

А. В. Смирнов, Е. Е. Шалыгина, Ю. Е. Буданова, М. В. Дорогов

### Сравнительный анализ способов получения флударабина – противоопухолевого препарата

Работа выполнена в рамках Договора № 02. G 25.31.0019 от 12 февраля 2013 года между Закрытым акционерным обществом «Р-Фарм» и Министерством образования и науки Российской Федерации об условиях предоставления и использования субсидии на реализацию комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства, выполняемого с участием Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», и Договора № 121119 от 19 ноября 2012 года между ЗАО «Р-Фарм» и ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского» о «Разработке инновационных технологий производства импортозамещающих активных фармацевтических субстанций на основе методов биологического катализа и ферментативного синтеза».

Представлены известные методы синтеза флударабина – активной фармацевтической субстанции (АФС), используемой как противоопухолевый препарат. Проведен их сравнительный анализ с целью создания «ноу-хау» для внедрения производства флударабина на территории России по программе импортозамещения лекарственных средств.

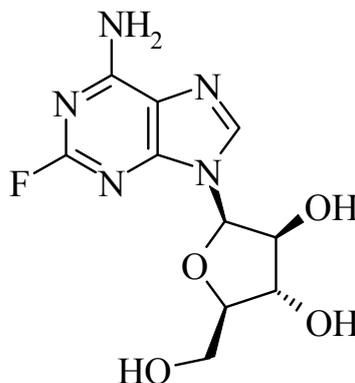
**Ключевые слова:** флударабин, субстанция, метод синтеза, трансгликозирование, пуридинуклеозидфосфорилаза, уридинфосфорилаза, алкилирование, гуанозин, стереоконформация, diazotization, dehydrohalogenation, selective hydrolysis.

A. V. Smirnov, E. E. Shalygina, Ju. E. Budanova, M. V. Dorogov

### The Comparative Analysis of Methods of the Fludarabine Synthesis – a Pharmaceutical Substance Used in Anticarcinogenic Remedy Production

To introduce the generic drug manufacture in the Russian Federation territory the comparative analysis of known methods of the fludarabine synthesis is done.

**Keywords:** fludarabine, a substance, a method of synthesis, transglycosination, purinenucleosidephosphorylase, uridinephosphorylase, alkylation, guanosine, stereoconformation, diazotization, dehydrohalogenation, selective hydrolysis.



АФС [(2R,3R,4S,5R)-5-(6-амино-2-фторпуриин-9-ил)-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метоксифосфониевой кислоты для ЛС с МНН **ФЛУДАРАБИН**

Флударабин (Флударабина фосфат) 1` – цитостатический препарат, антиметаболит из группы антагонистов пуринов. Обладает весьма выраженной иммуносупрессивной активностью. В силу выраженной иммуносупрессивной активности флударабина фосфат получил применение

не только по основным показаниям (лимфолейкозы и неходжкинские лимфомы), но и в качестве одного из компонентов режима кондиционирования реципиента при трансплантации костного мозга, а также при лечении острых форм реакций

трансплантата против хозяина и реакций отторжения трансплантата.

Несколько принципиально отличных друг от друга методов синтеза флударабина описаны в ряде патентов и статей. В целом все подходы к получению флударабина можно разделить на биотехнологические и химические.

Биотехнологические методы синтеза основаны на реакции ферментативного трансгликозирования, в процессе которой под действием генно-инженерных ферментов нуклеозидфосфорилаз происходит перенос сахарного остатка от природного пуринового или пиримидинового нуклеозида на модифицированное гетероциклическое основание [1].

В патенте [2] описан синтез Флударабина по реакции трансгликозилирования исходного

гетероциклического основания 2-фтораденина **1** 1-β-D-арабинофуранозилурацилом **2** при температуре 60°C в присутствии суспензии клеток *Enterobacter aerogenes* (*Ea*) (Схема 1). Образующийся Флударабин **1'** очищается путем ацилирования уксусным ангидридом, кристаллизацией соответствующего ацетилпроизводного **4** и его гидролизом. Недостаток этого метода заключается в том, что флударабин продуцируется в культурной среде, содержащей пролиферирующие микроорганизмы. В процессе роста микроорганизмов ферменты клетки продуцируют не только Флударабин, но и весь спектр природных нуклеозидов и их метаболитов, что усложняет процесс выделения целевого продукта.

