

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.

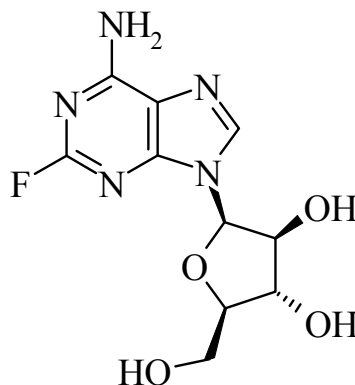
Ключевые слова: флударабин, субстанция, метод синтеза, трансгликозирование, пуридинуклеозидфосфорилаза, уридинфосфорилаза, алкилирование, гуанозин, стереоконформация, diazotization, dehydrohalogenation, selective hydrolysis.

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-фторпуридин-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.

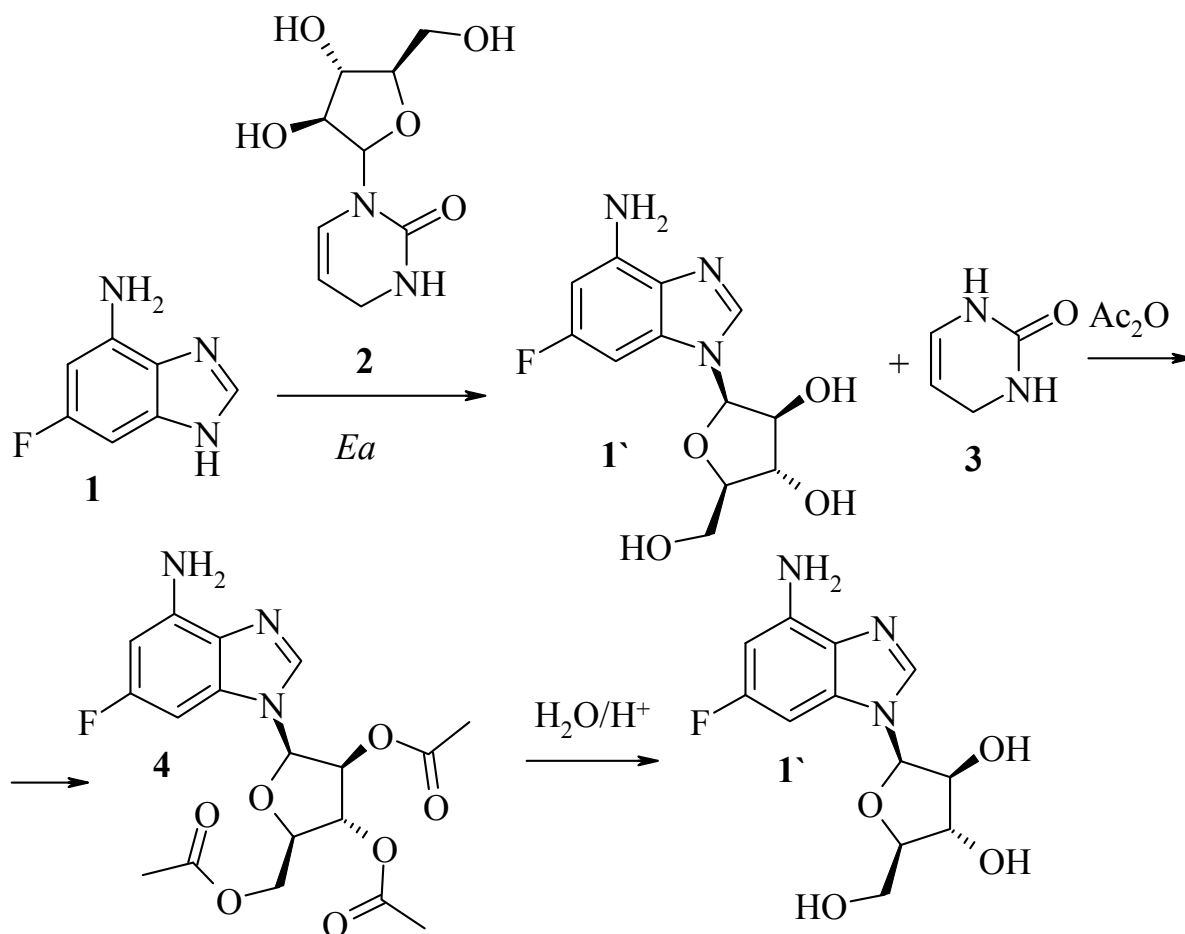


Схема 1

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 aéro-*

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**.

