

SYNTÉZA PROTEINKINASOVÝCH INHIBITORŮ

FRANCESCA SCARPITTA^a, AUGUSTO CANAVESI^a a ALEXANDR JEGOROV^b

^a Sicom S.r.l., via Terrazzano 77, 20017 Rho, Itálie, ^b Teva Czech Industries s.r.o., Ostravská 29, 447 70 Opava, Česká republika
alexandr.jegorov@tevapharm.cz

Došlo 14.3.2011.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

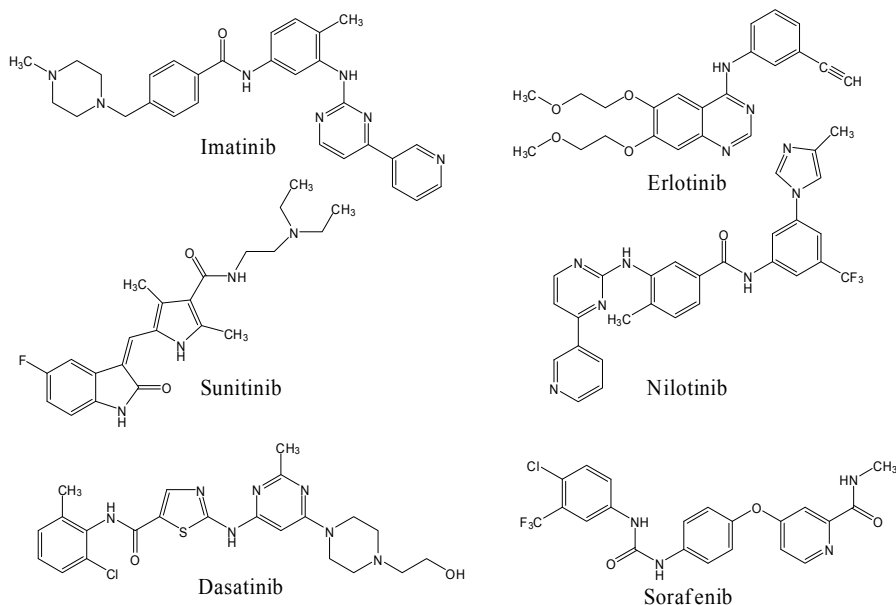
Klíčová slova: proteinkinasy, proteinkinasové inhibitory, sorafenib báze, sorafenib tosylát

Úvod

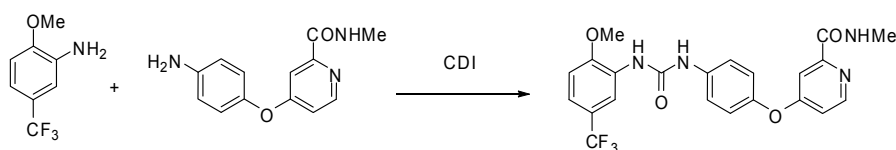
Proteinkinasy jsou skupinou enzymů, které katalyzují přenos fosfátu z ATP na některé aminokyseliny v proteinech. Podle aminokyseliny je možno kiny rozdělit na tyrosin nebo serin/threonin specifické proteinkinasy. Fosforylace aminokyselin v proteinech ovlivňuje řadu jejich funkcí v buňce a na membránách, mimo jiné souvisejících např. s kontrolou buněčného cyklu, jehož prostřednictvím je tak možno zastavit např. růst nádorových bu-

něk. Jednotlivé typy nádorových buněk vykazují přítomnost odlišných proteinkin a rovněž různé inhibitory vykazují odlišný mechanismus účinku, některé působí jako ATP-kompetivní inhibitory, které se vážou na neaktivní konformaci enzymu, jiné se váží na aktivní konformaci enzymu a vykazují obvykle účinek duálních inhibitorů, např. i na více typů kinas. Vzhledem k tomu, že je vznik a rozvoj některých typů rakovin podmíněn přítomností určitých molekulárních markerů, naskýtá se možnost léčit některé typy rakovin u jednotlivých pacientů „na míru“ s použitím specifických inhibitorů proteinkin. Takovýto cílený přístup k léčbě, nejen s použitím inhibitorů proteinkin, se nově označuje jako genomická medicína^{1–3}. Výhoda nespočívá pouze v tom, že je léčba cílená a neztrácí se čas zkoušením různých obecných terapeutických postupů, ale proteinkinasové inhibitory vykazují výrazně nižší cytotoxicitu než klasická chemoterapeutika a vedou tak nejen k prodloužení života, ale zejména k zlepšení kvality života v důsledku podstatně menších vedlejších účinků.

