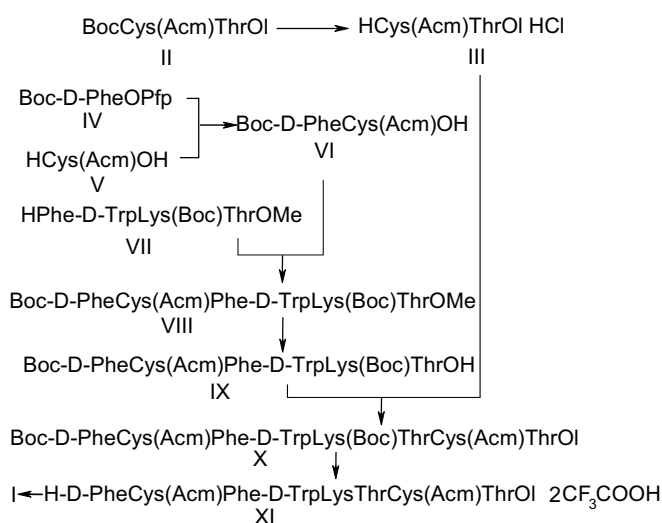
Гидрохлорид дипептида HCys(Acm)ThrOI (III) получают деблокированием BocCys(Acm)ThrOI (II) 12 % раствором хлороводорода в диоксане при 10 °С. Подобранный концентрация хлороводорода обеспечивает оптимальные условия проведения реакции. При использовании более высокой концентрации образуются значительные количества продукта замещения вторичной гидроксильной группы в треониноле на хлор, а при концентрации менее 12 % время реакции существенно увеличивается.

Дипептид Boc-D-PheCys(Acm)OH (VI) получают взаимодействием Boc-D-PheOPfp (V) с HCys(Acm)OH (IV) в диметилформамиде (ДМФА) при 10 °С с использованием имидазола в качестве катализатора.

HPhe-D-TrpLys(Boc)ThrOMe (VII), универсальный тетрапептид для синтеза аналогов соматостатина, получен по разработанной ранее схеме [4]. Реакция VII с VI с использованием стандартного карбодиимидного метода образования пептидной связи приводит к Boc-D-PheCys(Acm)Phe-D-TrpLys(Boc)ThrOMe (VIII) с высоким выходом.

Гидролиз гексапептида VIII в смеси метанол — ДМФА — вода с использованием гидроксида лития при 0 °С даёт Boc-D-PheCys(Acm)Phe-D-TrpLys(Boc)ThrOH (IX). Замена гидроксида натрия на гидроксид лития и проведение гидролиза в тройной системе метанол — ДМФА — вода позволяет не только уменьшить объём реакционной массы, но и увеличить выход одновременно с повышением чистоты получаемого гексапептида IX. Так в случае гидролиза гидроксидом

### Схема



Boc = *tert*-бутоксикарбонил

Acm = ацетамидометил

ThrOI = остаток L-треонинола (L-треонина с восстановленной

натрия в водном метаноле выход IX составил 92 %, содержание основного вещества 86,1 %. В то время как при проведении реакции в новых условиях выход составил 96,8 %, а чистота — 94,2 %.

Вос-D-PheCys(Acm)Phe-D-TrpLys(Boc)ThrCys(Acm)ThrOl (X) получают при взаимодействии IX и III в условиях, аналогичных при проведении синтеза VIII. Для перевода III в свободное основание используют эквивалентное количество N-метилморфолина.

При деблокировании X трифторуксусной кислотой (ТФУК) (0 – 5 °С) в дихлорметане получают бистрифторацетат H-PheCys(Acm)Phe-D-TrpLysThrCys(Acm)ThrOl (XI). Для предотвращения окисления индольного кольца триптофана в кислой среде добавляют 2-меркаптоэтанол и анизол. В условиях проведения процесса выход XI составил 96,6 % (содержание основного вещества 76,3 %). Пробное деблокирование X с использованием раствора хлороводорода в диоксане дало менее приемлемые результаты (выход 94,7 %, содержание основного вещества 58,1 %).