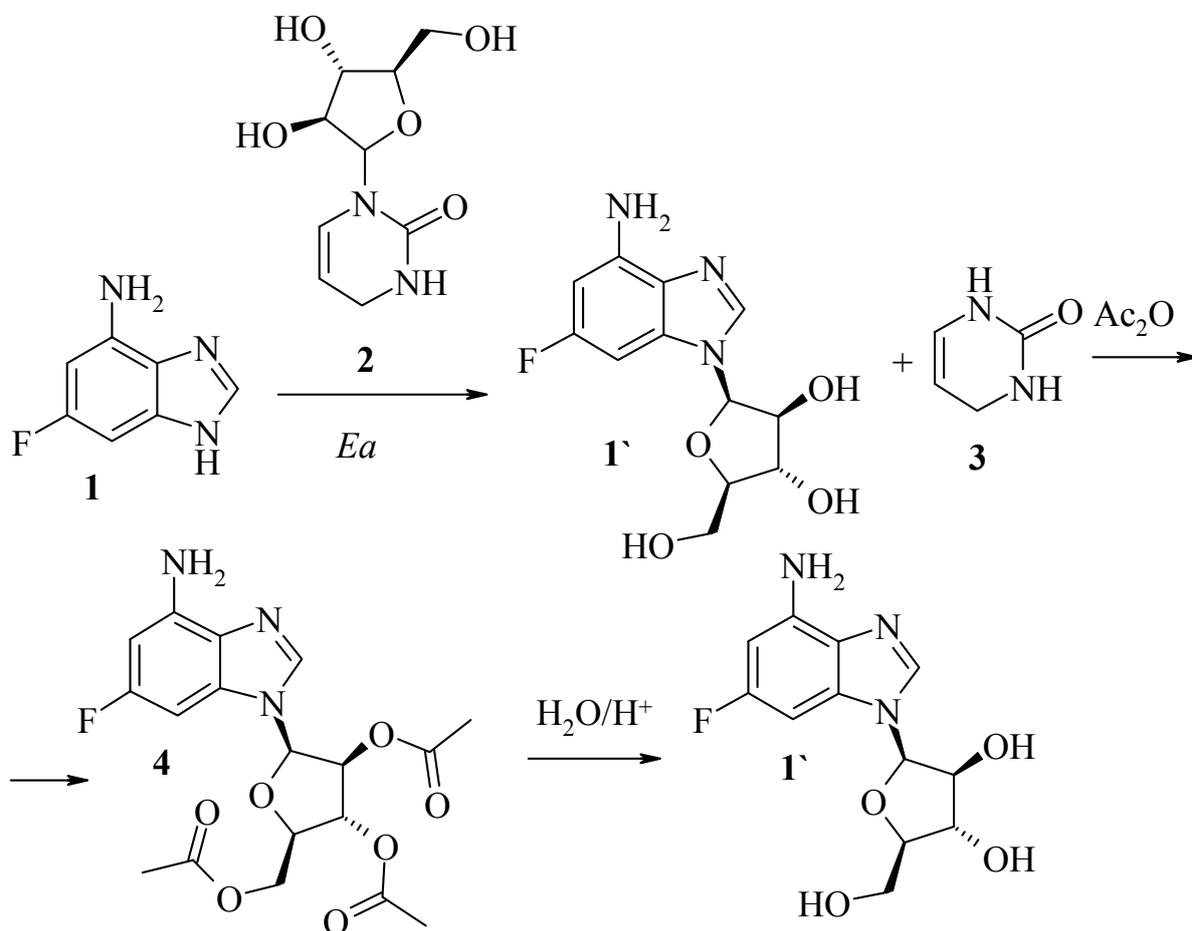


Схема 1

В патенте [3] предложен способ получения флударабина по реакции трансгликозилирования исходного основания 2-фтораденина **1** 1-β-D-арабинофуранозилурацилом **2** с использованием выделенных из суспензии клеток *Enterobacter aero-*

*genes* и иммобилизованных на полимерных носителях ферментов пуриноклеозидфосфорилазы и уридинфосфорилазы из суспензии клеток. Недостатком этого метода является совместная кристаллизация продукта с исходным основанием в

связи с его низкой растворимостью, что приводит к необходимости дополнительной кристаллизации флударабина

В российском патенте [4] описан биохимический способ получения Флударабина **1'** (Схема 2), включающий взаимодействие 2-фторадеозина **6** и 1-β-D-арабинофуранозилурацила **2** при их мо-

лярном соотношении 1:2 соответственно в калий-фосфатном буфере при значении pH 7, 48–52°C в присутствии пуриноклеозидфосфорилазы (ПНФ) в количестве 62,5 ед. акт. на 1 ммоль 2-фторадеозина **6** и уридинфосфорилазы (UF) в количестве 62,5 ед. акт. на 1 ммоль 1-β-D-арабинофуранозилурацила **2**.

