



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109096346 A

(43)申请公布日 2018.12.28

(21)申请号 201810642779.5

(22)申请日 2018.06.21

(30)优先权数据

10-2017-0078424 2017.06.21 KR

(71)申请人 株式会社钟根堂

地址 韩国首尔

(72)发明人 赵敬熙 李承旭 林亨俊

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 徐迅

(51)Int.Cl.

C07H 1/00(2006.01)

C07H 21/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

制备二核苷多磷酸化合物的方法

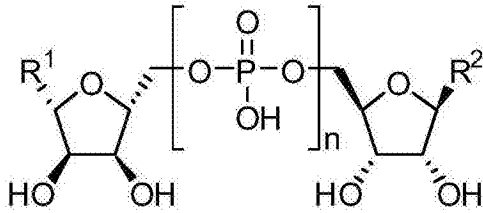
(57)摘要

本发明涉及以高收率和高纯度制备二核苷多磷酸、其盐或其水合物的方法。本发明的制备方法是在环境友好的反应条件下进行的,没有繁琐的过程,因此它可能适用于工业大规模生产。

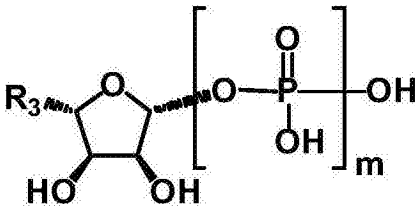
1. 一种制备由下式1表示的二核苷多磷酸、其盐或其水合物的方法,包括:

(S-1) 在溶剂存在下,使由下式2表示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物;碳二亚胺的缩合剂;和金属离子反应

【式1】



【式2】



其中 R_1 和 R_2 彼此相同或不同,并且各自独立地为嘧啶碱基,和 R_3 是嘧啶碱基;

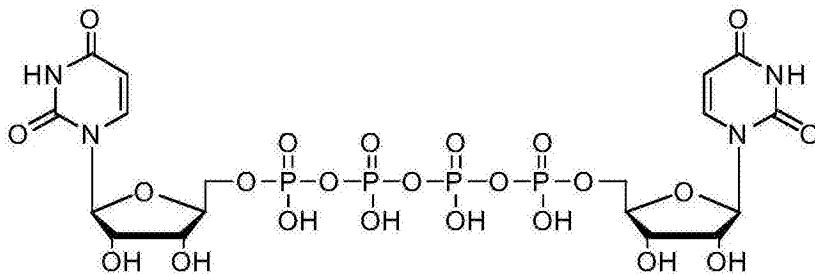
n 是2至6的整数;和

m 是1至3的整数。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述嘧啶碱基是尿嘧啶。

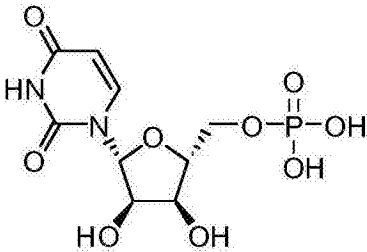
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,由式1表示的核苷多磷酸由下式1a表示:

【式1a】

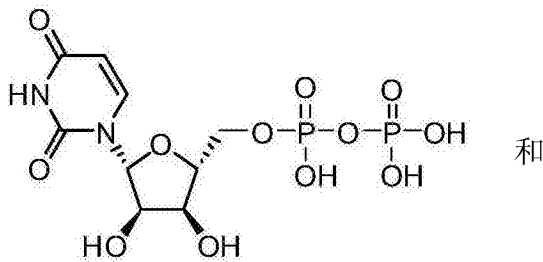


4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,由式2表示的核苷磷酸化合物由以下式2a至2c中的任一个表示:

【式2a】

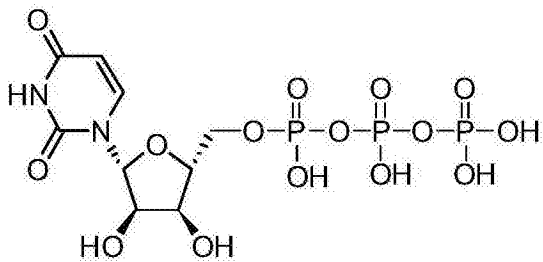


【式2b】



;

【式2c】



。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述核苷磷酸化合物的盐为金属盐或胺盐。

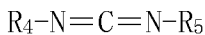
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述金属盐选自:锂、钠、钾、镁、钙、钡、铈、铁、镍、铜、锌和硼。

7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述胺盐选自:具有C₁-C₆烷基链的三烷基胺和环状三烷基胺。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述胺盐选自:三甲胺、三乙胺、三丁胺、三戊胺、三己胺、三乙醇胺和吡啶。

9. 如权利要求1所述的方法,碳二亚胺的缩合剂由下式3表示:

【式3】



其中R₄和R₅彼此相同或不同,并且各自独立地为具有1至6个碳的直链、支链或环链的烷基,并且所述烷基可以被烷基胺基团选择性地取代。

10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,R₄和R₅彼此相同或不同,并且各自独立地为乙基、异丙基、环己基或二甲基氨基丙基。

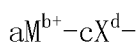
11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,碳二亚胺的缩合剂选自:1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)或其盐,N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)和N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)。

12. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述金属离子衍生自下组:金属的氯化物、溴化物、氮氧化物、硫氧化物和乙酸氧化物。

13. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述金属离子为选自以下的金属的离子:钙、镁、铈、铁、锂、铝、钛和钠。

14. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述金属离子来源于由下式4表示的金属盐催化剂:

