

З. С. Шпрах, И. В. Ярцева, Е. В. Игнатьева, А. П. Смирнова, Л. П. Сушинина, С. В. Устинкина, Л. И. Смирнова, А. П. Будько, Н. И. Зимакова

СИНТЕЗ И ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛОГА СОМАТОСТАТИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

ФГБУ "РОНЦ им. Н. Н. Блохина" РАМН, Москва, Россия

Синтезирован аналог соматостатина, обладающий гормональной и противоопухолевой активностью. Разработан оптимальный метод синтеза, позволяющий получать стандартную фармацевтическую субстанцию аналога соматостатина для доклинических и клинических исследований. Разработаны методики контроля качества, которые будут включены в проект ФСП на фармацевтическую субстанцию аналога соматостатина.

Ключевые слова: соматостатин (ССТ); синтез пептидов; противоопухолевая активность; химико-фармацевтический анализ.

В последние годы наука достигла значительных успехов в изучении механизма злокачественной трансформации клеток и процесса метастазирования новообразований. Это позволило определить новые мишени воздействия потенциальных противоопухолевых средств [1, 2].

В свете современных представлений о значении гормонов в развитии гормонозависимых опухолей повышенный интерес вызывает поиск принципиально новых противоопухолевых веществ среди пептидных гормонов гипоталамуса, действие которых опосредовано рецепторным взаимодействием [3, 4].

Особое внимание привлекает гипоталамический гормон соматостатин (ССТ), который угнетает выделение гормона роста, пролактина, инсулина, глюкагона, гормонов поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта, стимулирующих пролиферативные процессы в клетке [5]. Механизм ингибирования секреторных и пролиферативных процессов с участием ССТ и его аналогов реализуется через специфические рецепторы, которые широко представлены в клетках тканей-мишеней: в ЦНС (гипоталамус, гипофиз, спинной мозг), желудочно-кишечном тракте (преимущественно в поджелудочной железе, желудке, верхних отделах тонкого кишечника) и мелкоклеточном раке лёгкого [6].

В ФГБУ "РОНЦ им. Н. Н. Блохина" РАМН на протяжении ряда лет проводились исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду аналогов гипоталамических гормонов [7]. Синтезировано около 40 аналогов ССТ. По результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности отобран один аналог ССТ (защищенный по функциональным группам пентапептид — метиловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-L-лизил-L-треонина, I) для создания лекарственной формы и ее доклинического и клинического изучения.

Пентапептид I подавляет секрецию соматотропного гормона (СТГ). Содержание пролактина и инсулина достоверно снижалось после его применения в диапазоне доз.

При изучении противоопухолевой активности найдено, что синтезированный аналог ССТ I обладает высокой активностью на перевиваемых опухолях мышей, ингибируя рост аденокарциномы простаты крыс R-3327-H, опухоли молочной железы крыс, индуцированной диметилбензальдегидом (ДМБА), и перевиваемого рака молочной железы человека РМЖ-1 у бестимусных мышей. При этом на ДМБА-индуцированных опухолях молочной железы, а также на РМ-1 у бестимусных мышей синтезированный пептид I превосходит по противоопухолевой активности применяемый в медицине аналог ССТ — сандостатин [8, 9].

Полученные результаты изучения противоопухолевой активности пептида I позволили передать его на доклиническое изучение, которое требует использования большого количества активной фармацевтической субстанции. В связи с этим была поставлена задача оптимизации и масштабирования синтеза. Результатом решения поставленной задачи является представленный в статье оптимальный синтез пептида I. В статье также приведен выбор критериев качества для разработки проекта фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на субстанцию препарата I.

Синтез I осуществляли классическими методами пептидной химии. При реализации намеченной схемы синтеза реакции конденсации проводили в условиях, сводящих возможность рацемизации отдельных аминокислот к минимуму. При синтезе фрагментов использовали метод смешанных ангидридов.

Выбор защитных групп определялся требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^{α} -защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α -аминогрупп на всех стадиях синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу (Boc). Карбоксильную группу C-концевого аминокислотного остатка треонина защищали этерификацией (метиловый эфир). Для защиты реакционноспособной группы лизина в боковой цепи использовали бензилоксикарбонильную защиту (Z), для защиты боковой группы цистеина использовали тетрагидропиранильную защиту (Thr).

Синтез пептида I представлен на схеме.