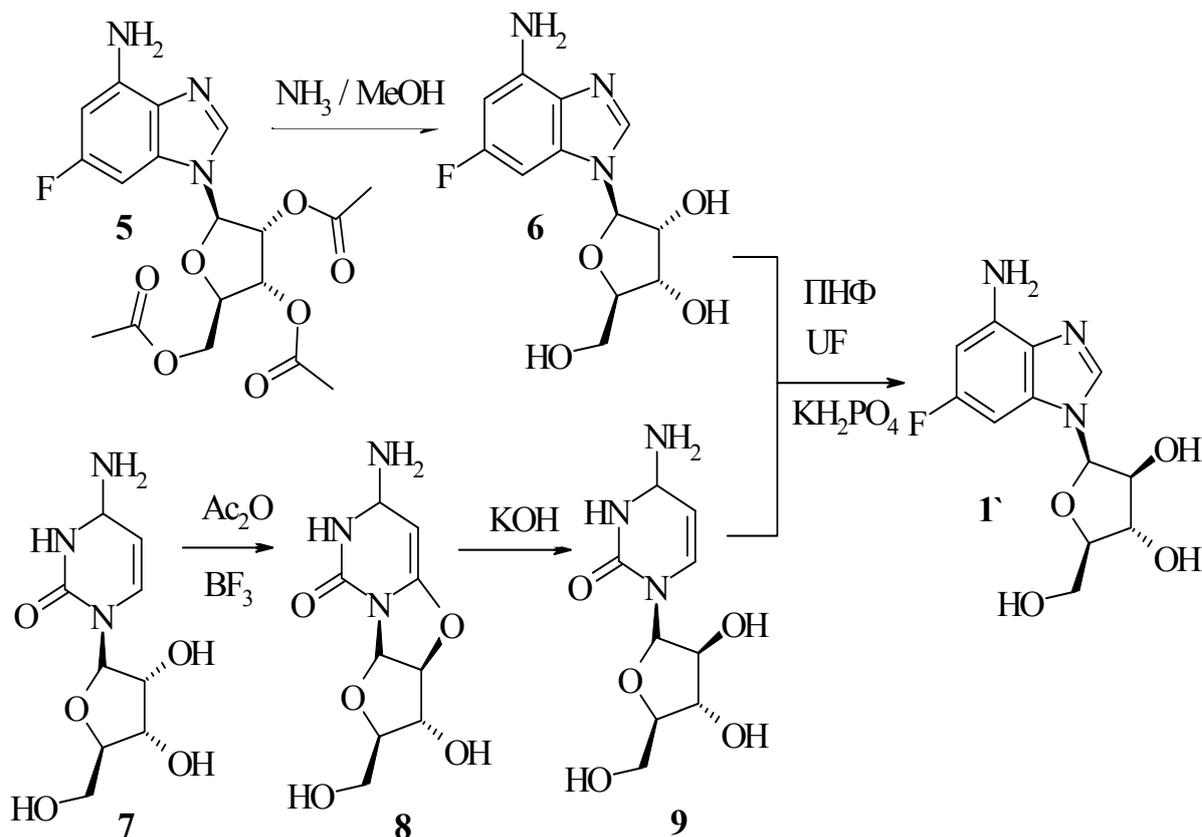


Схема 2

Исходный 2-фторадеозин **6** получают обработкой аммиаком в метаноле 2',3',5'-три-*O*-ацетил-2-фторадеозина **5** по схеме, описанной в патенте [5]. 1-β-D-Арабинофуранозилурацил **2** получают реакцией кислотно-катализируемого ацетилирования уридина **7** с образованием 2,2'-ангидро-1-(3',5'-ди-*O*-ацетил-β-D-арабинофуранозил)урацила **8**, омыление которого проводят водной щелочью при комнатной температуре, что и приводит к образованию 1-β-D-Арабинофуранозилурацила **9** [6].

Химические методы синтеза флударабина представлены в ряде патентов в виде принципиально отличных друг от друга синтетических схем. Все известные методы синтеза можно разделить на две группы: 1) основанные на алкилировании 2,6-диаминопурина; 2) основанные на химической трансформации дешевого природного нуклеозида гуанозина.

Синтез на основе 2,6-диаминопурина впервые был описан Монтгомери в патентах [7, 8], впоследствии синтез был оптимизирован в патенте [9] (Схема 3).

