

## ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФАТА ФЛУДАРАБИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИС(ТРИБУТИЛОЛОВО)ОКСИДА

А. В. САПЕГИН<sup>1</sup>, А. А. ШЕТНЕВ<sup>1</sup>, М. В. БЛЮМИНА<sup>1</sup>, М. В. ДОРОГОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского,  
ул. Республиканская, 108, 150000, г. Ярославль, Россия

Предложен новый подход к синтезу активной фармацевтической субстанции – фосфата флударабина. Он заключается в активации первичной спиртовой группы в молекуле исходного субстрата за счет образования эфира трибутиллолова, последующая реакция которого с хлорокисью фосфора приводит к получению целевого продукта. Показано, что наиболее подходящим растворителем для проведения предлагаемого синтеза является диоксан, при этом общее время синтеза фосфата флударабина составляет 5 ч, а чистота полученного соединения удовлетворяет всем требованиям Европейской фармакопеи.

**Ключевые слова:** флударабин; фосфат флударабина; бис(трибутиллово)оксид; фосфора хлорокись; фосфорилирование.

## PREPARATION OF FLUDARABINE PHOSPHATE USING BIS(TRIBUTYL TIN)OXIDE

A. V. SAPEGIN<sup>a</sup>, A. A. SHETNEV<sup>a</sup>, M. V. BLUMINA<sup>a</sup>, M. V. DOROGOV<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Respublikanskaya street, 108, 150000, Yaroslavl, Russia

A new approach to the synthesis of active pharmaceutical ingredient fludarabine 5'-monophosphate was proposed. The method is based on the activation of the alcohol group in the molecule of the substrate via formation of fludarabine tributylstannate, and the subsequent reaction with phosphorus oxychloride leading to the title product. It was found that 1,4-dioxane is the most suitable solvent for the proposed synthesis. The reaction time is ca 5 hours, and the purity of the resulting compound satisfies requests received of the European pharmacopoeia.

**Key words:** fludarabine; fludarabine phosphate; bis(tributyltin)oxide; phosphorus oxychloride; phosphorylation.

### Образец цитирования:

Сапегин А. В., Шетнев А. А., Блюмина М. В., Дорогов М. В. Получение фосфата флударабина с использованием бис(трибутиллово)оксида // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 1. С. 10–13.

### For citation:

Sapegin A. V., Shetnev A. A., Blumina M. V., Dorogov M. V. Preparation of fludarabine phosphate using bis(tributyltin) oxide. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 1. P. 10–13 (in Russ.).

### Авторы:

**Александр Владимирович Сапегин** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры химии, теории и методики преподавания химии естественно-географического факультета.

**Антон Андреевич Шетнев** – кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химии, теории и методики преподавания химии естественно-географического факультета.

**Мария Владимировна Блюмина** – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры химии, теории и методики преподавания химии естественно-географического факультета.

**Михаил Владимирович Дорогов** – доктор химических наук, профессор кафедры химии, теории и методики преподавания химии естественно-географического факультета.

### Authors:

**Alexander Sapegin**, doctor of chemistry; senior researcher at the department of chemistry, theory and methods of teaching chemistry, natural-geographic school.

*a.sapegin@yspu.org*

**Anton Shetnev**, doctor of chemistry; researcher at the department of chemistry, theory and methods of teaching chemistry, natural-geographic school.

*a.shetnev@yspu.org*

**Maria Blumina**, doctor of chemistry; senior lecturer at the department of chemistry, theory and methods of teaching chemistry, natural-geographic school.

*m.blumina@yspu.org*

**Michail Dorogov**, doctor habilitatus of chemistry; professor at the department of chemistry, theory and methods of teaching chemistry, natural-geographic school.

*m.dorogov@yspu.org*

Флударабин **1** – синтетический фторированный аналог пуринового нуклеозида видаверина, относящийся к цитостатическим препаратам, антиметаболитам из группы антагонистов пуринов. Обладает весьма выраженной иммуносупрессивной активностью. В силу этого флударабин 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 [1].

Для создания готовых лекарственных форм флударабин используется в виде 5'-монофосфата **2** из-за низкой растворимости в воде.

Основным методом получения производного **2** является реакция фосфорилирования флударабина **1** хлорокисью фосфора (рис. 1), приводящая к образованию 5'-дихлорфосфата флударабина **3**, гидролиз которого и дает целевой продукт [2–4].