Обработка XI раствором йода в смеси метанол — вода при 0 – 5 °С приводит к удалению ацетамидометильной защиты с цистеина и одновременно окислительной циклизации деблокированного пептида с образованием I с высоким выходом. Существенными факторами для успешного проведения процесса являются медленная скорость прибавления раствора XI в реакционную массу (7 ч) и большой избыток йода (мольное соотношение  $I_2/XI > 5$ ) [5].

Разработанный жидкофазный метод синтеза позволяет получать I с общим выходом 56,4 % (исходя из VII), обладает хорошей воспроизводимостью и может быть использован в полупромышленном производстве.

### Экспериментальная часть

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе фирмы Shimadzu. Колонка: Grom-Sil 12J ODS-4HE, 5  $\mu$ m, 250 × 4,6 мм. Условия: градиент 20 % В (0 мин) 60 % В (10 мин) 70 % В (15 мин) 70 % В (30 мин), либо (вещества I и XI) градиент 20 % В (0 мин) 40 % В (20 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 °С, скорость потока осушающего газа 9 л/мин, напряжение 3500 В, целевая масса от 100 до 2000. Вещества II [6], IV [7], V [8] и VII [4] получены известными ранее способами.

**HCys(Acm)-ThrOl гидрохлорид (III).** В 6 л колбе с внешним охлаждением и механической мешалкой при перемешивании растворяют 379,5 г (1 моль) II в 1 л диоксана. После полного растворения охлаждают раствор до 10 °С и при этой температуре приливают 1,3 л

12 % раствора хлороводорода в диоксане. Через 30 мин нагревают реакционную массу до комнатной температуры и перемешивают в течение 3 ч. Выпавший порошок, тщательно растирая, фильтруют на фильтре Шотта, после чего промывают последовательно 3 раза по 1 л диоксана и 3 раза по 0,6 л гексана. Полученное вещество растворяют в 0,7 л метилового спирта и высаживают 1,4 л серного эфира. Снова фильтруют и промывают на фильтре 0,7 л серного эфира. Полученный белый, мелкокристаллический III сушат в вакууме (10 – 15 мм рт. ст.) при 40 °С до постоянной массы. Выход 259,5 г (82,2 %). Содержание основного вещества 95,1 % (ВЭЖХ).  $[\alpha]_D^{25} = +23,13$  (4 % р-р, метанол); ESMS,  $m/z$  (I %): 281,0  $[M + H]^+$  (69,7), 318,3  $[M + K]^+$  (9,8), 559,4  $[2M + H]^+$  (100), 581,2  $[2M + Na]^+$  (7,3).

**Вос-D-Phe-Cys(Acm)OH (VI).** В стеклянном реакторе (рабочий объём 20 л) с рубашкой и механической мешалкой растворяют 1518 г (3,52 моль) IV в 12,2 л ДМФА, добавляют 14 г имидазола и охлаждают до 10 °С. При перемешивании приливают раствор 710 г (3,7 моль) V в 2,8 л воды. Перемешивают реакционную массу при 10 °С 1 ч, затем в течение 2 ч доводят температуру до 35 °С и перемешивают при этой температуре 24 ч. Отгоняют ДМФА и воду на роторном испарителе (при температуре 45 – 50 °С), а остаток (светло-жёлтое масло) растворяют в 8 л этилацетата. Полученный раствор последовательно промывают 4 л воды, 4 л 5 % водного раствора лимонной кислоты, 4 л воды. Органическую фазу экстрагируют 2 раза 4 л 5 % водного раствора бикарбоната натрия. Водный слой подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH 3. Выпавшее масло перемешивают в смеси 1 л серного эфира и 2 л петролейного эфира, фильтруют на фильтре Шотта и сушат на воздухе до постоянной массы. Получают 1131 г (73,1 %) VI в виде белого аморфного порошка. Содержание основного вещества 97,5 % (ВЭЖХ).  $[\alpha]_D^{26} = -26,75$  (4 % раствор, метанол); ESMS,  $m/z$  (I %): 440,6  $[M + H]^+$  (100), 478,2  $[M + K]^+$  (55,1).