【式4】



其中，

a是M的摩尔数，

b是M的离子化合价，

M是钙、镁、钪、铁、锂、铝、钛或钠，

c是X的摩尔数，

d是X的离子化合价，

X为卤素、碳酸根、乙酸根、硝酸根、三氟甲磺酸根、硫酸根、羧酸根或其衍生物，和

a乘b得到的值等于c乘d得到的值。

15. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述溶剂为水、有机溶剂或水与所述有机溶剂的混合溶剂。

16. 如权利要求15所述的方法，其特征在于，所述有机溶剂选自由C₁-C₈醇、C₃-C₁₀酮、1,4-二氧六环、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷组成的组。

17. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述缩合剂的当量和金属离子的当量彼此相同或不同，其中0.1至30.0摩尔当量分别与1摩尔当量的由式2表示的核苷磷酸化合物反应。

18. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述反应温度为0℃至50℃。

19. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述制备方法还包括(S-2)将步骤(S-1)获得的产物固化以分离和纯化。

制备二核苷多磷酸化物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备二核苷多磷酸化合物(dinucleoside polyphosphate)的方法,更具体地涉及在金属卤化物存在下由核苷磷酸化合物制备二核苷多磷酸化合物、其盐或其水合物的方法。

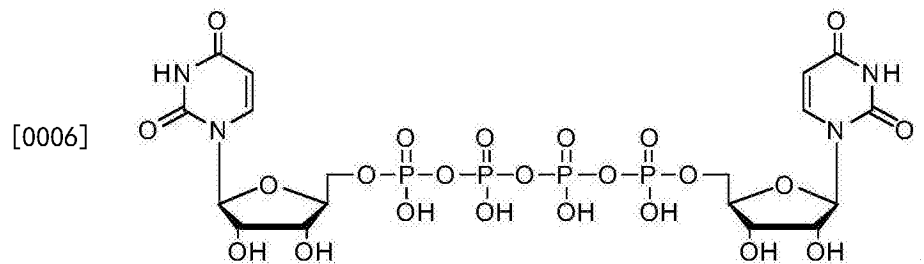
背景技术

[0002] 核苷是糖苷化合物,其中核碱基和戊糖通过N-糖苷键相互结合。当磷酸基团借助磷酸化酶与核苷连接时,变成了核苷酸,是DNA链的基本构成成分。

[0003] 二核苷多磷酸或其盐是一类这样的核苷酸,已知其与活体内材料相似,因此在体内稳定并具有治疗疾病的效果。

[0004] 具体地,由下式1a表示的 P^1, P^4 -二(尿苷5'-)四磷酸(以下称为“UP₄U”)或其盐,已被用作与干眼症或功能失调性泪液综合征有关的偶发的角膜和结膜上皮病症的治疗剂的化合物。此外,由于其咳痰诱导活性,预计还可以开发作为肺炎的治疗药或祛痰药。

[0005] 【式1a】



[0007] 对于传统的UP₄U合成方法,通过尿苷5'-三磷酸(下文中称为UTP)与尿苷5'-一磷酸(下文中称为UMP)的脱水缩合制备尿苷5'-环三磷酸的常规制备方法在Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 11, (2001), 157-160中报道,并且WO 2008/012949中公开了其改进的制备方法。

[0008] WO 1999/05155公开了一种制备UP₄U的方法,步骤如下:将尿苷、UMP、UDP或UTP及其盐,以及尿苷核苷酸化合物溶于极性、非质子有机溶剂和疏水胺中,用单磷酸化酶或二磷酸化酶作为磷酸化酶进行磷酸化,并用碳二亚胺、活性羰基、活性羰基或活性磷作为活化剂制备UP₄U。

[0009] 此外,WO2014/103704公开了一种制备UP₄U的方法,所述方法在金属离子存在下,在水或亲水有机溶剂中使磷酸活性化合物与选自UMP、UDP、UTP和焦磷酸盐的磷酸化合物或其盐反应,所述磷酸活性化合物由尿苷5'-二磷酸(UDP)、UMP或焦磷酸与选自具有取代基的咪唑、苯并咪唑或1,2,4-三唑的化合物缩合而合成。

[0010] 然而,制备UP₄U的常规方法需要许多繁琐的过程,例如金属盐交换反应,从而导致合成效率和最终化合物纯度降低的问题。

[0011] 特别地,根据用于制备UP₄U的常规方法,例如WO 1999/05155和WO 2008/012949,在反应之前,磷酸化合物的金属盐必须以胺盐如三丁胺或三乙胺的形式反应。结果,通常需

要进行麻烦的方法,通过离子交换树脂柱色谱将金属盐,如磷酸尿苷化合物的钠盐转化为游离酸形式的磷酸化合物,然后实施胺和盐的形成。由于要实施这种方法,合成效率和最终化合物的纯度可能会降低。特别是,在使用已知非常不稳定的物质,UTP的合成反应的情况下,其纯度容易降低,而对水分敏感的有机盐如UTP胺盐具有高吸湿性,因此在其储存和质量保持方面引起非常棘手的问题。

[0012] 而且,WO 2014/103704中描述的制备方法可以以45%至94%的高收率合成UP₄U,但需要上述的制备磷酸化合物的有机盐的盐交换反应和脱水过程,并且还需要在有机溶剂中合成磷酸活性化合物,然后通过减压浓缩除去溶剂,并且在水存在下调节pH进行反应,由此导致化合物纯度降低的问题。