В данной схеме исходный 2,6-диаминопурин с защитными группами **10** алкилируется арабинофуранозильным фрагментом с изначально требуемой стереоконформацией **13**. Дальнейшие химические преобразования молекулы заключаются в селективном снятии защитных групп и замещении аминогруппы на атом фтора путем диазотирования. Недостаток схемы заключается в использовании труднодоступного 2,3,4-три-*O*-бензил-1-*O*-*n*-нитробензоил-β-D-арабинофуранозила **11**.

Синтез Флударабина путем химической трансформации гуанозина описан в патенте [10] (Схема 4). В данном случае схема состоит из двух этапов: модификация заместителей в пу-

риновом цикле и стереотрансформация арабинофуранозильного фрагмента.

Изменения в пуриновом цикле заключаются в последовательном проведении реакций дегидрогалогенирования (с образованием соединения **18**), замещения хлора на фтор (с образованием соединения **19**), диазотирования – фторирования (с образованием соединения **20**) и аминирования

(с образованием соединения **21**). Стереотрансформация молекулы осуществляется путем селективного гидролиза одной защитной ацетильной группы арабинофуранозильного фрагмента, присоединения трифторметилсульфогруппы и ее обмен на ацетильную группу с изменением стереоконфигурации.

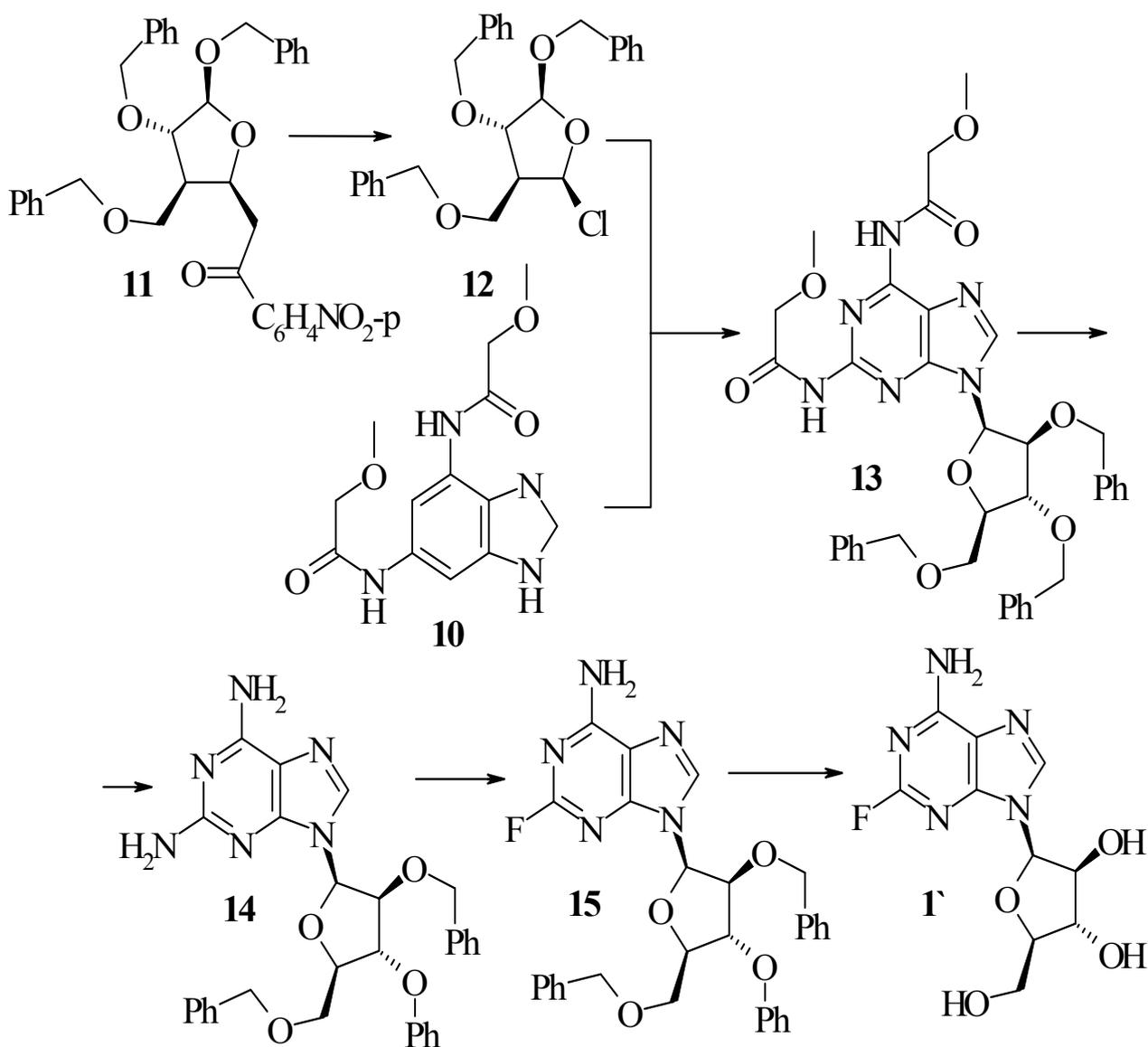


Схема 3

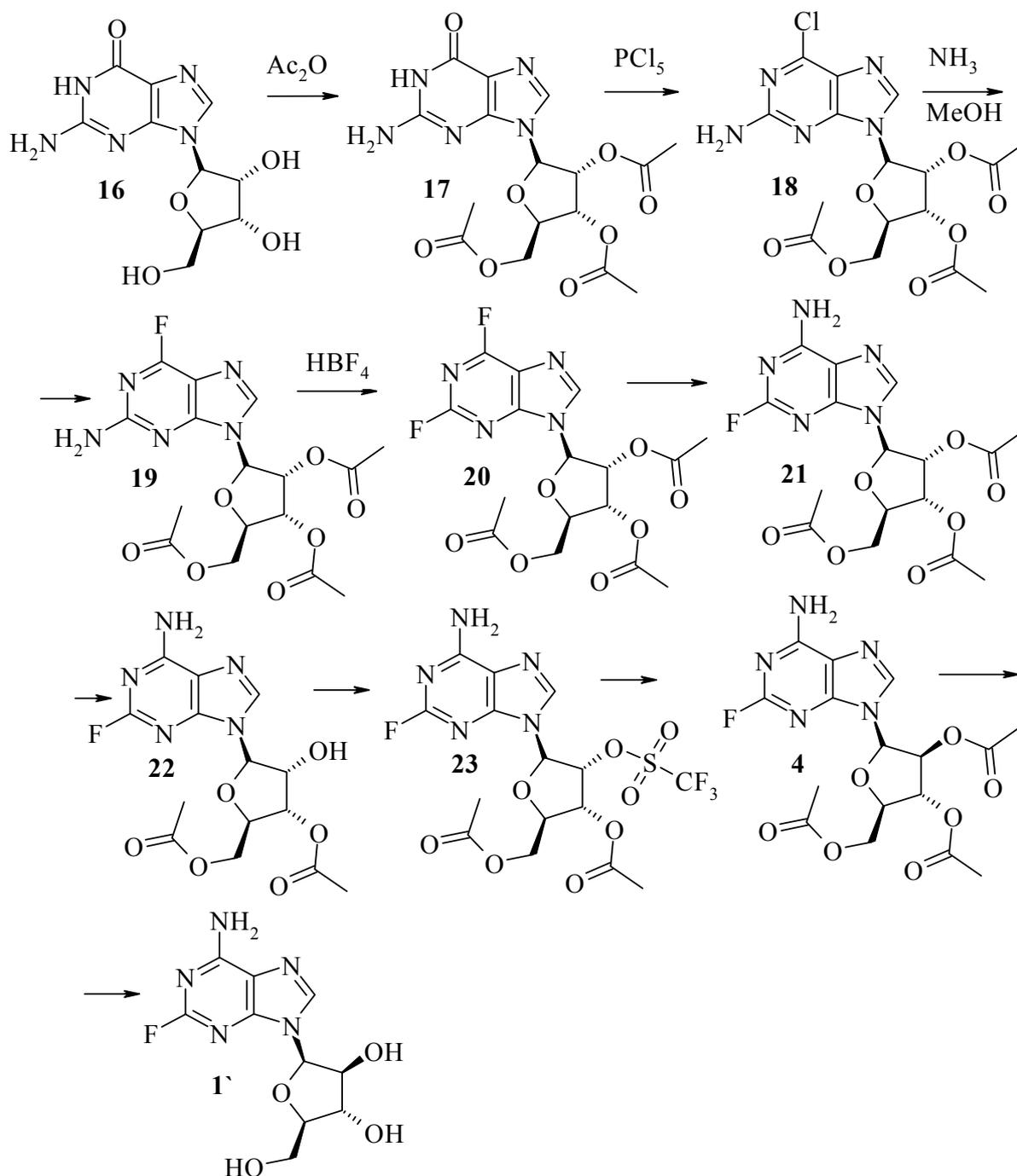


Схема 4

**Библиографический список**

1. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2000. – 88. – P. – 349-425.  
 2. Патент EP1464708. A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine / Farina P., Petrucciani L.; Pro Bio Sint S P A. Publication date: 06.10.2004. – 9 p.  
 3. Патент EP1439220. Immobilized biocatalysts usable for the manufacture of natural nucleosides and modified analogues through enzymatic transglycosylation reac-