**Вос-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-ThrOMe (VIII).** В 4 л колбе с внешним охлаждением, капельной воронкой и механической мешалкой при перемешивании последовательно растворяют 347,4 г (0,5 моль) VII, 230,7 г (0,52 моль) VI и 81,5 г (0,53 моль) моногидрата 1-гидроксибензотриазола в 1,7 л ДМФА. После полного растворения охлаждают реакционную массу до 0 – 5 °С и при этой температуре в течение 30 мин добавляют раствор 113,6 г (0,55 моль) дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в 350 мл ДМФА. Перемешивают в течение 1 ч, снимают охлаждение и оставляют без перемешивания при комнатной температуре на 12 ч. Отфильтровывают выпавший осадок, промывают его на фильтре 200 мл ДМФА. Объединённую жидкую фазу при перемешивании выливают в 8,5 л 5 % водного раствора бикарбоната натрия. Выпавший осадок растворяют в 5 л этилацетата и последовательно промывают полученный раствор 1,5 л воды, 1,5 л 5 % водного раствора бикар-

боната натрия, 1,5 л 5 % водного раствора лимонной кислоты и 1,5 л воды. К органическому слою добавляют 5 л диэтилового эфира и оставляют на 1–2 ч. Выпавший осадок фильтруют, промывают на фильтре 2 раза по 0,5 л диэтилового эфира и сушат на воздухе до постоянной массы. Получают 459 г (82,3 %) белого кристаллического порошка. Содержание основного вещества 97,6 % (ВЭЖХ).  $[\alpha]_D^{28} = -29,94$  (4 % раствор, метанол); ESMS,  $m/z$  (I %): 459,0  $[M-2\text{Вос} + 2\text{H}]^{2+}$  (100), 1117,2  $[M + \text{H}]^+$  (0,9).

**Вос-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Вос)-ThrOH (IX).** В 6 л колбе с внешним охлаждением, капельной воронкой и механической мешалкой при перемешивании растворяют 500 г (0,45 моль) VIII в смеси 2,4 л метилового спирта и 1,4 л ДМФА. К полученному раствору прикапывают при 0 °С раствор 28 г (0,67 моль) моногидрата гидроксида лития в 1,2 л воды в течение 20–30 мин. Перемешивают реакцию массу при этой температуре 1 ч, после чего прикапывают 1 н. раствор соляной кислоты до pH 4. При интенсивном перемешивании выливают реакцию массу в смесь 8 л воды и 3 л серного эфира. Отфильтровывают выпавший осадок, промывают его на фильтре 2 л воды и затем 1 л серного эфира. Сушат на воздухе до постоянной массы. Получают 478 г (96,8 %) белого порошка. Содержание основного вещества 94,2 % (ВЭЖХ).  $[\alpha]_D^{26} = -26,25$  (4 % раствор, метанол); ESMS,  $m/z$  (I %): 452,0  $[M-2\text{Вос} + 2\text{H}]^{2+}$  (100), 1103,2  $[M + \text{H}]^+$  (1,2).

**Вос-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Вос)-Thr-Cys(Acm)-ThrOl (X).** В 3 л колбе с внешним охлаждением, капельной воронкой и механической мешалкой при перемешивании последовательно растворяют 325 г (0,29 моль) IX, 102,5 г (0,32 моль) III, 49,8 г (0,33 моль) моногидрата 1-гидроксибензотриазола и 32,4 г (0,32 моль) N-метилморфолина в 1,4 л ДМФА. После полного растворения смесь охлаждают до 0 °С и при перемешивании прикапывают раствор 68,1 г (0,33 моль) ДЦК в 100 мл ДМФА. Перемешивают 1 ч при 0–5 °С и 12 ч при комнатной температуре. Отфильтровывают выпавший осадок и при перемешивании выливают в 6 л воды, содержащей 60 г бикарбоната натрия. Центрифугируют выпавшее вещество (4200 об/мин, 10 °С, 20 мин), остаток суспендируют с 3 л 5 % водного раствора лимонной кислоты и снова центрифугируют в тех же условиях. Полученное вещество сушат на воздухе до постоянной массы. Выход 390 г (98,6 %). Содержание основного вещества 89,1 % (ВЭЖХ). ESMS,  $m/z$  (I %): 633,0  $[M-\text{Вос} + 2\text{H}]^{2+}$  (100), 1364,4  $[M + \text{H}]^+$  (1,1).

