

УДК 661.77, 542.06, 54.057, 54.058

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СИНТЕЗА ГЕФИТИНИБА

Серегин М.С.¹, аспирант, IV курс, Тимченко А.А.¹, аспирант, I курс,
Флегонтов П.А.¹, к.б.н., доцент

Научный руководитель: Дашкин Р.Р.¹, к.т.н., доцент

¹Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева, г. Москва

Введение

Гефитиниб представляет собой низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и является одним из первых препаратов таргетной терапии немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) [1]. Молекулярный механизм действия основан на селективном блокировании внутриклеточного каталитического домена EGFR, что приводит к подавлению сигнальных путей клеточной пролиферации и индукции апоптоза в опухолевых клетках [2]. С химической точки зрения гефитиниб относится к классу 4-анилинохиназолинов – соединений, обладающих высокой ингибирующей активностью в отношении тирозинкиназы [3]. Несмотря на наличие в литературе описаний нескольких синтетических подходов (используя в качестве исходных соединений 6,7-дизамещенные хиназолины, изованилин, 3-гидрокси-5-метилбензоат, а также различных твердофазных методов и методов с использованием ионных жидкостей), большинство из них являются многостадийными, используют дорогие или токсичные реагенты, дают низкий общий выход или недостаточную квалификацию продукта, либо нецелесообразны для промышленной реализации [4-14]. В связи с этим разработка технологически удобного, экономически целесообразного и масштабируемого метода синтеза гефитиниба с высоким выходом и фармакопейной чистотой сохраняет высокую актуальность.

Результаты и обсуждение

Разработанный метод включает три последовательные стадии (Схема 1), начиная с коммерчески доступного 7-метокси-6-[3-(морфолин-4-ил)-пропокси]-хиназолин-4(3H)-она (1). На первой стадии проводят хлорирование соединения (1) с получением 4-хлор-7-метокси-6-[3-(морфолин-4-ил)-пропокси]-хиназолина (2). На второй стадии осуществляют реакцию нуклеофильного ароматического замещения атома хлора в положении 4 хиназолинового цикла с использованием избытка 3-хлор-4-фторанилина (3), что приводит к образованию гидрохлорида гефитиниба (4). Третья стадия заключается в переводе гидрохлорида (4) в свободное основание – целевой гефитиниб (5). Важным принципиальным решением является выделение и

очистка промежуточного соединения (2) перед второй стадией, в отличие от некоторых литературных «one-pot» методик. Экспериментально установлено, что работа без выделения (2) приводит к накоплению примесей (в частности, продукта гидролиза хлорпроизводного (2) в исходное соединение (1) и непрореагировавшего анилина), удаление которых до требуемого уровня (<0,1 %) требует многократной сложной очистки конечного продукта, а также ведёт к перерасходу дорогостоящего 3-хлор-4-фторанилина (3).