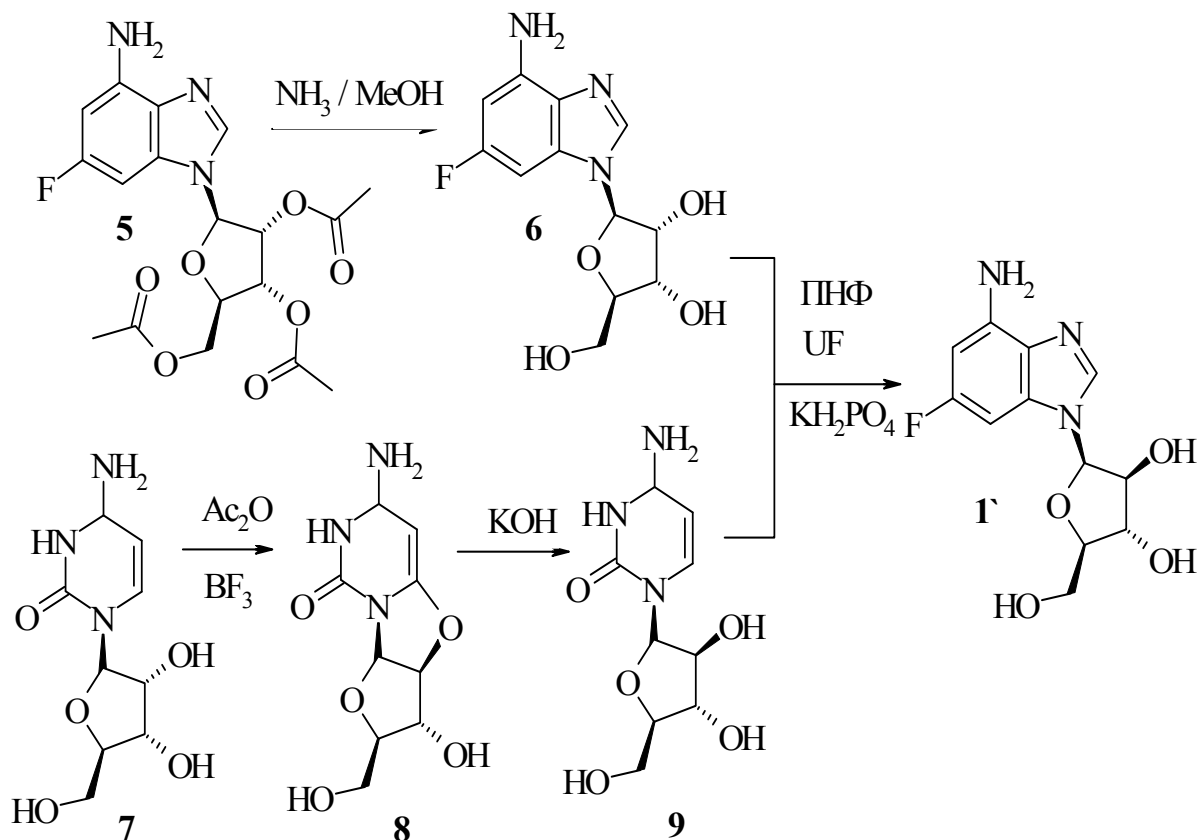


Схема 2

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.