[0013] 因此,出于这种原因,需要一种在环境友好的反应条件下以高收率制备高纯度二核苷多磷酸化合物的方法而无需繁琐的过程,并且还制备适用于工业大规模生产的二核苷多磷酸。

【发明内容】

[0014] 技术问题

[0015] 本发明的目的在于提供一种适合大量生产,对环境有效无害,能够高纯度批量生产的二核苷多磷酸(其盐及其水合物)的制备方法。

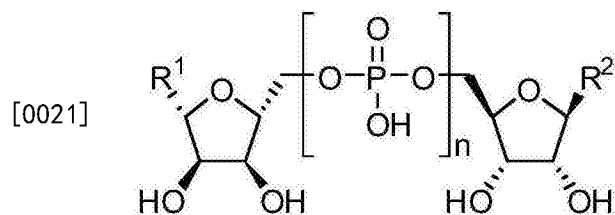
[0016] 技术方案

[0017] 本发明提供了一种制备下式1所示的二核苷多磷酸(其盐及其水合物)的方法。

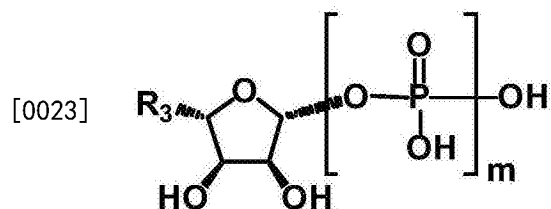
[0018] 根据本公开的一个实施方式,提供了用于制备由下式1表示的二核苷多磷酸(其盐或其水合物)的方法,包括:

[0019] (S-1)在溶剂存在下,使由下式2表示的核苷磷酸化合物(其盐或其水合物);碳二亚胺的缩合剂;和金属离子反应:

[0020] 【式1】



[0022] 【式2】



[0024] 其中R₁和R₂彼此相同或不同,并且各自独立地为嘧啶碱基;

[0025] 其中R₃是嘧啶碱基;

[0026] n是2至6的整数;和

[0027] m是1至3的整数。

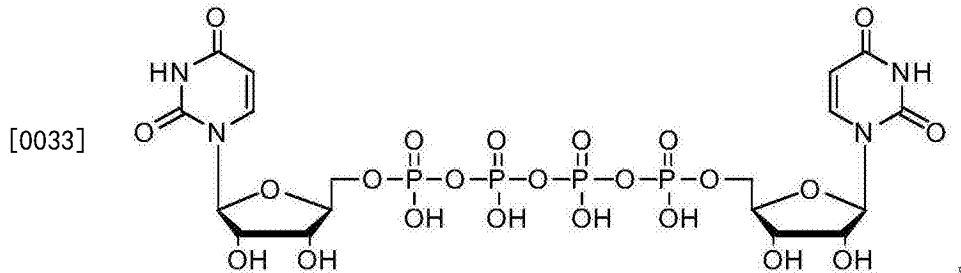
[0028] 在本发明中,嘧啶碱基可以选自:胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。

[0029] 根据本发明的一个实施方案,所述碱基是尿嘧啶。

[0030] 根据本发明的一个实施方案,n是4。

[0031] 根据本发明的一个实施方案,由式1表示的核苷多磷酸盐由下式1a表示:

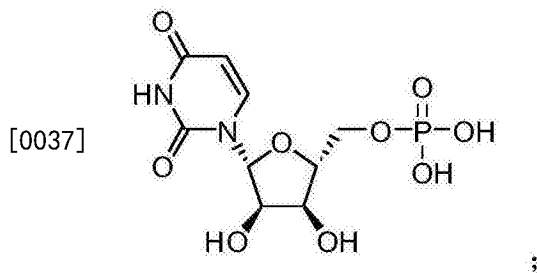
[0032] 【式1a】



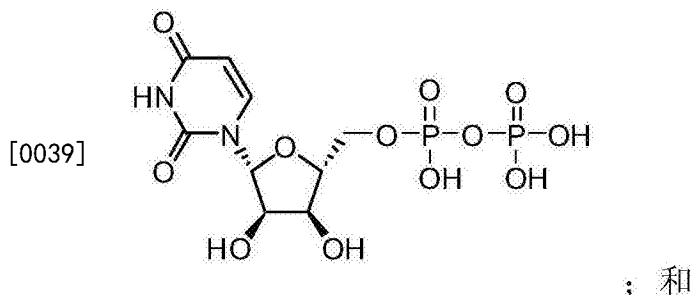
[0034] 根据本公开的制备方法,通过使用上述市售的式2而不需要单独的转化过程,可以减少生产所需的设施,缩短花费在转化过程上的时间、努力和成本,并且相应地最大程度减少杂质的产生。

[0035] 根据本公开的一个实施方案,由式2表示的核苷磷酸化合物由以下式2a至2c中的任一个表示:

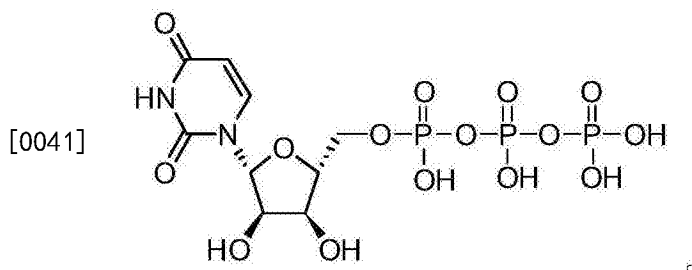
[0036] 【式2a】



[0038] 【式2b】



[0040] 【式2c】



[0042] 根据本公开的一个实施方案,核苷磷酸化合物的盐是金属盐或胺盐。

[0043] 核苷磷酸化合物的金属盐可选自锂、钠、钾、镁、钙、钡、铈、铁、镍、铜、锌和硼,优选为锂,钠或钾的碱金属盐,以及钙或镁的碱土金属盐。

[0044] 根据另一个实施方案,胺盐可以是叔胺,具体地,选自:具有C₁-C₆烷基链的三烷基胺和环状三烷基胺,如三甲胺、三乙胺、三丁胺、三戊胺、三己胺、三乙醇胺、吡啶等。