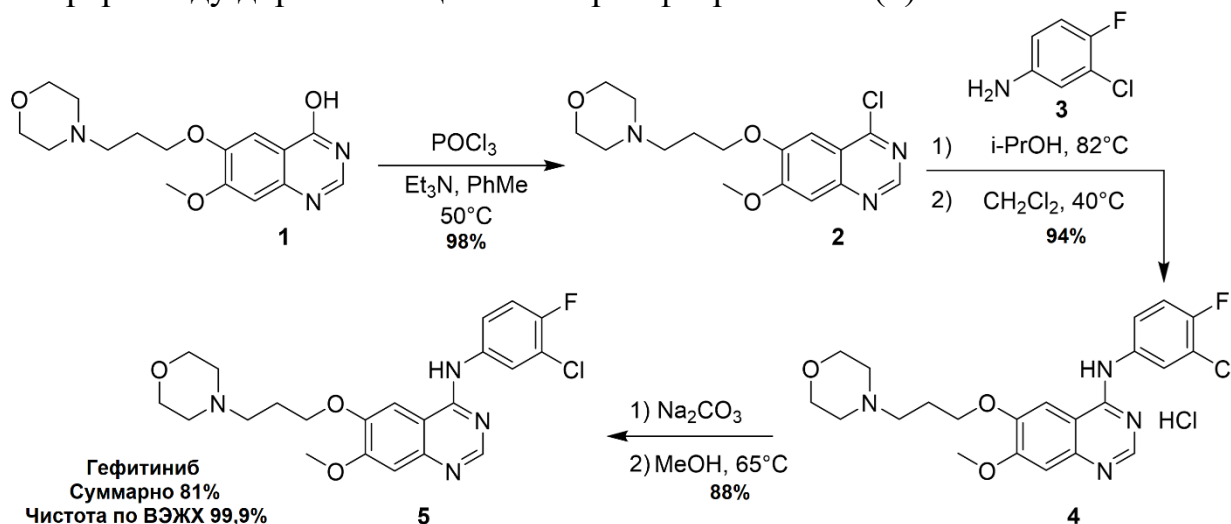


Схема 1 – Оптимизированная трехстадийная схема синтеза гефитиниба (5) из исходного хиназолин-4(3H)-она (1)

Оптимизация стадии хлорирования

На первой стадии необходимо провести замену атома кислорода в положении 4 хиназолин-4(3H)-она (1) на хлор. Из литературно известных хлорирующих агентов (тионилхлорид, оксихлорид фосфора, сульфурилхлорид, оксалилхлорид) по экономическим соображениям были отобраны тионилхлорид и оксихлорид фосфора. Данные по оптимизации первой стадии представлены в таблице 1. Первоначальные эксперименты с тионилхлоридом в присутствии диметилформаида, а также в хлороформе, показали либо низкую конверсию, либо образование гидрохлорида продукта, переходящего в водную фазу при экстракционной обработке, что делало выделение неэффективным [15]. Дальнейшая оптимизация с использованием тионилхлорида была признана нецелесообразной. Переход к оксихлориду фосфора с добавлением триэтиламина дал существенно лучшие результаты. Скрининг условий (температура, количество реагентов, время реакции) позволил выявить оптимальный режим: 2,5 эквивалента POCl_3 в толуоле с добавлением 1,5 эквивалентов триэтиламина с проведением реакции при 50°C в течение 5 часов. Снижение количества POCl_3 до эквимольного резко уменьшало выход, а увеличение свыше 3 экв. не приводило к значимому росту конверсии, но повышало расход реагента и усложняло выделение. Преимуществом выбранных условий является относительно низкая температура, что снижает энергетические затраты при масштабировании. После завершения реакции избыток исходных веществ и толуол отгоняли,

остаток обрабатывали водным раствором гидрокарбоната натрия до pH 8 и экстрагировали продукт. В первоначальной методике использовали этилацетат, однако он требовал больших объёмов (до 15 объёмов на 1 объём реакционной массы). Замена на дихлорметан позволила сократить объём экстрагента в 3 раза и повысить выход продукта (2) на несколько процентов за счёт более полного извлечения. Хлороформ в качестве экстрагента показал чуть более высокую эффективность, но был отклонен из-за более высокой токсичности, стоимости и температуры кипения, увеличивающей последующие энергозатраты на регенерацию.

Таблица 1 – Апробация и оптимизация условий стадии хлорирования

№	Реагент	Р-ль	Кат.	Т-ра, °С	Время р-ции, ч	Выделение	Выход, %
1	SOCl ₂ 26 экв.	-	DMF 0,41 экв.	76,1	2	Отгон избытков	116,5*
2	SOCl ₂ 66 экв.	-	DMF 8,66 экв.	76,1	1	Отгон избытков	125,7*
3	SOCl ₂ 30 экв.	CHCl ₃	-	61,2	8	Отгон избытков	112,0*
4	SOCl ₂ 35 экв.	-	DMF 1 экв.	76,1	8	Отгон избытков, экстракция CH ₂ Cl ₂ из водного раствора	-
5	POCl ₃ 21 экв.	PhMe	Et ₃ N 3,5 экв.	105,4	3	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	96,6
6	POCl ₃ 5,3 экв.	-	Et ₃ N 3,5 экв.	105,4	3	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	57,4
7	POCl ₃ 3,5 экв.	PhMe	Et ₃ N 3,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	95,6
8	POCl ₃ 1 экв.	PhMe	Et ₃ N 3,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	84,2
9	POCl ₃ 2,25 экв.	PhMe	Et ₃ N 3,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	95,9
10	POCl ₃ 2,5 экв.	PhMe	Et ₃ N 1,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция этилацетатом после NaHCO ₃	96,2
11	POCl ₃ 2,5 экв.	PhMe	Et ₃ N 1,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция CH ₂ Cl ₂ после NaHCO ₃	98,0
12	POCl ₃ 2,5 экв.	PhMe	Et ₃ N 1,5 экв.	50	5	Отгон избытков, экстракция CHCl ₃ после NaHCO ₃	98,7