Potřeba proteinkinasových inhibitorů s různou specifitou a mechanismem účinku vedla k syntéze tisíců nových molekul. Za několik posledních let bylo klinicky otestováno a následně schváleno více než 10 různých proteinkinasových inhibitorů a velký počet je jich ve stadiu klinického testování. Struktura některých proteinkinasových inhibitorů je uvedena na obr. 1. Jak je patrné, struktury, které vznikly na základě optimalizace a testování na receptorech, zdaleka nejsou jednoduché a zabezpečit jejich dostupnost pro co největší počet potřebných pacientů vyžaduje značnou invenci při vývoji efektivních syntetických postupů.



Obr. 1. Proteinkinasové inhibitory

Obr. 2. Příprava sorafenibu podle US 7,235,576 (cit.⁶)

Příklad potřeby takového syntetického vývoje lze dokumentovat např. na syntéze sorafenibu. Sorafenib tosylát byl uveden na trh firmou Bayer pod obchodním názvem Nexavar[®] pro léčbu pokročilého světlobuněčného renálního a hepatocelulárního karcinomu. Kromě toho je použití sorafenibu tosylátu testováno i u jiných typů rakovin, např. při léčbě rakoviny plic^{4,5}. Sorafenib je inhibítozem růstových faktorů, které stimulují buněčnou proliferaci a diferenciaci (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR α a c-Kit).

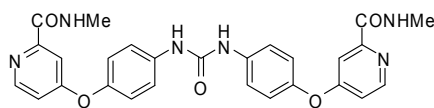
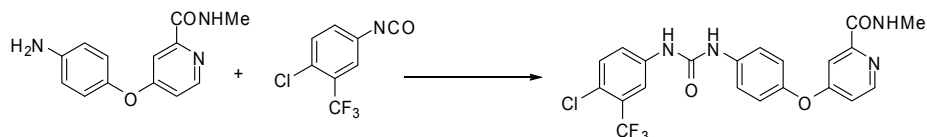
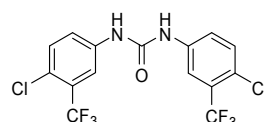
Jedna ze syntéz je popsána v patentu US 7,235,576 (cit.⁶). Dechlor-analog sorafenibu se připravuje reakcí 4-(2-(*N*-methylkarbamoyl)-4-pyridyloxy)anilinu s 5-(trifluormethyl)-2-methoxyanilinem a 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) v dichlormethanu (obr. 2).

Chromatografické přečištění produktu však poskytuje velmi nízké výtěžky (přibližně 30 %). Kromě toho je popsáno, že při reakci anilinů s 1,1'-karbonyldiimidazolem vznikají jako nečistoty symetrické močoviny, jako např. 1,3-bis[4-(2-(*N*-methylkarbamoyl)-4-pyridyloxy)fenyl]močovina (obr. 3), bez možnosti je odstranit jinak, než právě chromatograficky.

Alternativní syntéza báze sorafenibu je popsána v patentech US 7,235,576 (cit.⁶) a WO2006/034796 (cit.⁷) z 4-(2-(*N*-methylkarbamoyl)-4-pyridyloxy)anilinu a 4-chlor-3-(trifluormethyl)fenyl isokyanátu (obr. 4).

Reaktivní isokyanátový intermediát se připravuje podle patentu US 2,745,874 (cit.⁸) z příslušného derivátu anilinu. Tento patent rovněž popisuje reakci isokyanátu s anilínem za vzniku difenylmočoviny, např. 1,3-bis(4-chlor-3-trifluorfenyl)močoviny (obr. 5).