[0045] 在本公开中,缩合剂是指作为缩合反应中的反应剂添加的化合物。

[0046] 根据本公开的一个实施方案,碳二亚胺的缩合剂由下式3表示:

[0047] **【式3】**

[0048] $R_4-N=C=N-R_5$

[0049] 其中R₄和R₅彼此相同或不同,并且各自独立地为具有1至6个碳的直链、支链或环链的烷基,并且所述烷基可以被烷基胺基团选择性地取代。

[0050] 具体地,R₄和R₅彼此相同或不同,并且各自独立地为乙基、异丙基、环己基或二甲基氨基丙基。

[0051] 碳二亚胺的缩合剂选自:1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)或其盐,N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)和N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)。

[0052] 根据本公开的另一个实施方案,(S-1)步骤可以用三唑添加剂进行。三唑添加剂具体可以是羟基苯并三唑(HOBT)或1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)。三唑添加剂可以具有提高碳二亚胺的缩合剂效率的效果。

[0053] 根据本公开的一个实施方案,金属离子源自:金属的氯化物、溴化物、氮氧化物、硫氧化物和乙酸氧化物。

[0054] 根据本公开的一个实施方案,金属离子可以是选自钙、镁、铈、铁、锂、铝、钛或钠的金属的离子。

[0055] 根据本公开的一个实施方案,金属离子可以源自由下式4表示的金属盐催化剂:

[0056] **【式4】**

[0057] $aM^{b+}-cX^{d-}$

[0058] 其中,

[0059] a是M的摩尔数,

[0060] b是M的离子化合价,

[0061] M是钙、镁、铈、铁、锂、铝、钛或钠,

[0062] c是X的摩尔数,

[0063] d是X的离子化合价,

[0064] X为卤素、碳酸根、乙酸根、硝酸根、三氟甲磺酸根、硫酸根、羧酸根或其衍生物,和

[0065] a乘b得到的值等于c乘d得到的值。

[0066] 根据本公开的一个实施方式,金属离子可以是衍生自钙盐,例如氯化钙、乙酸钙、碳酸钙、硫酸钙、磷酸钙等,镁盐如氯化镁、碳酸镁、硫酸镁、溴化镁等,铈盐如氯化铈、氟化铈、碘化铈、硝酸铈、三氟乙酸铈等的金属离子,具体地,衍生自氯化钙、氯化铈、碘化铈、氯化镁、氯化铁的金属离子,但不限于此,可包括酸酐形式和水合物形式。

[0067] 根据本公开的制备方法,通过使用对人体廉价且无害的催化剂,可以以高收率和明显缩短的反应时间提供二核苷多磷酸,使得它可以非常适合用于生产医药原料。

[0068] 根据本公开的一个实施例,溶剂是水、有机溶剂或水和有机溶剂的混合溶剂。

[0069] 根据本公开的实施例,溶剂可以仅为水。本公开的制备方法可以单独使用水,因此在应用于工业大规模生产的情况和环境友好的反应条件下,制备方法变得经济和环保,因

为它可以最大程度减少环境污染问题、使用有机溶剂产生的成本以及花费在处理废有机溶剂上的成本。

[0070] 根据一个实施方案,溶剂可以是水和有机溶剂的混合溶剂。

[0071] 根据另一个示例性实施方案,有机溶剂选自C₁-C₈醇、C₃-C₁₀酮、1,4-二氧六环、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷。

[0072] 根据本公开的一个实施方案,在(S-1)步骤中,缩合剂的当量和金属离子的当量彼此相同或不同,其中0.1至30.0摩尔当量分别与1摩尔当量的由式2表示的核苷磷酸化合物反应。具体地,缩合剂的当量和金属离子的当量彼此相同或不同,其中1.0至10.0摩尔当量分别与1摩尔当量的由式2表示的核苷磷酸化合物反应。

[0073] 根据本公开的一个实施方案,在(S-1)步骤中,反应温度可以在容易进行药物的一般合成的反应温度范围内,具体地,在步骤(S-1)中,反应温度可以为0℃至50℃,更具体为5℃至35℃。

[0074] 根据本公开的一个实施方案,所述制备方法还包括(S-2)将步骤(S-1)获得的产物固化以分离和纯化。

[0075] (S-2)步骤是指将在(S-1)步骤中进行的反应溶液固化后,通过各种方法进行将其纯化,使得该产物可以用作药物。

[0076] (S-2)步骤具体包括:第一步,在(S-1)步骤结束后,通过向其中或在其中注入或反注入有机溶剂以产生粗产物的固体并过滤固体。

[0077] 根据本公开的一个实施方案,(S-2)步骤中的有机溶剂可以是亲水性有机溶剂。亲水有机溶剂选自:C₁-C₈醇、C₃-C₁₀酮、1,4-二氧六环、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷。具体地,亲水性有机溶剂可以选自:甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙酮、1,4-二恶烷、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷等。