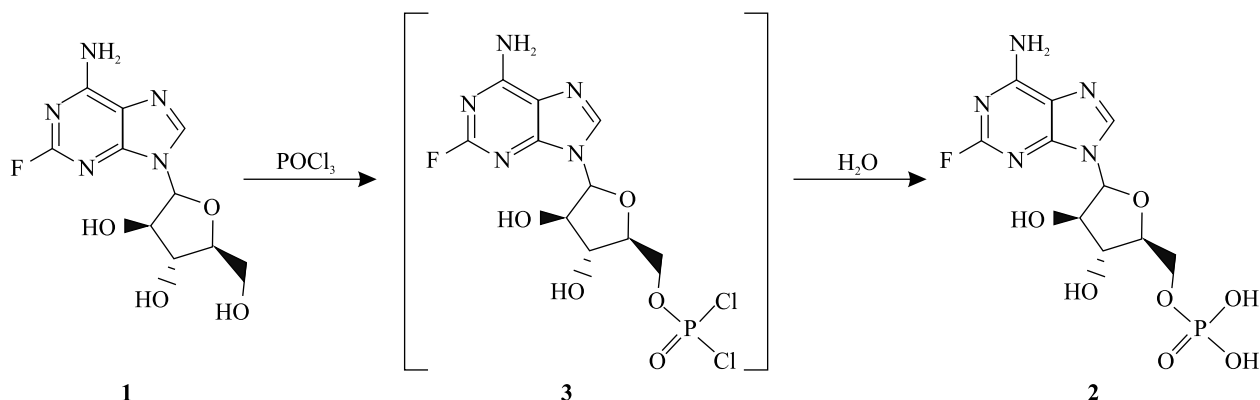


Рис. 1. Реакция фосфорилирования флударабина хлорокисью фосфора

Данный синтез проводится в растворе эфиров фосфорной кислоты (триметилфосфат [2, 3], триэтилфосфат [4, 5]) либо в ортофосфорной кислоте [6]. Выход и чистота продукта сильно зависят от температуры синтеза. Так, в [4] показано, что наиболее оптимальной температурой фосфорилирования является интервал от  $-15$  до  $-10$  °С. Стоит также отметить длительность проведения реакции фосфорилирования – от 24 до 48 ч [2–6].

В ряде работ для активации спиртовых групп в реакциях алкилирования [7–9], ацилирования [10] либо сульфонилирования [11] используют бис(трибутилолово)оксид (ТВТО), реагирующий со спиртом с образованием более реакционно-способного эфира трибутилолова, который и вводится в реакцию с электрофильным реагентом. Данный подход был применен нами в синтезе фосфата флударабина **2** (рис. 2).

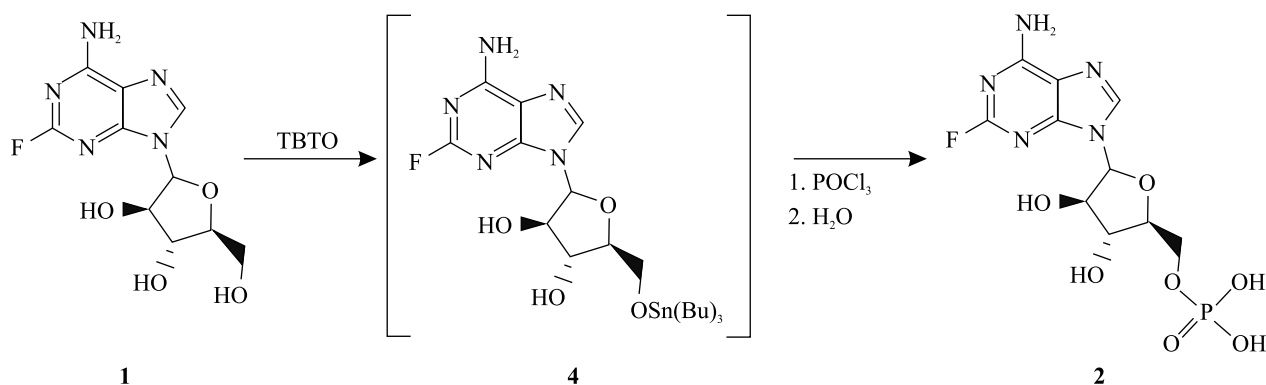


Рис. 2. Реакция фосфорилирования флударабина с использованием ТВТО

Для реакции ТВТО с флударабином **1** нами был опробован ряд растворителей (таблица).

**Время реакции ТВТО с флударабином 1  
в различных растворителях**

Номер опыта	Растворитель	Время реакции*, ч
1	Бензол	–
2	Толуол	–
3	<i>o</i> -Ксилол	–
4	1,2-Дихлорэтан	24
5	Ацетонитрил	15
6	Диметоксиэтан	10
7	Диоксан	4

\*Окончание реакции определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе AcOEt-MeOH = 9 : 1 по исчезновении пятна с  $R_f = 0,56$ .