* - технический выход, продукт без очистки использовался на следующей стадии

Оптимизация стадии нуклеофильного замещения (4)

На второй стадии проводили взаимодействие 4-хлорпроизводного (2) с 3-хлор-4-фторанилином (3), результаты экспериментов представлены в таблице 2. Первоначальные эксперименты в ДМФА с эквимольным количеством анилина (3) дали технический продукт с гравиметрическим выходом около 80%, однако содержание целевого гевитиниба в нём было низким, а основную часть составляли исходные соединения (1), (2), (3) и побочные продукты [16]. В качестве альтернативного растворителя был выбран изопропиловый спирт. Изначально при кипячении в изопропанол с 2

эквивалентами анилина (**3**) в течение 2 часов выход составил 53,7 %. Попытка использовать неочищенный продукт (**2**) в формате «one-pot» дала сопоставимый выход (52,3 %), но анализ реакционной массы показал отсутствие остаточного анилина, вероятно, из-за его взаимодействия с остатками POCl_3 от предыдущей стадии, поэтому от данного подхода отказались. Исследование влияния температуры показало, что снижение до 70°C приводит к резкому падению выхода (до 15 %). Уменьшение количества анилина (**3**) ниже 1,25 экв. сопровождалось снижением выхода, что предположительно обусловлено ингибирующим действием образующегося *in situ* гидрохлорида. Введение дополнительных оснований (триэтиламин, трет-бутилат калия) подавляло реакцию. Оптимальные условия были достигнуты при использовании 1,25 экв. 3-хлор-4-фторанилина (**2**) в кипящем изопропанол в течение 27 часов, что обеспечило выход гидрохлорида гефитиниба (**4**) 96,2 %. Ключевым фактором достижения высокой чистоты конечного продукта (**5**) стала введённая операция очистки неочищенного гидрохлорида (**4**) путём кипячения в органическом растворителе с последующим охлаждением, фильтрованием и сушкой. Сравнение этилацетата и метиленхлорида показало преимущество последнего: после однократной обработки метиленхлоридом содержание основного вещества в (**4**) увеличивалось с 90 до 95%, тогда как этилацетат позволял получить сопоставимый результат по чистоте, но при этом уменьшался общий выход продукта из-за большей растворимости продукта в этилацетате.

Таблица 2 – Апробация и оптимизация условий стадии нуклеофильного ароматического замещения

№	Количество (3), экв.	Растворитель	Основание	Температура, °C	Время реакции, ч	Выход, %
1	1,00	ДМФА	-	100	2	5,4
2	2,00	i-PrOH	-	82,4	2	53,7
4	2,00	i-PrOH	-	70	3	15,2
6	1,20	i-PrOH	Et_3N	82,4	6	0
7	1,20	i-PrOH	tBuOK	82,4	6	0
8	2,10	i-PrOH	-	82,4	6	73,7
9	3,00	i-PrOH	-	82,4	6	84,5
10	1,02	i-PrOH	-	82,4	27	83,8
11	1,25	i-PrOH	-	82,4	27	96,2

*Оптимизация стадии получения гефитиниба (**5**)*

Заключительная стадия заключалась в переводе гидрохлорида гефитиниба (**4**) в свободное основание (**5**). Эксперимент с использованием сильного основания (NaOH) показал, что такая обработка приводит к частичному осмолению продукта и снижению чистоты, поэтому далее был выбран карбонат натрия в воде. Полученный сырой гефитиниб перекристаллизовывали из алифатических спиртов. Оптимальным оказался метанол с выходом после перекристаллизации 82,3% и чистотой по ВЭЖХ 99,4%. Более высокого выхода на данной стадии удалось достигнуть при

использовании ацетата натрия, образующегося *in situ* при добавлении карбоната натрия в присутствии уксусной кислоты в метаноле, в данных условиях выход составил 87,3%. Для достижения фармакопейной чистоты дополнительно решено было добавлять активированный уголь во время перекристаллизации. После данной процедуры выход почти не изменился и составил 87,1%, но при этом содержание отдельных индивидуальных примесей не превышало 0,05%, а суммарное содержание примесей составило менее 0,1%.