[0078] 根据本公开的一个实施例,(S-2)步骤还可以包括第二步骤,在第一步骤后,将生成的粗产物固体溶解于水中,将所得溶液吸附在阴离子交换树脂中以洗脱目标化合物,并将其转化成钠形式以获得最终化合物。

[0079] 根据本发明,阴离子交换树脂可以是弱碱性阴离子交换树脂(Amberlite IRA67, Diaion SA-11A等)、强碱性阴离子交换树脂(Amberlite IRA402, Diaion PA-312等)、弱酸性阳离子交换树脂(Diaion WK-30等)或强酸阳离子交换树脂(Diaion PK-216, Dowex 50WX2等)。具体地,目标化合物可以通过弱碱性阴离子交换树脂以更高的纯度洗脱。

[0080] 根据本公开的一个实施方案,可以提供用于制备由式1a表示的P¹,P⁴-二(尿苷5'-)四磷酸、其盐或其水合物的方法,其包括在溶剂存在下,使由式2表示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物;由式3表示的缩合剂;以及由式4表示的金属盐催化剂衍生的金属离子反应。

[0081] 除非相互矛盾,否则上述事项可以以相同的方式应用。

[0082] 如本公开的制备方法所示,通过比较简单的方法,通过使用水(环境友好的溶剂)使式2表示的核苷磷酸化合物与缩合剂和金属离子反应,可以以高效率和高纯度生产由式1表示的二核苷多磷酸、其盐或其水合物。

[0083] **【优异效果】**

[0084] 根据本公开,无需将市售形态的核苷磷酸化合物或其金属盐转化为核苷磷酸化合物的游离酸或有机盐形式的复杂且麻烦的过程,就可以高反应转化率地合成二核苷多磷

酸。因此,可以获得非常容易纯化且几乎不产生副产物并且具有足以用作药物原料的高质量的化合物。此外,提供了一种非常有效且环保的合成方法,其能够通过单独使用水作为溶剂或与有机溶剂组合来最大程度降低工业大规模生产过程中的环境污染。此外,该方法还可以广泛用于合成具有各种结构的取代的磷酸酯化合物衍生物。

【附图说明】

[0085] 图1显示了实施例1中合成的UP₄U(地夸磷索)的核磁共振谱(¹H NMR)的结果。

[0086] 图2显示实施例1中反应结束后获得的第一UP₄U(地夸磷索)的HPLC数据。

[0087] 图3显示了实施例1中合成和纯化后得到的最终UP₄U(地夸磷索)的HPLC数据。

[0088] 【发明方式】

[0089] 在下文中提出实施例以更好地理解本发明。然而,提供以下实施例仅仅是为了说明本发明,因此本发明不限于此。

[0090] 此外,下文提及的试剂和溶剂购自中国原料生产商Sigma-Aldrich Korea和TCI,并且使用Agilent Technologies的1200系列测量HPLC,使用Bruker的400 ultraShield NMR光谱仪测量¹H NMR。纯度通过HPLC的面积%测定。

[0091] 本发明中使用的HPLC条件如下,测定反应后或反应混合物中的UP₄U(地夸磷索)的纯度。

[0092] 检测器:UV分光光度计(测量波长:260nm)

[0093] 柱:YMC-Pack ODS-AQ(4.6mm×250mm,5μm)

[0094] 流动相:0.4%磷酸二氢钾水溶液

[0095] 流速:0.5mL/分钟

[0096] 样品:UP₄U(地夸磷索)10mg/流动相10mL

[0097] 注射量:10μl

[0098] 实施例1.通过UDP·2Na进行UP₄U合成

[0099] 将UDP·2Na盐(1,000g,2.23mol)溶于3.0L纯水中,然后将所得溶液在10℃下搅拌,然后依次向其中滴加EDC·HCl(428g,2.23mol)和CaCl₂·2H₂O(328g,2.23毫摩尔),使得到的混合物在10℃下搅拌4小时30分钟。通过HPLC监测反应。

[0100] 反应结束后,用3.0L纯化水和12.0L EtOH将得到的化合物固化,并将所得混合物在室温下搅拌约1小时。将生成的固体过滤并干燥,得到1,038g目标UP₄U化合物(纯度94.1%)。

[0101] 将得到的固体溶解于去离子水中,之后将所得溶液吸附到弱碱性阴离子交换树脂(Amberlite IRA系列)中,依次用去离子水、低浓度盐酸溶液和氯化钠溶液洗脱,然后减压浓缩,从而借助乙醇提取固体。过滤所得固体并干燥以获得目标UP₄U·4Na(780g,收率80%,纯度99.95%)。

[0102] 实验例1.由UDP·2Na合成UP₄U:对金属盐的影响

[0103] 将UDP·2Na盐(500mg,1.12mmol)溶于2mL纯水中,之后将DIC(259μL,1.67mmol)和各种金属盐(1.67mmol)依次滴加到所得溶液中,在室温下进行反应。

[0104] 通过HPLC分析反应溶液以获得与UDP·2Na相比转化为目标UP₄U的转化率以及反应溶液中UP₄U的纯度。

[0105] [表1]

[0106]

条目	起始材料 (当量)	缩合剂 (当量)	金属盐 (当量)	溶剂	与UDP相比的转化 率 (%)	反应溶液中UP ₄ U纯 度 (%)
1	UDP • 2Na (2)	DIC (3)	CaCl ₂ • 2H ₂ O (3)	H ₂ O	98	83
2			CaCl ₂ (3)		97	84
3			FeCl ₃ (3)		25	14
4			MgCl ₂ (3)		79	58
5			LiCl (3)		13	4
6			CeCl ₃ • 7H ₂ O (3)		72	55
7			NaCl (3)		4	2
8			-		2	1