В классических растворителях для постановки данного синтеза – толуоле и бензоле – реакция образования эфира **4** не протекает даже при 24 ч кипячения. Не привело также к положительному результату и повышение температуры синтеза за счет постановки реакции в более высококипящем *o*-ксилоле. По всей вероятности, это обусловлено крайне низкой растворимостью флударабина в растворителях ароматического ряда.

Использование более полярных растворителей позволило осуществить превращение соединения **1** в эфир **4**. При этом наилучшие результаты были получены при кипячении исходных реагентов в диоксане с медленной отгонкой растворителя из реакционной массы. В этих условиях реакция образования эфира **4** протекает за 4 ч.

Полученный эфир **4** *in situ* вводили в реакцию с хлорокисью фосфора. При использовании в качестве растворителя диоксана для предотвращения кристаллизации реакционной массы в нее добавляли 20 % толуола. Фосфорилирование проводили при 0 °С, реакция протекала в течение 1,5 ч.

Последующий гидролиз дихлорфосфата **3** проводили добавлением в реакционную массу воды при температуре не выше 0 °С.

Очистку фосфата **2** осуществляли ионообменной хроматографией на колонке с ионообменной смолой Dowex 50X8. Выход целевого продукта составил 43 %. Чистота полученного соединения полностью соответствует требованиям Европейской фармакопеи по основным физико-химическим показателям [12].

Таким образом, предложенный нами одnoreакторный метод синтеза фосфата флударабина через стадию образования трибутилстанната флударабина позволяет существенно снизить время проведения реакции фосфорилирования, при этом получить продукт фармакопейной чистоты.

### Экспериментальная часть

В работе использовался флударабин производства Lianyungang Shenghe Biotechnology Co., Ltd. (Китай) с содержанием основного вещества не менее 97 %, бис(трибутилолово)оксид (Sigma-Aldrich) применялся без дополнительной очистки, хлорокись фосфора (Sigma-Aldrich) предварительно перегонялась. Все используемые в работе растворители предварительно осушали по известным методикам [13].

Ионообменную хроматографию проводили на колонке (10 × 20 мм) с сорбентом Dowex 50W-8 (катионообменная смола), 400 меш (Sigma-Aldrich).

Температуру плавления определяли на автоматическом приборе Stuart SMP40, удельное вращение – на поляриметре Kruss P8000. ИК-спектры зарегистрированы на фурье-спектрофотометре Shimadzu IRAffinity-1. УФ-спектры сняты на спектрофотометре Portlab 512. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H записаны на приборе Bruker DRX-400.

Чистоту фосфата флударабина контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence с использованием колонки Nova-Pak C18, 4,6 × 150 мм, 4 мкм; изократический режим, 5 % ацетонитрила в воде с 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ), 1 мл/мин; детекция – УФ,  $\lambda = 254$  нм.

Контроль за ходом реакции осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UF-254 в системе «этилацетат – метанол» при соотношении 9 : 1.

**Флударабина фосфат 2.** 1 г (3,500 ммоль) флударабина **1** суспендировали в 20 мл диоксана, к массе добавляли 0,98 мл (3,675 ммоль) ТВТО. Реакционную смесь кипятили в течение 4 ч с отгонкой растворителя, при этом масса становилась гомогенной. По окончании кипячения к раствору прибавляли 5 мл

толуола. Полученную смесь охлаждали до 0 °С и прикапывали раствор 0,76 мл (8,129 ммоль) POCl<sub>3</sub> в 2 мл толуола, после чего реакционную массу перемешивали при охлаждении 1 ч. Затем к раствору прибавляли 5 мл воды и 10 мл толуола, поддерживая температуру не выше 5 °С. Смесь перемешивали при охлаждении еще 30 мин, после чего выливали в 10 мл воды. Водный слой отделяли, дважды экстрагировали 5 мл толуола и подщелачивали 2-мольным раствором LiOH до нейтрального значения pH. Выпавший осадок фосфата лития отфильтровывали, маточный раствор наносили на колонку 10 × 20 мм с катионитом Dowex 50X8. Колонку промывали 250 мл воды, при этом отделяли первую фракцию объемом 5–7 мл. После этого собирали основную фракцию, которую упаривали в вакууме на ротационном испарителе и лиофилизировали.