tions / Tonon G., Capra E.; Keryos SPA; Publication date: 21.07.2004. – 16 p.  
 4. Патент RU2368662. [http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en\\_V3&FT=D&date=20090927&CC=RU&NR=2368662C1&KC=C1](http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en_V3&FT=D&date=20090927&CC=RU&NR=2368662C1&KC=C1) method of obtaining 9-(D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadenine / Konstantinova I.D., Antonov K.V.; Uchrezhdenie rossijskoj akademii; Publication date: 27.09.2009. – 8 p.

5. Патент RU2325395. Method of 2',3',5',-tri-O-acetyl-2-phthoradenosine production / Berzin V.B., Dorofeeva E.V.; Inst bioorg khim; Publication date: 27.05.2008.

6. Kondo K., Inoue I. // J. Org. Chem. – 1977. – 42. – P. 2809-2812.

7. Патент US4188378.  
[http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en\\_V3&FT=D&date=19800212&CC=US&NR=4188378A&KC=A](http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&adjacent=true&locale=en_V3&FT=D&date=19800212&CC=US&NR=4188378A&KC=A)Anticancer and antiviral activity of 9- beta -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine / Montgomery J.; U S OF America hew secretary; Publication date: 12.02.1980. – 6 p.

8. Патент US4210745. Procedure for the preparation of 9- beta -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine / Montgomery J.; U S OF America hew secretary; Publication date: 01.07.1980. – 5 p.

9. Патент WO9108215. Procedure for the preparation of 2-amino-9-(2,3,5-tri-0-benzyl-beta-D-arabinofuranosyl)adenine and novel intermediates / Blumbergs P., Khan M.; Ash Stevens INC; Publication date: 13.06.1991. – 25 p.

10. Патент US5602246. Process for the preparation of fludarabine or fludarabine phosphate from guanosine / Bauman J.G., Wirsching R.C.; Schering AG; Publication date: 11.02.1997. – 29 p.

### Bibliograficheskij spisok

1. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. // Pharmacology & Therapeutics. – 2000. – 88. – P. – 349-425.

2. Patent EP1464708. A process for the preparation of fludarabine phosphate from 2-fluoroadenine / Farina P., Petrucciani L.; Pro Bio Sint S P A. Publication date: 06.10.2004. – 9 p.

3. Patent EP1439220. Immobilized biocatalysts usable for the manufacture of natural nucleosides and modified analogues through enzymatic transglycosylation reactions / Tonon G., Capra E.; Keryos SPA; Publication date: 21.07.2004. – 16 p.

4. Patent RU2368662. Method of obtaining 9-(D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadenine / Konstantinova I.D., Antonov K.V.; Uchrezhdenie rossijskoj akademii; Publication date: 27.09.2009. – 8 p.

5. Patent RU2325395. Method of 2',3',5',-tri-O-acetyl-2-phthoradenosine production / Berzin V.B., Dorofeeva E.V.; Inst bioorg khim; Publication date: 27.05.2008.

6. Kondo K., Inoue I. // J. Org. Chem. – 1977. – 42. – P. 2809-2812.

7. Patent US4188378. Anticancer and antiviral activity of 9- beta -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine / Montgomery J.; U S OF America hew secretary; Publication date: 12.02.1980. – 6 p.

8. Patent US4210745. Procedure for the preparation of 9- beta -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine / Montgomery J.; U S OF America hew secretary; Publication date: 01.07.1980. – 5 p.

9. Patent WO9108215. Procedure for the preparation of 2-amino-9-(2,3,5-tri-0-benzyl-beta-D-arabinofuranosyl)adenine and novel intermediates / Blumbergs P., Khan M.; Ash Stevens INC; Publication date: 13.06.1991. – 25 p.

10. Patent US5602246. Process for the preparation of fludarabine or fludarabine phosphate from guanosine / Bauman J.G., Wirsching R.C.; Schering AG; Publication date: 11.02.1997. – 29 p.