[0107] 对于从UDP • 2Na盐合成UP₄U,根据表1的结果确定,不含金属盐的转化率达到2%,而用镁盐的转化率达到79%,用铁盐的转化率达到25%。在选择钙作为金属盐的情况下,还发现转化率高达97%至98%,并且反应溶液的纯度达到83%至84%,从而显示出显著的协同效应。

[0108] 换句话说,从以上结果确定,在使本公开的式2表示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物与缩合剂和金属离子反应的情况下,与没有金属离子的反应相比,可以以高收率和高纯度获得UP₄U。

[0109] 实验例2.由UDP • 2Na合成UP₄U:对缩合剂的影响

[0110] 将UDP • 2Na盐(500mg,1.12mmol)溶于2mL纯水中,之后,将各种缩合剂(1.67mmol)和金属盐CaCl₂ • 2H₂O(247mg,1.67mmol)依次滴加到所得溶液中,使得到的混合物在室温下反应。

[0111] 通过HPLC分析反应溶液,以获得目标UP₄U的转化率(与UDP相比)以及UP₄U的纯度。

[0112] [表2]

[0113]

条目	起始材料 (当量)	缩合剂 (当量)	金属盐 (当量)	溶剂	与UDP相比的转 化率	反应溶液中UP ₄ U纯度 (%)
1	UDP • 2Na (2)	DIC (3)	CaCl ₂ • 2H ₂ O (3)	H ₂ O	98	84
2		DCC (3)			27	15
3		EDC • HCl (3)			98	91
4		CDI (3)			3	-
5		HBTU (3)			1	-
6		DIC (3), HOBT (3)			98	88
7		DIC (3), HOAt (3)			85	66

[0114] 对于由UDP • 2Na盐合成UP₄U,从表2的结果中可以看出,在使用DIC、EDC • HCl或DIC和HOBT作为缩合剂的情况下,目标UP₄U的转化率达到98%以上,UP₄U的纯度也达到84%以上。具体地,确定在使用EDC • HCl作为缩合剂的情况下,反应时间显著减少,UP₄U的转化率高,目标化合物UP₄U可以以高纯度合成。

[0115] 实验例3.由UDP • 2Na合成UP₄U:反应温度、缩合剂和金属盐当量的影响

[0116] 将UDP • 2Na盐 (500mg, 1.12mmol) 溶于2mL纯水中,然后逐滴加入相当量的缩合剂和金属盐CaCl₂ • 2H₂O至所得溶液中进行反应。

[0117] 通过HPLC分析反应溶液,以获得转化成目标UP₄U的转化率(与UDP相比)以及UP₄U的纯度。

[0118] [表3]

[0119]

条目	起始材料 (当量)	缩合剂 (当量)	金属盐 (当量)	反应温度	与UDP相比的 转化率 (%)	反应溶液中UP ₄ U 纯度 (%)
1	UDP·2Na (2)	DIC (3)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (3)	R.T.	98	84
2				80°C	95	45
3				40°C	90	72
4				10°C	95	82
5			CaCl ₂ ·2H ₂ O (6)	R.T.	98	82
6			CaCl ₂ ·2H ₂ O (1.5)		96	82
7			CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.3)		44	26
8		DIC (6)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (6)		98	86
9		DIC (10)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (10)		96	82
10		EDC·HCl (3)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (3)		98	91
11		EDC·HCl (1.5)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (1.5)	89	78	
12		EDC·HCl (1)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (1)	65	47	
13		EDC·HCl (2)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (2)	98	90	
14				10°C	99	93
15				5°C	99	93

[0120] 对于由UDP·2Na盐进行的UP₄U合成,根据表3的结果确定,在40°C以上的高反应温度下溶解原料和目标化合物,反应液中的纯度降低至45%~72%。

[0121] 实验例4.由UDP·有机盐合成UP₄U:对金属盐的影响

[0122] 将UDP·2TBA盐(1g,1.30mmol)溶解于10mL DMF中,然后依次向所得溶液中滴加DIC(240μL,1.55mmol)和各种金属盐(1.55mmol),使得所得混合物在室温下反应。通过HPLC分析反应溶液,以获得转化成目标UP₄U的转化率(与UDP相比)以及UP₄U的纯度。

[0123] 将UDP·2TEA盐(500mg,0.82mmol)溶解于5mL的DMF中,然后按照以下当量将DIC和各种金属盐滴加到所得溶液中,使得到的混合物在室温下反应。通过HPLC分析反应溶液,以获得转化成目标UP₄U的转化率(与UDP相比)以及UP₄U的纯度。

[0124] [表4]

[0125]

条目	起始材料 (当量)	DIC (当量)	金属盐 (当量)	溶剂	与UDP相比 的转化率	反应溶液中UP ₄ U纯 度(%)
1	UDP·TBA (2)	1.2	CaCl ₂ ·2H ₂ O (1.2)	DMF	99	74
2			FeCl ₃ (1.2)		87	56
3			MgCl ₂ (1.2)		92	71
4			LiI (1.2)		91	48
5			CeCl ₃ ·7H ₂ O (1.2)		83	53
6	UDP·TEA (2)	6	MgCl ₂ (2)		88	77
7			MgCl ₂ ·6H ₂ O (2)		91	83
8		3	CaCl ₂ ·2H ₂ O (3)		90	82
9			CaCl ₂ (3)		90	78