**H-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-ThrOl бис-трифторацетат (XI).** В 3 л колбе с внеш-

ним охлаждением, капельной воронкой и механической мешалкой суспендируют 390 г (0,286 моль) X (чистотой 89,1 %) в 1,3 л хлористого метилена. К полученной суспензии приливают 83 мл 2-меркаптоэтанола и 105 мл анизола. Охлаждают реакцию массу до 0–5 °С и при этой температуре в течение 30 мин прикапывают 1,1 л ТФУК. Перемешивают в течение 2 ч при 5 °С, после чего выливают в 3,5 л холодного (0 °С) серного эфира. Центрифугируют выпавшее вещество (4200 об/мин, 10 °С, 20 мин), осадок суспендируют с 1,3 л серного эфира и снова центрифугируют в тех же условиях. Полученное вещество сушат на воздухе до постоянной массы. Содержание основного вещества 76,3 % (ВЭЖХ). Выход 504 г (96,6 % по содержанию основного вещества). ESMS,  $m/z$  (I %): 633,0  $[M + 2\text{H}]^{2+}$  (100), 1364,4  $[M + \text{H}]^+$  (0,9).

**Октреотид (I).** В стеклянном реакторе (рабочий объем 25 л) с рубашкой и механической мешалкой растворяют 411 г (1,62 моль) йода в 12 л 90 % водного метанола. К полученному раствору при перемешивании и температуре 0–5 °С в течение 7 ч добавляют раствор 504 г (0,282 моль) XI (содержание основного вещества 76,3 %) в 5 л 90 % водного метанола. Перемешивают реакцию массу при 0–5 °С в течение 2 ч и, не снимая охлаждения, для удаления избытка йода последовательно приливают 2,46 л 0,5 моль раствора сульфата натрия, 827 мл 4 моль раствора гидроксида натрия и 351 мл уксусной кислоты. Отгоняют метанол в вакууме на роторном испарителе (температура бани не выше 45 °С). К остатку добавляют 0,8 % раствор уксусной кислоты до объема 13 л и перемешивают на роторе при 20–25 °С 2 ч. Полученный раствор фильтруют и передают на стадию хроматографической очистки [5]. Содержание октреотида в растворе 16,44 мг/мл (ВЭЖХ). Выход 213,7 г (74,4 %). ESMS,  $m/z$  (I %): 510,5  $[M + 2\text{H}]^{2+}$  (100), 1020,3  $[M + \text{H}]^+$  (0,3).

## ЛИТЕРАТУРА

1. A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications* (5th ed.), Thieme, Germany (2009), pp. 994–996.
2. Заявка WO 2003097668 A2; *Chem. Abstr.*, **140**, 931386 (2003).
3. W. Weiguo, Y. Ming, L. Peihua, *Jingxi Huagong*, **24**(10), 1033–1036 (2007).
4. А. Н. Балаев, В. Н. Осипов, К. А. Охманович и др., *Рос. биотер. ж.*, **10**(4), 43–45 (2011).
5. Патент России RU 2441018; *Chem. Abstr.*, **157**, 128617 (2012).
6. Заявка WO 2007110765 A2; *Chem. Abstr.*, **147**, 407102 (2007).
7. D. Lim, F. Fang, G. Zhou, et al., *Org. Lett.*, **9**(21), 4139–4142 (2007).
8. Патент Германии DE 4032187 A1; *Chem. Abstr.*, 117, 70333 (1992).

Поступила 04.06.12

## NEW METHOD FOR LIQUID-PHASE SYNTHESIS OF OCTREOTIDE

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

Pharm-Sintez Company, ul. Vavilova 15, Moscow, 117312 Russia

A new process for the preparation of octreotide (synthetic analog of natural hormone somatostatine) has been developed based on the 4+2+2 strategy using liquid-phase peptide synthesis. The proposed method is easy to implement and ensures large-scale synthesis of the target peptide with up to 56.4% yield.

**Keywords:** octreotide; liquid-phase synthesis; commercial production