Syntéze popsané v obr. 2 a vzniku močoviny jako nečistoty (obr. 3) se z pohledu možnosti vývoje průmyslového

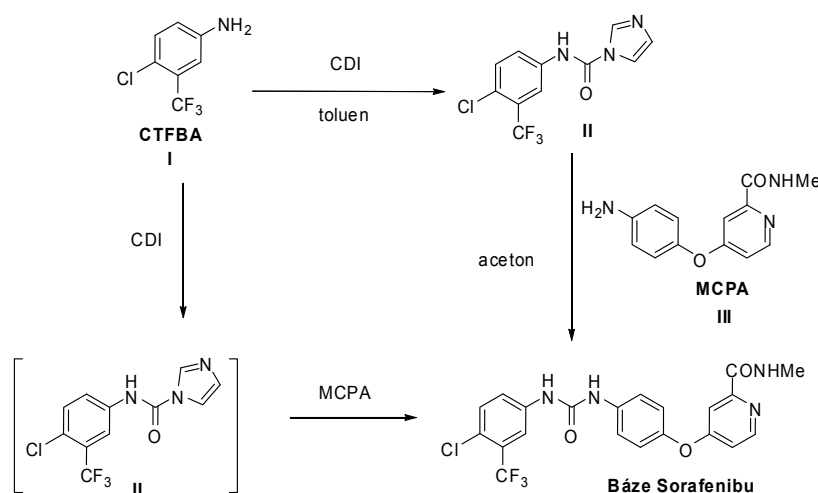
Obr. 3. 1,3-bis[4-(2-(*N*-methylkarbamoyl)-4-pyridyloxy)fenyl]močovinaObr. 4. Alternativní příprava sorafenibu podle US 7,235,576 (cit.⁶)

Obr. 5. 1,3-bis(4-chlor-3-trifluorfenyl)močovina

procesu věnuje Bankson a spol.⁹. Popisuje, že pro zamezení vzniku těžko odstranitelných močoviny je klíčové pracovat ve velmi malém objemu rozpouštědel (ne více než v desetinásobku). Ovšem ani tento článek neuvádí postup, jak by bylo možno močoviny odstranit, uvádí pouze příklad přípravy báze sorafenibu syntézou v jednom kroku aktivací 4-chlor-3-(trifluormethyl)anilinu 1,1'-karbonyldiimidazolem ve dvacetinásobku objemu dichlormethanu, avšak bez uvedení čistoty vzniklého produktu.

Experimentální část

Byly vyvinuty dva postupy založené na aktivaci 4-chlor-3-(trifluormethyl)anilinu (CTFBA, I) 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI). V prvním z těchto postupů je izolován imidazolyl derivát (intermediát II, obr. 6) a při druhém postupu je v jednom kroku syntetizována báze sorafenibu. Báze sorafenibu je poté krystalována z alkoholů (např. methanolu, ethanolu, 2-propanolu, propanolu, butanolu nebo 2-methylpropanolu), ketonů (např. acetonu, 2-butanonu, methyl isobutyl ketonu), etherů (THF, Me-THF) nebo z esterů karboxylových kyselin, např. ethyl acetátu. Tyto postupy vedou k bázi sorafenibu o vysoké čistotě (> 99,8 % HPLC) bez vzniku těžko odstranitelné 1,3-bis[4-(2-(*N*-methylkarbamoyl)-4-pyridyloxy)fenyl]močoviny. Báze sorafenibu byla následně převedena na tosylát, který je používán pro výrobu lékové formy.



Obr. 6. Nově vyvinuté postupy přípravy báze sorafenibu

Přístroje a metody

Identifikace jednotlivých látek byla prováděna metodami hmotnostní spektrometrie v +ESI módu na přístroji Finnigan LCQ a NMR spektroskopii na přístroji Bruker Avance III 400 Hz (400,13 MHz pro ^1H , 100,61 MHz pro ^{13}C , 376,50 MHz pro ^{19}F , 40,54 MHz pro ^{15}N , $\text{DMSO-}d_6$, 30 °C) s použitím experimentů ^1H , ^{13}C , ^{19}F , $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ gHSQC, $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ gHMBC, a $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ gHMBC. Vzhledem k nestabilitě intermediátu II (obr. 6) v roztoku byla zároveň měřena NMR spektra v pevném stavu (^{13}C CP/MAS NMR) na přístroji Bruker Avance 500 WB/US NMR, 125 MHz (Karlsruhe, Germany) s rotací při magickém úhlu (MAS) a frekvenci $\omega_r/2\pi = 11$ kHz. Veškeré experimenty poskytly konzistentní MS data a kompletní přiřazení signálů v souladu se strukturami.