[0126] 对于从UDP有机盐(TBA盐或TEA盐)合成UP₄U,根据表4的结果确定,在钙、铁、镁、锂或铈盐存在下,转化率高达83%至99%。

[0127] 已经确定,当有钙盐或镁盐存在下,在具有高转化率的反应溶液中反应时,可以以71%至83%的高纯度获得UP₄U。

[0128] 换句话说,从上述结果可以看出,使本发明的式2表示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物与缩合剂和金属离子反应的情况下,可以高收率和高纯度地获得UP₄U。

[0129] 实验例5.由cUTP合成UP₄U:对金属盐的影响

[0130] 将UTP·TBA盐(5g,9.10mmol)溶于50mL DMF中,之后通过DIC(1.69mL,10.92mmol)制备cUTP溶液,并取出1ml(0.11mmol)通过HPLC定量的cUTP溶液,使得将UMP·TBA盐溶液(0.13mmol)和各种金属盐(0.132mmol)依次加入所得溶液中,然后使所得混合物在室温下反应。通过HPLC分析反应溶液以获得转化成目标UP₄U的转化率(与UTP相比)以及UP₄U的纯度。

[0131] [表5]

[0132]

条目	cUTP (当量)	UMP (当量)	DIC (当量)	金属盐 (1.2当量)	与UDP相比的 转化率(%)	反应溶液中UP ₄ U 纯度(%)
1	1	1.2	1.2	MgCl ₂	87	69
2				Y(OTf) ₃	92	49

[0133]

3				LiCl	87	46
4				CaCl ₂	88	57
5				CaCl ₂ ·2H ₂ O	93	52
6				-	41	14

[0134] 对于由UTP·TBA盐合成UP₄U,根据表5的结果确定,在钙、铁、镁、锂或铈盐存在下,转化率高达83%至99%,而不含金属盐的转化率显著低至41%。

[0135] 从以上结果确定,在使本公开的式2表示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物与缩合剂和金属离子反应的情况下,与没有金属离子的反应相比,可以高收率和高纯度地获得UP₄U。

[0136] 对比例1:由UDP合成UP₄U:WO 2014/103704

[0137] 将UDP·2Na盐(50g,0.112mmol)溶于400mL纯水中,之后将得到的溶液吸附到Dowex 50w×2-100的强酸阳离子交换树脂中,并且以30mL/min的速率通过1200mL纯化水以从其中去除Na盐以洗脱UDP溶液。将三丁胺(80mL,0.336mmol)注入到洗脱液中,在pH7或以上进行中和,之后将所得溶液在60℃减压浓缩,然后在1,4-二氧六环的减压共沸下再次浓缩数次以除去水。将得到的残渣在室温下真空干燥12小时,得到75g UDP·2TBA盐(收率87%,水分1.2%)。

[0138] 在上述步骤中Na盐被TBA盐取代的UDP·2TBA(14.0g,18.1mmol)溶于46mL丙腈中,之后将羰基二咪唑(8.8g,54.3mmol)注入所得溶液中,然后将所得混合物在室温下搅拌约30分钟,减压浓缩除去溶剂。将7mL纯化水注入所得残余物中,然后将所得溶液冷却至约5℃,然后向其中注入UDP·2Na(4.1g,9.1mmol)。通过使用6N盐酸水溶液将反应溶液滴定至pH3.9,然后将60%氯化铁水溶液(75μL,0.36mmol)加入到所得溶液中,将得到的混合物在10℃下搅拌27小时。用7.5N氢氧化钠水溶液将反应溶液滴定至pH 10,然后将所得溶液在5℃下搅拌1小时。然后,在相同温度下将90mL乙醇注入所得溶液中,并将所得混合物在相同温度下放置12小时,然后过滤以获得13.8g(86.9%纯度)的固体形式的UP₄U化合物。

[0139] 基于实验例1至5的结果,确定了如实施例1中确定的本发明的制备方法所示,在使式2所示的核苷磷酸化合物、其盐或其水合物、缩合剂与金属离子反应的情况下,可以高收率和高纯度地合成二核苷多磷酸而没有繁琐的转化过程,但反应转化率高。即使与作为现有技术中最有效的实验方法的对比例1相比,确定本发明的制备方法可以使用原始材料的金属盐形式,例如钠盐等,其可以在没有繁琐的UDP盐取代过程的情况下商购获得,无需单独处理,并且通过非常简单的反应过程也可以大大缩短工作时间。