Получили 550 мг лиофилизата фосфата флуларабина **2** в виде порошка белого цвета. Выход продукта составил 43 %. Содержание основного вещества (по данным ВЭЖХ) не менее 98,5 %, т. пл. 201,3–202,8 °С (т. пл. 202–203 °С<sup>3</sup>).  $[\alpha]_D^{20} = +10,4^\circ$  (H<sub>2</sub>O). УФ-спектр (H<sub>2</sub>O),  $\lambda_{\max}$ , нм: 262. ИК-спектр (KBr),  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 1051, 1139, 1398, 1516, 1662. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, D<sub>2</sub>O),  $\delta$ , м. д. (*J*, Гц): 4,27 (2H, м, H<sub>5</sub>), 4,48 (1H, т, *J* = 4,5, H<sub>4</sub>), 4,66 (1H, т, *J* = 4,2, H<sub>3</sub>), 4,79 (1H, с, H<sub>2</sub>), 6,34 (1H, д, *J* = 4,8, H<sub>1'</sub>), 8,54 (1H, с, H-8).

Работа выполнена в рамках договора № 02.G 25.31.0019 от 12 февраля 2013 г. и договора № 121119 от 19 ноября 2012 г. «Разработка инновационных технологий производства импортозамещающих активных фармацевтических субстанций на основе методов биологического катализа и ферментативного синтеза».

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. Janssens A., Boogaerts M., Verhoef G. Development of fludarabine formulations in the treatment of chronic lymphocytic leukemia // *Drug Des. Devel. Ther.* 2009. Vol. 3. P. 241–252 [Janssens A., Boogaerts M., Verhoef G. Development of fludarabine formulations in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Drug Des. Devel. Ther.* 2009. Vol. 3. P. 241–252 (in Engl.)].
2. US Patent 4357324.
3. US Patent 5110919.
4. US Patent 20070060745.
5. Tian Q., Yang J. Synthesis of new anti-tumor drug fludarabine phosphate // *Chem. Res. Appl.* 2006. Vol. 18, № 5. P. 570–572 [Tian Q., Yang J. Synthesis of new anti-tumor drug fludarabine phosphate. *Chem. Res. Appl.* 2006. Vol. 18, No. 5. P. 570–572 (in Engl.)].
6. Wang Y., Xu X., Shen Y. Improvement on the Synthesis of 9-(β-D-Arabinofuranosyl)adenine Phosphate // *J. East China Univ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 32, № 12. P. 1436–1439 [Wang Y., Xu X., Shen Y. Improvement on the Synthesis of 9-(β-D-Arabinofuranosyl)adenine Phosphate. *J. East China Univ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 32, No. 12. P. 1436–1439 (in Engl.)].
7. US Patent 5612316.
8. Wessel H. P. Comparison of catalysts in α-glucosylation reactions and identification of triflic anhydride as a new reactive promoter // *Tetrahedron Lett.* 1990. Vol. 31, № 7. P. 6863–6866 [Wessel H. P. Comparison of catalysts in α-glucosylation reactions and identification of triflic anhydride as a new reactive promoter. *Tetrahedron Lett.* 1990. Vol. 31, No. 7. P. 6863–6866 (in Engl.)].
9. Koike K., Mori M., Ito Y., Nakahara Y., Ogawa T. Stereoselective total synthesis of wheat flour ceramide dihexoside // *Agric. Biol. Chem.* 1990. Vol. 54, № 1. P. 2931–2939 [Koike K., Mori M., Ito Y., Nakahara Y., Ogawa T. Stereoselective total synthesis of wheat flour ceramide dihexoside. *Agric. Biol. Chem.* 1990. Vol. 54, No. 1. P. 2931–2939 (in Engl.)].
10. Martin A., Monneret C., Gautier C., Fournier J. P., Roger P. Synthesis of methyl 3-amino-3,4-dideoxy-α and β-D-xylohexopyranosides // *J. Carbohydr. Chem.* 1990. Vol. 9, № 6. P. 853–861 [Martin A., Monneret C., Gautier C., Fournier J. P., Roger P. Synthesis of methyl 3-amino-3,4-dideoxy-α and β-D-xylohexopyranosides. *J. Carbohydr. Chem.* 1990. Vol. 9, No. 6. P. 853–861 (in Engl.)].
11. Peterson E. M., Brownell J., Vince R. Synthesis and biological evaluation of 5'-sulfamoylated purinyl carbocyclic nucleosides // *J. Med. Chem.* 1992. Vol. 35, № 22. P. 3991–4000 [Peterson E. M., Brownell J., Vince R. Synthesis and biological evaluation of 5'-sulfamoylated purinyl carbocyclic nucleosides. *J. Med. Chem.* 1992. Vol. 35, No. 22. P. 3991–4000 (in Engl.)].
12. European Pharmacopoeia. 2010. Vol. 2.
13. Purification of Laboratory Chemicals. 4<sup>th</sup> ed. Woburn, 2002.

Статья поступила в редколлегию 17.06.2015.  
Received by editorial board 17.06.2015.