Příprava intermediátu II

K roztoku CTFBA (I, 15 g) v 1,2-dichlorethanu (150 g) byl přidán 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI, 12,4 g, 1,0 ekv). Reakce byla prováděna v atmosféře N_2 . Reakční směs byla zahřata na 30 °C, přičemž došlo k rozpuštění komponent a dále byl roztok míchán 16 hodin při teplotě 20–22 °C. Intermediát II (viz obr. 6) se vyloučil v pevném stavu, byl odfiltrován, promyt 1,2-dichlorethanem a sušen ve vakuu při teplotě 20–22 °C přes noc. Intermediát II byl izolován ve formě bezbarvého prášku (20,8 g, 76 %).

Příprava báze sorafenibu (postup 1)

K roztoku intermediátu II (8,5 g) v 1,2-dichlorethanu (60 g) zahřátému na 60 °C byl přidán MCPA (III, 4,5 g, 0,6 ekv) a směs byla míchána 15 min při 60–65 °C, kdy se vytvořila nerozpustná sraženina. Suspenze byla ponechána vychladnout na 20 °C a míchána dalších 16 hodin. Poté

byla sraženina odfiltrována, promyta 1,2-dichlorethanem a sušena ve vakuu při 50 °C přes noc. Báze sorafenibu byla izolována ve formě bezbarvého prášku (8 g, 93 %, čistota 99,9 %).

Alternativní postup přípravy sorafenibu báze (postup 1)

K roztoku intermediátu II (12,5 g) v chlorbenzenu (150 g) zahřátému na 70–75 °C byl přidán MCPA (III, 10 g, 0,95 ekv) a vzniklá směs byla míchána 15 min při 70 až 75 °C, kdy vznikla nerozpustná sraženina. Suspenze byla ochlazená na 10 °C, sraženina byla odfiltrována, promyta chlorbenzenem a vysušena při 60 °C ve vakuu přes noc. Báze sorafenibu byla izolována ve formě bezbarvého prášku (18,5 g, 95 %, čistota 99,7 %).

Příprava báze sorafenibu (postup 2)

1,1'-Karbonyldiimidazol (8,7 g), triethylamin hydrochlorid (0,5 g) a toluen (22,5 ml) byly míchány při laboratorní teplotě 5–10 min v inertní atmosféře N_2 . Do takto vzniklé homogenní suspenze byl během 15 min za laboratorní teploty přidán roztok CTFBA (I, 7,5 g) v toluenu (15 ml) a vzniklá směs byla dále míchána 2 hodiny při 25 °C. a poté ochlazená na 0 °C. Pevný podíl byl oddělen filtrací, promyt toluenem (2×20 ml), sušen na filtru 30 min (98 % HPLC) a takto byl přímo použit pro další syntetický stupeň.

Takto připravený intermediát II byl v reaktoru smíchán s acetonem (37,5 ml) v inertní atmosféře N_2 a do reakční směsi bylo přidána voda (0,2 ml). MCPA (III, 7,5 g) byl rozpuštěn v acetonu (30 ml) a přikapán během 15 min do reakční směsi. Poté byl roztok zahřát na 40 °C a při této teplotě míchán 1 hodinu. Dále byla přidána voda za účelem vysrážení produktu, suspenze byla ochlazená na

0 °C a báze sorafenibu byla promyta vodou do dosažení neutrálního pH. Produkt krémové barvy byl sušen 16 hodin ve vakuu při teplotě 50 °C (16 g; 90 %, čistota 97 % HPLC). Báze sorafenibu byla rozpuštěna v ethanolu (300 ml) zahřátím k varu a rekrystalována ochlazením na 0 °C přičemž byla získána báze sorafenibu o čistotě > 99,8 % (HPLC).