[0140] 从以上结果可以看出,可以确定本发明制备二核苷多磷酸、其盐或其水合物的方法,可以以工业友好的方式适用于大规模生产。

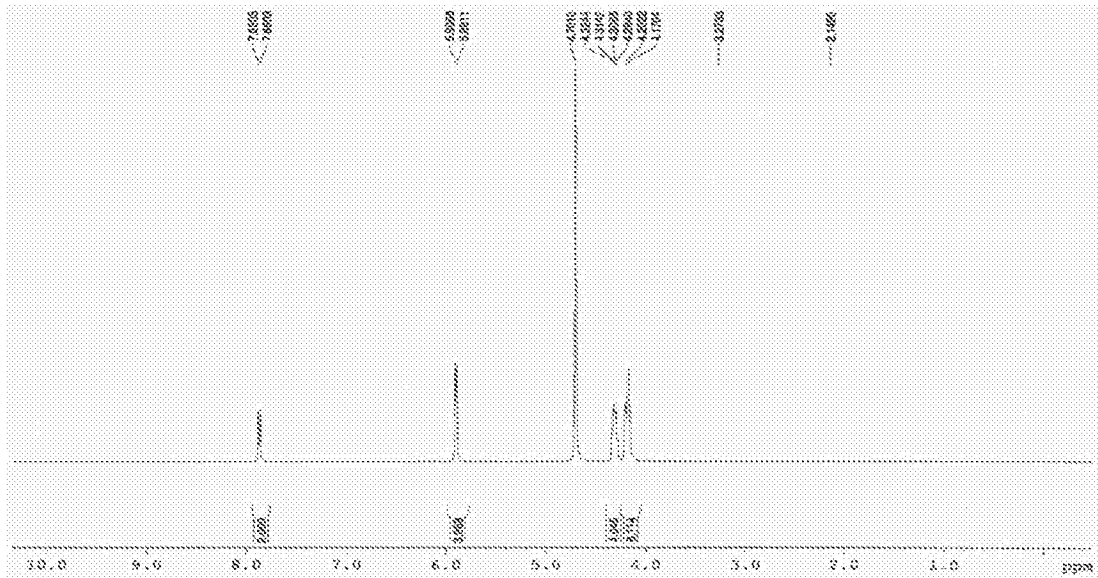


图1

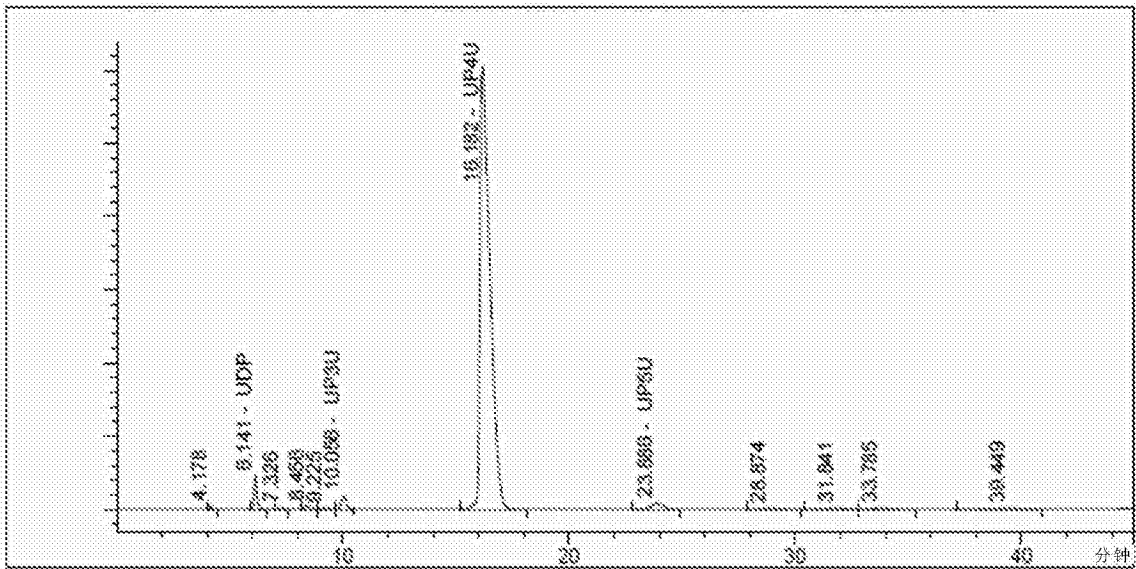


图2

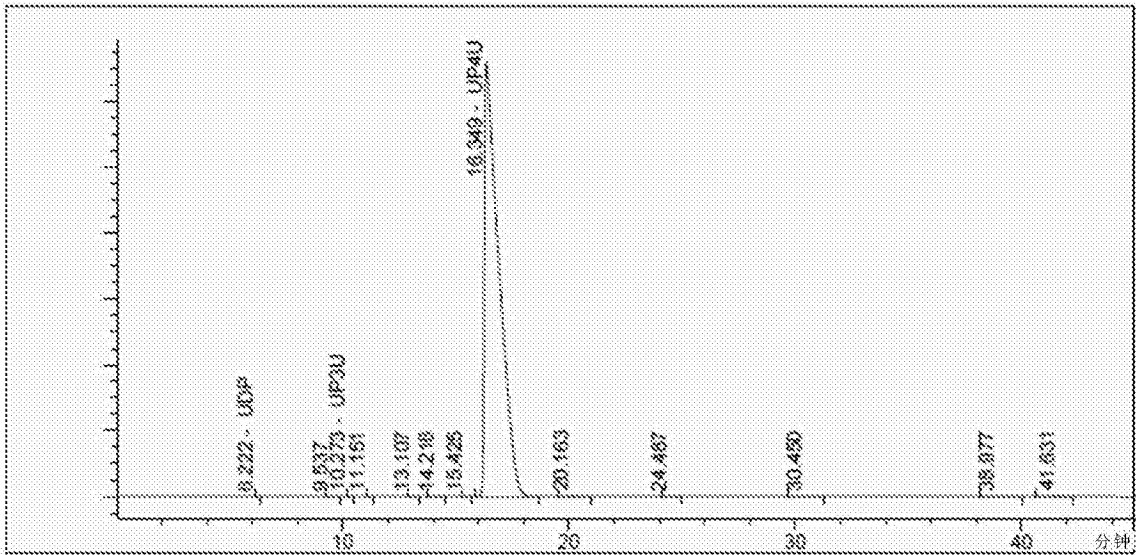


图3