Таблица 3 – Апробация и оптимизация условий стадии получения свободного основания гефитиниба

№	Основание	Растворитель	Перекристал- лизация	Выход, %	Чистота по ВЭЖХ, %		
					Гефитиниб	Родств. примеси	Неидент. примеси
1	NaOH	Вода	MeOH	76,3	97,22	1,02	1,76
2	Na ₂ CO ₃	Вода	MeOH	82,3	99,40	0,29	0,31
3	Na ₂ CO ₃	Вода	i-PrOH	82,7	98,56	0,61	0,83
4	Na ₂ CO ₃	Вода	EtOH	81,4	97,32	0,69	1,99
5	Na ₂ CO ₃ , AcOH	MeOH	MeOH	87,3	99,42	0,14	0,44
6	Na ₂ CO ₃ , AcOH	MeOH	MeOH, С _{акт}	87,1	>99,90	<0,05	<0,05

Масштабирование процесса

Заключительным этапом работы стало лабораторное масштабирование разработанных методик с коэффициентом масштабирования на уровне одного порядка, с загрузками исходных веществ от 1 грамма до 1 килограмма в три этапа (Таблица 1). Масштабирование проводили с сохранением всех оптимизированных параметров: соотношение реагентов, температура, время, порядок смешения, скорость добавления. Благодаря предварительной отработке технологических параметров при увеличении масштаба наблюдалась высокая воспроизводимость. Было замечено, что наблюдается увеличения выхода на второй стадии, которое объясняется более полным переносом реакционной масса и продукта между различным оборудованием во время работы. Полученный выход на все стадии при максимальных загрузках составил 81% с чистотой гефитиниба (5) по ВЭЖХ более 99,9%. Таким образом, разработанный метод является пригодным для дальнейшего промышленного производства фармацевтической субстанции гефитиниба.

Таблица 4 – Масштабирование оптимизированных методик получения гефитиниба

№	Исходное вещество	Масса исх., г	Выход, %	Чистота по ВЭЖХ, %		
				Продукт	Родств. примеси	Неидент. примеси
1. Стадия хлорирования						
1.1	7-метокси-6-[3-(морфолин-4-ил)-пропокси]-хиназолин-4(3H)-он (1)	1,0	98,0	82,9	-	-
1.2		10,0	98,5	81,8	-	-
1.3		110,0	98,3	82,2	-	-

№	Исходное вещество	Масса исх., г	Выход, %	Чистота по ВЭЖХ, %		
				Продукт	Родств. примеси	Неидент. примеси
1.4		842,9	98,0	82,7	-	-
2. Стадия нуклеофильного ароматического замещения						
2.1	4-хлор-7-метокси-6-[3-(морфолин-4-ил)-пропокси]-хиназолина (2)	1,0	85,4	95,06	3,91	1,03
2.2		10,0	89,6	95,36	3,66	0,98
2.3		105,0	92,7	95,17	3,75	1,08
2.4		873,7	94,1	95,46	3,42	1,12
3. Стадия получения свободного основания						
3.1	Гидрохлорид гефитиниба (4)	1,0	87,1	>99,90	<0,05	<0,05
3.2		11,0	87,2	>99,90	<0,05	<0,05
3.3		125,0	87,8	99,86	0,06	0,08
3.4		1176,8	88,1	>99,90	<0,05	<0,05

Заключение

В результате проведенной работы разработан и оптимизирован трехстадийный метод синтеза гефитиниба, характеризующийся общим выходом 81% и позволяющий получать фармацевтическую субстанцию высокой степени чистоты. Хроматографическая чистота конечного продукта составила более 99,9%, что соответствует требованиям фармакопейной статьи ФС.2.1.0395 «Гефитиниб» (ГФ РФ XV), при этом содержание индивидуальных примесей не превышает 0,05%. Предложенный синтетический процесс отличается технологической простотой, использованием доступных реагентов и растворителей, а также высокой воспроизводимостью. Успешное масштабирование метода с получением до 1000 г продукта за одну загрузку подтверждает его пригодность для промышленного производства фармацевтической субстанции гефитиниба.