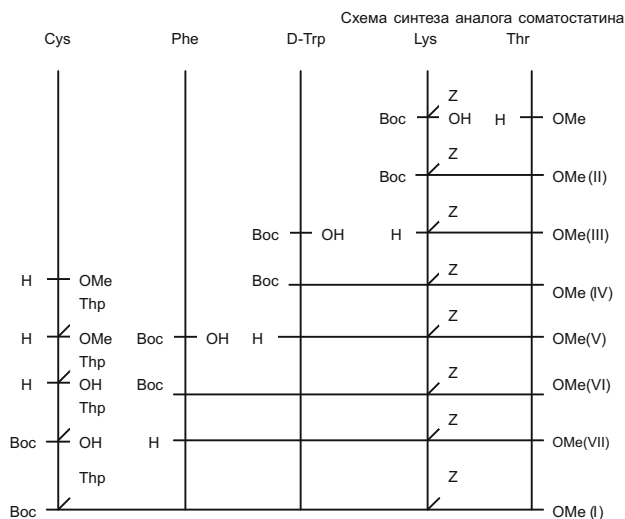


Схема синтеза аналога соматостатина

Выбор основных параметров и критериев качества субстанции

Описанный ниже метод синтеза пептида I позволяет получить стандартную фармацевтическую субстанцию. При проведении химико-фармацевтической стандартизации аналога ССТ учитывали его химическую структуру и физико-химические свойства. Выбор критериев и параметров оценки качества и разработку методик контроля качества осуществляли на сериях субстанции I, полученных в разное время в лаборатории химического синтеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН. В соответствии с требованиями Отраслевого стандарта «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» 91500.05.001-00, требованиями ГФ XI, вып. I и вып. 2, а также ГФ XII, часть I, во внимание принимали обязательный набор критериев и параметров качества, регламентированный для характеристики фармацевтической субстанции: описание (внешний вид), подлинность, растворимость, температура плавления, удельное вращение, прозрачность раствора, цветность раствора, посторонние примеси (родственные соединения), сульфатная зола и тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании или вода, определяемая по методу К. Фишера, микробиологическая чистота, количественное определение.

По внешнему виду все серии препарата представляли собой негигроскопичный кристаллический порошок белого цвета со слабым желтоватым оттенком без запаха. Все изученные образцы имели температуру плавления от 121 до 125 °С (ГФ XII, часть 1, с. 29).

Подлинность субстанции подтверждали хроматографией в тонких слоях сорбента — наличие на хроматограмме одного пятна, соответствующего I, и ВЭЖХ — по времени удерживания основного вещества в выбранных хроматографических условиях.

Растворимость определяли по методике ГФ XII, часть 1, с. 92. По принятой в ГФ XII терминологии и на основании данных по количественному соотношению вещества — растворитель аналог соматостатина всех испытанных серий растворим в хлороформе и ДМФА (1:20); мало растворим в спирте этиловом 95 %

(1:200) и ацетоне (1:300); очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах (1:550); практически нерастворим в воде (1:более 10000).

Определение оптического вращения проводили для 1 % раствора препарата в диметилформамиде (ДМФА) (ГФ XII, часть 1, с. 54). Вещество дополнительно не высушивали, учитывая, что оно негигроскопично. Для всех проанализированных серий субстанции полученные результаты укладывались в интервал от +17,5° до +19,0°.

Прозрачность и цветность определяли для спиртовых растворов препарата согласно требованиям ГФ XII, часть 1, с. 98 (прозрачность) и ГФ XII, часть 1, с. 93 (степень окраски жидкостей). Установлено, что 0,5 % растворы всех исследованных образцов I в спирте этиловом 95 % удовлетворяли требованиям прозрачности, были бесцветными или окраска их не превышала интенсивности окраски эталона Y₆.

Наиболее вероятными примесями в субстанции, исходя из метода ее получения и выделения, являются *трет*-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранилцистеин и трифторацетат метилового эфира VII. Определение этих примесей проводили методом ВЭЖХ.

Все изученные серии были практически свободны от золы (ГФ XII, ч. 1, с. 115) и тяжелых металлов (ГФ XII, ч. 1, с. 165).

Исходя из условий выделения, препарат может содержать некоторое количество воды, которая достаточно легко удаляется при нагревании в сушильном шкафу до постоянной массы, оптимально при температуре 100 – 105 °С (по ГФ XI, вып. 1, с. 176). В испытанных образцах субстанции потеря в массе практически отсутствовала. Те же образцы содержали не более 1,0 % воды, определенной по методу К. Фишера (ГФ XI, вып. 1, с. 176).

Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли на анализаторе температуры плавления с цифровым термометром (Sanyo Gallenkamp, Япония). Удельное вращение измеряли на поляриметре «Unipol L» (Германия). Для очистки защищенного пентапептида I использовали колоночную хроматографию на силикагеле Kieselgel 40/63 (Merck, Германия). Для тонкослойной хроматографии применяли пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (Sorbfil, Россия) с тонким слоем силикагеля и использовали следующие системы растворителей: хлороформ — метанол, 9:1 (система 1); хлороформ — метанол, 15:1 (система 2); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (система 3). Вещества обнаруживали на хроматограммах при обработке парами йода, а также при проявлении 0,5 % раствором нингидрина в этаноле. Данные элементного анализа соответствуют рассчитанным.

Количественное определение пептида I и содержание примесей в субстанции проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Adgilent 1200 (Adgilent Technologies, США). Колонка YMC-Pack SiO₂ (150 × 3 мм, 5 мкм, поры 6 нм). Элюент — смесь гептан — метанол — хлороформ, 23:2,2:2.

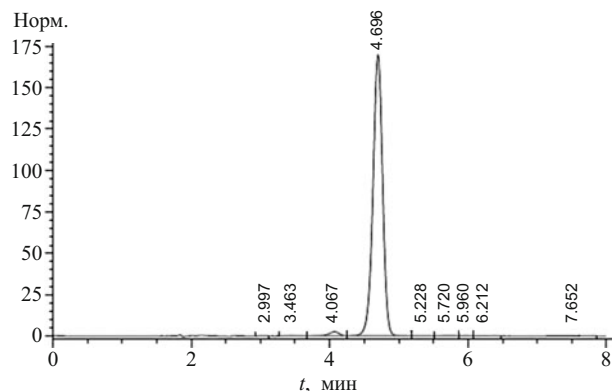
Метилловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (II). К охлажденному до -15°C раствору 10,8 г (28 ммоль) N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизина в 40 мл тетрагидрофурана (ТГФ) прибавляют при перемешивании 3,08 мл (28 ммоль) N -метилморфолина и 3,68 мл (28 ммоль) изобутилхлорформиата. Смесь выдерживают 15 мин при -15°C , затем прибавляют к ней охлажденную смесь 3,08 мл (28 ммоль) N -метилморфолина и 4,35 г (28 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L -треонина в 40 мл ДМФА. Смесь выдерживают 18 ч в холодильнике, упаривают в вакууме и остаток растворяют в 300 мл этилацетата. Раствор промывают 5 % раствором лимонной кислоты, водой, 5 % раствором бикарбоната калия, водой, высушивают над сульфатом натрия и упаривают в вакууме. Получают 11,3 г (80,3 %) густого маслянистого соединения II. R_f 0,53 (система 1), $[\alpha]_D^{20} - 10^{\circ}$ (с 1,0, метанол).

Хлоргидрат метилового эфира N^{α} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (III). К 11,3 г (22 ммоль) дипептида II прибавляют 70 мл 10 % раствора хлористого водорода в диоксане, полученный раствор выдерживают 45 мин при 20°C , затем упаривают в вакууме и остаток растирают с эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают эфиром и высушивают в вакууме. Получают 8,35 г (84 %) соединения III. R_f 0,44 (система 3), т. пл. $159 - 160^{\circ}\text{C}$.

Метилловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- D -триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (IV). К охлажденному до -15°C раствору 5,89 г (19 ммоль) N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- D -триптофана в 30 мл ТГФ прибавляют при перемешивании 2,09 мл (19 ммоль) N -метилморфолина и 2,5 мл изобутилхлорформиата. Смесь выдерживают 15 мин при -15°C , а затем к ней прибавляют охлажденную смесь 2,09 мл (19 ммоль) N -метилморфолина и 8,35 г (19 ммоль) дипептида III в 30 мл ДМФА. Реакционную смесь выдерживают 18 ч в холодильнике, упаривают в вакууме и остаток растворяют в 250 мл этилацетата. Далее смесь промывают, как при получении соединения II. Получают 9 г (68 %) кристаллического пептида IV. R_f 0,44 (система 1), $[\alpha]_D^{20} - 25,5^{\circ}$ (с 1,0, метанол), т. пл. $116 - 117^{\circ}\text{C}$. $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_9$.

Трифторацетат метилового эфира D -триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (V). 9 г (16,5 ммоль) трипептида IV растворяют в 80 мл смеси трифторуксусной кислоты (ТФУ) и хлористого метилена (1:1), прибавляют 0,1 мл β -меркаптоэтанола и оставляют на 45 мин при комнатной температуре, затем упаривают в вакууме и растирают с эфиром. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают эфиром и отфильтровывают. Получают 8,8 г (95,82 %) соединения V. R_f 0,52 (система 3), т. пл. $113 - 114^{\circ}\text{C}$.

Метилловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- L -фенилаланил- D -триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (VI). К охлажденному до -15°C раствору 3,34 г (12,6 ммоль) N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- L -фенилаланина в 30 мл ТГФ при перемешивании прибавляют 1,39 мл N -метилморфолина и 1,64 мл



Хроматограмма субстанции пептида I

(12,6 ммоль) изобутилхлорформиата. Смесь выдерживают 15 мин при -15°C , затем прибавляют к ней охлажденный раствор 8,8 г (12,6 ммоль) соединения V и 1,39 мл (12,6 ммоль) N -метилморфолина в 30 мл ДМФА. Реакционную смесь выдерживают 18 ч в холодильнике, упаривают в вакууме и остаток растворяют в 200 мл этилацетата. Далее смесь обрабатывают, как при получении соединения II. Получают 9,08 г (85,9 %) пептида VI, который очищают препаративной хроматографией на силикагеле, нанося вещество на колонку в 0,5 % растворе метанола в хлороформе, а затем элюируют пептид раствором метанола в хлороформе в градиенте от 1 до 3 % метанола. Получают 5,6 г (52 %) соединения VI. R_f 0,55 (система 1), $[\alpha]_D^{20} - 7^{\circ}$ (с 1,0, ДМФА), т. пл. $97 - 99^{\circ}\text{C}$ (с разложением). $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{10}$.

Трифторацетат метилового эфира L -фенилаланил- D -триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (VII). 3 г соединения VI растворяют в 40 мл смеси ТФУ и хлористого метилена в соотношении (1:1), прибавляют 0,1 мл β -меркаптоэтанола и оставляют на 45 мин при комнатной температуре, раствор упаривают и остаток растирают в эфире. Получают 2,4 г (78 %) соединения VII.

Метилловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- S -тетрагидропиранил- L -цистеинил- L -фенилаланил- D -триптофил- N^{ϵ} -карбобензоксид-лизил- L -треонина (I). К охлажденному до -15°C раствору 0,87 г (2,84 ммоль) N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- S -тетрагидропиранил- L -цистеина (полученный по методике, приведенной в [10] без выделения через дициклогексиламмонийную соль) в 20 мл ТГФ прибавляют 0,31 мл (2,84 ммоль) N -метилморфолина и 0,37 мл (2,84 ммоль) изобутилхлорформиата. Смесь выдерживают 15 мин при -15°C , затем прибавляют к ней охлажденный до -15°C раствор 2,4 г (2,84 ммоль) соединения (VI) и 0,31 мл (2,84 ммоль) N -метилморфолина в 20 мл ДМФА. Реакционную смесь оставляют на 18 ч в холодильнике, упаривают в вакууме и остаток растворяют в 150 мл этилацетата, далее смесь обрабатывают, как при получении соединения VI. После хроматографии на колонке получили 0,9 г (31 %) пептида I R_f 0,57 (система 1), R_f 0,45 (система 2), $[\alpha]_D^{20} - 18,8^{\circ}$ (с 1,0, ДМФА), с т. пл. $125 - 126^{\circ}\text{C}$.

C₅₂H₆₉N₇O₁₂S. ВЭЖХ: время удерживания — 4,7 мин. Содержание целевого пептида — 97,02 %.

Методики контроля качества субстанции

Определение подлинности аналога соматостатина методом ТСХ. 0,01 г препарата растворяют в 2 мл хлороформа. На линию старта хроматографической пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (или аналогичного качества) размером 15 × 15 см наносят 10 мкл полученного раствора.

Пластинку с нанесенной пробой подсушивают на воздухе в течение 3 мин, помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей хлороформ – метанол (9:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей достигнет 12 см, пластинку вынимают из камеры и тщательно высушивают на воздухе до удаления запаха растворителей (80 °С). Пластинку помещают в камеру, насыщенную парами хлора. Пластинку выдерживают в камере в течение 5 – 10 мин, а затем опрыскивают 0,05 % водным раствором калия йодида. При этом в пробе обнаруживают одно пятно с R_f около 0,57.