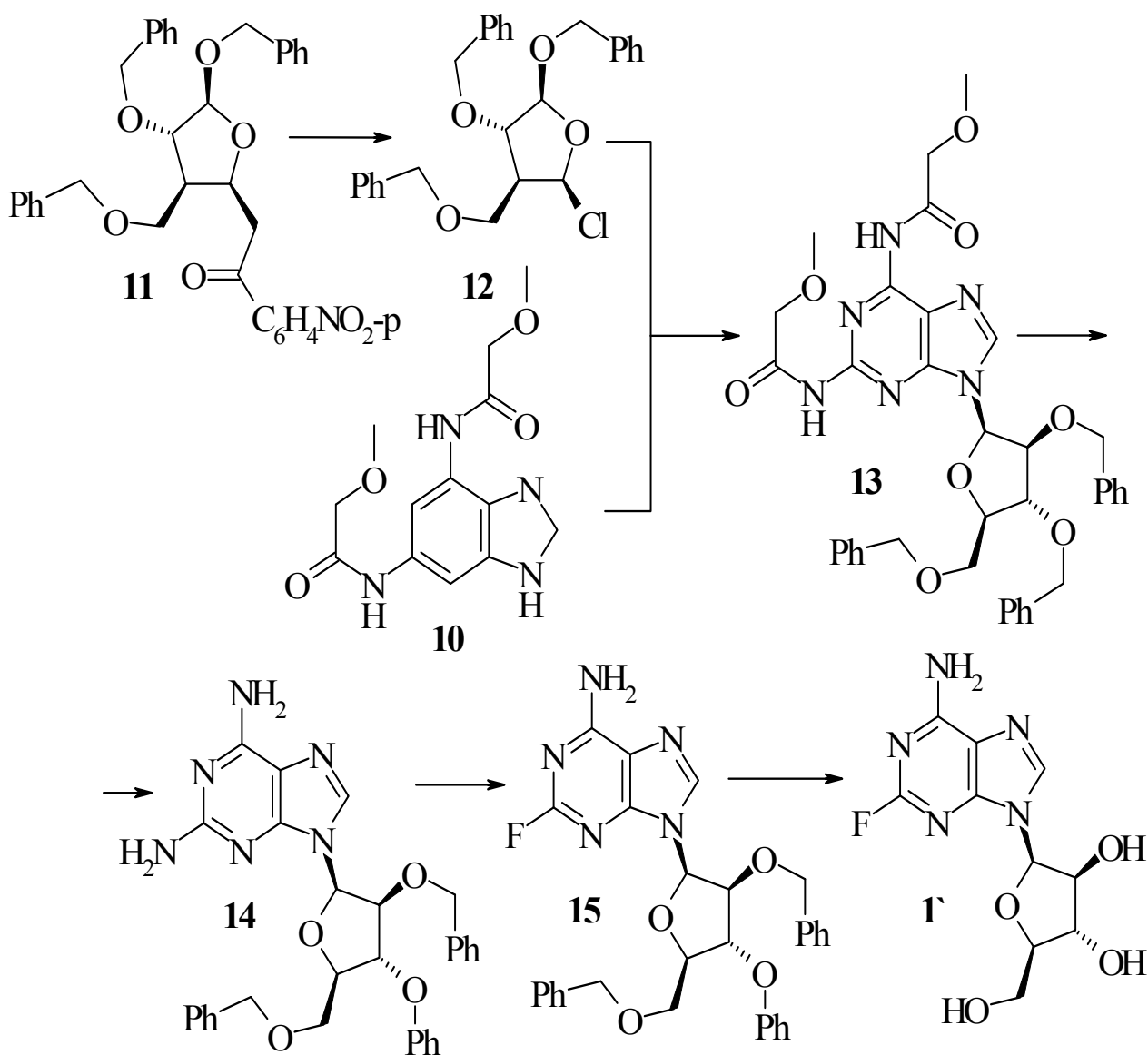


Схема 3

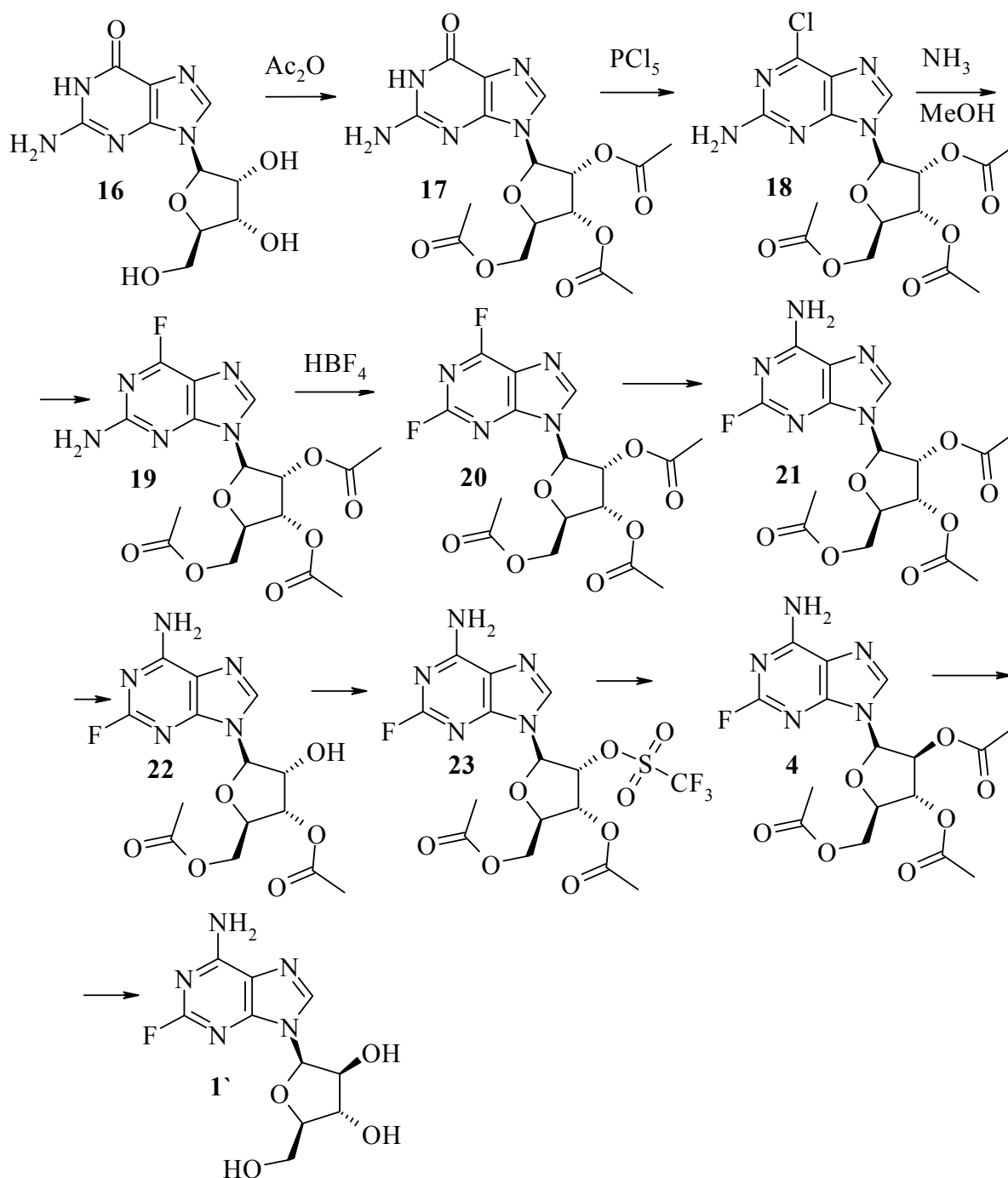


Схема 4

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 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-phthoradenozine 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=AAnticancer 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-phthoradenozine 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.