Список литературы

1. Rahman A. F., Korashy H. M., Kassem M. G. / Chapter Five - Gefitinib, in Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Brittain, H. G., Ed.: Academic Press. 2014. – P. 239–264
2. Kang S. K., Lee S. W., Woo D., Sim J., Suh Y. G. Practical and efficient synthesis of gefitinib through selective O-alkylation. *Synthetic Communications*, 2017, – Vol.47(21), – P. 1990–1998.
3. Cao T., Jin J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV: Quinazoline derivatives*. Elsevier, 2022.
4. Marzaro G., Guiotto A., Pastorini G., Chilin A. A novel approach to quinazolin-4(3H)-one via quinazoline oxidation: an improved synthesis of 4-anilinoquinazolines // *Tetrahedron*. – 2010. – Vol. 66(4). – P. 962–968
5. Lipunova G. N., Nosova E. V., Charushin V. N., Chupakhin O. N. Synthesis and antitumour activity of 4-aminoquinazoline derivatives // *Russ. Chem. Rev.* – 2016. – Vol. 85(7). – P. 759
6. Maskrey T. *Synthetic Studies of Heterocyclic and Bioactive Agents: Doctor of Philosophy*. – Pittsburgh – 2021. – 237 p.
7. Sharma V. K., Barde A., Rattan S. A short review on synthetic strategies towards quinazoline based anticancer drugs // *Arkivoc* – 2021. – No. ix. – P. 150–176.
8. Chandregowda V., Venkateswara Rao G., Chandrasekara Reddy G. One-pot conversion of 2-nitrobenzonitriles to quinazolin-4(3H)-ones and synthesis of gefitinib and erlotinib hydrochloride // *Heterocycles* – 2007. – Vol. 71(1). – P. 39–48.
9. Chandrasekhar M., Srinivasulu D., Seshaiiah K., Kumar N. A Convenient and Easy Purification Approach to High-Yield Synthesis of Gefitinib as an Anticancer Agent from Iovaniline // *Pharm. Chem. J.* – 2014. – Vol. 48(8). – P. 520–524.
10. Sequeira A., Loureno A., Ferreira L. s. M., Branco P. S. r., Mendes Z. Different Approach to the EGFR Inhibitor Gefitinib Involving Solid-Phase Synthesis // *Synlett* – 2018. – Vol. 29(10). – P. 1346–1350.
11. Kocienski P. Synthesis of Gefitinib // *Synfacts* – 2019. – Vol. 15(04). – P. 0339.
12. Maskrey T. S., Kristufek T., Laporte M. G., Nyalapatla P. R., Wipf P. A new synthesis of gefitinib // *Synlett* – 2019. – Vol. 30(4). – P. 471–476.
13. Kumar P., Mazlee M. T. F., Abdul Wahab M. K., Belwal C. K., Kumar R., Sajid S. Improved protocol for synthesis of N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy) quinazolin-4-amine (gefitinib) // *Chem. Zvesti* – 2019. – Vol. 73(1). – P. 39–46.
14. Wang X., Yang Q.-X., Long C.-Y., Tan Y., Qu Y.-X., Su M.-H., Huang S.-J., Tan W., Wang X.-Q. Anticancer-Active N-Heteroaryl Amines Syntheses: Nucleophilic Amination of N-Heteroaryl Alkyl Ethers with Amines // *Org. Lett.* – 2019. – Vol. 21(13). – P. 5111–5115.
15. Li W., Chen S., Hu W., Zhu M., Liu J. Design, synthesis, and biological evaluation of quinazoline derivatives containing piperazine moieties as antitumor agents // *Journal of Chemical Research* – 2020. – Vol.44(9-10). – P. 536–542
16. Taylor P., Street M., Wt L. Improved Synthesis of Substituted 6,7-Dihydroxy-4-quinazolineamines: Tandutinib, Erlotinib and Gefitinib // *Synthesis (Stuttg)*. 2007. № 919488055. P. 286–297.