Alternativní příprava báze sorafenibu (postup 2)

1,1'-Karbonyldiimidazol (8,7 g), imidazol hydrochlorid (0,5 g) a aceton (22,5 ml) byly smíchány při 10 °C a vzniklá směs byla míchána 15 min v inertní atmosféře N₂. Do takto vzniklé homogenní suspenze byl během 15 min přikapán roztok CTFBA (I, 7,5 g) v acetonu při teplotě 10 °C a směs byla dále míchána 1 hodinu. Poté byla přidána voda (0,2 ml). Roztok MCPA (III, 7,5 g) v acetonu (30 ml) byl přikapán do reakční směsi během 15 min. Roztok byl zahřát na 40 °C a při této teplotě míchán 1 hodinu. Dále byla přidána voda za účelem vysrážení produktu, suspenze byla ochlazená na 0 °C a báze sorafenibu byla promyta vodou do dosažení neutrálního pH. Báze sorafenibu byla sušena 16 hodin ve vakuu při teplotě 50 °C a byl získán produkt krémové barvy (16 g; 90 %, čistota 97 % HPLC). Báze sorafenibu byla rozpuštěna v ethanolu (300 ml) zahřátím k varu a rekrystalována ochlazením na 0 °C, přičemž byla získána báze sorafenibu o čistotě > 99,8 % (HPLC).

Příprava sorafenibu tosylátu

Báze sorafenibu (100 g, 0,215 mol) a methanol (300 ml) byly smíchány v 1litrovém reaktoru za laboratorní teploty a do suspenze byla přikapána *p*-toluensulfonová kyselina (53,2 g monohydrátu, 0,28 mol) v methanolu (200 ml). Z přechodně vzniklého roztoku došlo ke krystalizaci produktu. Suspenze byla ochlazená na 0 °C a ponechána při této teplotě 1 hodinu. Pevný podíl byl odfiltrován, a promyt methanolem (100 ml) a tímto postupem byl získán sorafenib tosylát methanol solvát. Solvát byl sušen 16 hodin za vakua při teplotě 80 °C za vzniku sorafenib tosylátu anhydrátu Formy III (130 g, 95 %, čistota > 99,8 % HPLC).

Závěr

Popsané postupy umožňují připravit bázi sorafenibu o čistotě > 99,8 % způsobem, který je možno použít při průmyslové produkci. Výhodou uvedených postupů je zejména zamezení vzniku symetrických močovín, které jsou z produktu obtížně odstranitelné.

LITERATURA

1. Saglio G., Morotti A., Mattioli G., Messa E., Giugliano E., Volpe G., Rege-Cambrin G., Cilloni D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 423 (2004).
2. Schenone S., Bruno O., Radi M., Botta M.: *Med. Res. Rev.* 31, 1 (2010).
3. Green E. D., Guyer M. S.: *Nature* 470, 204 (2011).
4. Bertino E. M., Otterson G. A.: *Lung Cancer* 70, 233 (2010).
5. Giovannini M., Aldrigheti D., Zucchinelli P., Belli C., Villa E.: *Critical Rev. Oncology/Hematology* 76, 13 (2010).
6. Riedl B., Dumas J., Khire U., Lowinger T., Scott W., Smith R., Wood J., Monahan M.-K., Natero R., Renick J., Sibley R. N. (Bayer Pharmaceuticals Corporation): *US 7,235,576* (2007).
7. Lögers M., Gehring R., Kuhn O., Matthäus M., Mohrs K., Müller-Gliemann M., Stiehl J., Berwe M., Lenz J., Heilmann W. (Bayer Healthcare A. G.): *WO 2006/034796* (2006).
8. Schetty G., Stammbach W., Zinkernagel R. (J. R. Geigy A. G.): *US 2,745,874* (1954).
9. Bankson D., Dumas J., Natero R., Riedl B., Monahan M.-K., Sibley R.: *Org. Process Res. Dev.* 6, 777 (2002).

F. Scarpita^a, A. Canavesi^a, and A. Jegorov^b (^a *Sicor S.r.l., Rho, Italy*, ^b *Teva Czech Industries s.r.o., Opava, Czech Republic*): **Synthesis of Protein Kinase Inhibitors**

Two procedures have been developed for the synthesis of sorafenib tosylate. The aim of the development was to minimize production of symmetric ureas in the course of synthesis, which create the major impurities of the preceding processes and are difficult to remove. The major achievements were the purity of sorafenib thus obtained (> 99.8 %, HPLC) and possibility to scale up the syntheses.