Определение количественного содержания пептида I, его подлинности и родственных соединений методом ВЭЖХ. Около 25 мг препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл подвижной фазы и доводят подвижной фазой до метки. 5 мкл полученного раствора вводят в колонку УМС-Pack SiO₂ (150 × 3 мм, 5 мкм, поры 6 нм) жидкостного хроматографа. Разделение проводят при температуре 25 °С элюированием смесью гептан — метанол — хлороформ (без освобождения от стабилизатора), 23:2,2:21 (по объему). Скорость подачи подвижной фазы — 0,4 мл/мин.

Детектирование проводят с использованием спектрофотометрического детектора с фиксацией оптической плотности при длине волны 290 ± 4 нм. Время удерживания (RT) основного вещества составляет около 4,7 мин.

Относительное стандартное отклонение времени удерживания основного вещества (RSD RT) не превышало 2 %.

При детектировании на хроматограммах обнаруживали до 5 пиков с временами выхода от 0,64 до 1,63 относительно времени выхода основного вещества (RRT). Пики с RRT 0,64 и 0,74 являются пиками растворителя и не принимались во внимание при расчете содержания родственных соединений в препарате.

Содержание единичной примеси в препарате рассчитывают методом внутренней нормализации по формуле:

$$X = \frac{S_i}{S_1 + S_2 + \dots + S_i} \times 100 \%,$$

где S_i — площадь пика единичной примеси; S₁ + S₂ + ... + S_i — суммарная площадь основных пиков.

Все изученные серии содержали не более 1,0 % единичной примеси и не более 5 % суммы примесей.

Все исследованные образцы субстанции I в рамках разработанной методики содержали не менее 96 % активного вещества. Хроматограмма одного из образцов представлена на рисунке.

Стабильность активной субстанции I изучали при хранении в защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С (холодильная камера).

Показано, что I стабилен в течение не менее 2 лет. Исследования стабильности продолжаются.

Таким образом, разработан оптимальный метод синтеза, позволяющий получать стандартную фармацевтическую субстанцию пептида I. Разработаны методики контроля качества, которые будут включены в проект ФСП на фармацевтическую субстанцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Р. Личиницер, Е. В. Степанова, *Этюды химиотерапии*, В. А. Горбунова, Е. В. Артамонова, С. Г. Базин и др. (ред.), Литтерра, Москва (2006), сс. 28 – 30.
2. М. Р. Личиницер, Е. В. Степанова, *Этюды химиотерапии*, Горбунова В. А. Артамонова Е. В., Базин С. Г. и др. (ред.), Литтерра, Москва (2006), сс. 31 – 38.
3. A. V. Schally, A. M. Comary-Schally, A. Nagy, et al., *Front. Neuroendocrinol.*, **22**(2001), pp. 248 – 291.
4. G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert, et al., *Nature Rev. Drug Discovery*, **2**, 999 – 1017 (2003).
5. L. Buscail, F. Vernejoul, and P. Faure, *Ann Endocrinol*, **63**, 2S13 – 2S18 (2002).
6. Н. Т. Райхлин, Е. А. Смирнова, В. В. Делекторская, *Вопросы онкологии*, **56**(1), 7 – 13 (2010).
7. Л. И. Смирнова, З. С. Смирнова, С. В. Устинкина и др., *Экспериментальная онкология на рубеже веков*, Москва (2003), сс. 261 – 280.
8. И. Ю. Кубасова, З. С. Смирнова, И. П. Осетрова и др., *Рос. биотер. ж.*, № 1, 29 (2003).
9. L. I. Smirnova, A. P. Smirnova, S. V. Ustinkina, et al., *J. Peptide Sci.*, *3rd International and 28th European Peptide Symposium*, September 5 – 10, Prague, Czech Republic (2004), pp. 261.
10. *Chem. Ber.*, **102**, 1048 – 1052 (1969).

Поступила 27.09.13

SYNTHESIS AND CHEMICO-PHARMACEUTICAL CHARACTERIZATION OF SOMATOSTATIN ANALOG WITH ANTITUMOR ACTIVITY

Z. S. Shprakh, I. V. Yartseva, E. V. Ignat'eva, A. P. Smirnova, L. P. Sushinina, S. V. Ustinkina, L. I. Smirnova, A. P. Bud'ko, and N. I. Zimakova

Blokhin Russian Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia;

A new somatostatin analog with hormonal and antitumor activity has been synthesized. Optimal synthesis procedure that allows one to obtain a standard substance of somatostatin analog for preclinical and clinical trials has been developed. Quality control techniques to be included into manufacturer's monograph of the proposed somatostatin analog have been worked out.

Keywords: somatostatin analogue; peptide synthesis; antitumor activity; chemico-pharmaceutical analysis