



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113924308 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 13

(21) 申请号 202080040731.2

(22) 申请日 2020.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113924308 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(30) 优先权数据  
2019-113372 2019.06.19 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.12.01

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2020/024037 2020.06.18

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/256084 JA 2020.12.24

(73) 专利权人 雅玛山酱油株式会社  
地址 日本千叶县

(72) 发明人 向后悟

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 马妮楠 段承恩

(51) Int.Cl.  
C07H 19/067 (2006.01)

(56) 对比文件  
Fukuyama,KEI.Development of Efficient  
Synthetic Methods for C4-  
Tetrasubstituted Nucleoside Derivatives  
with Pharmacological Activites.《Tohoku  
University Doctoral Dissertation》.2016,第  
1-102页.

审查员 高履桐

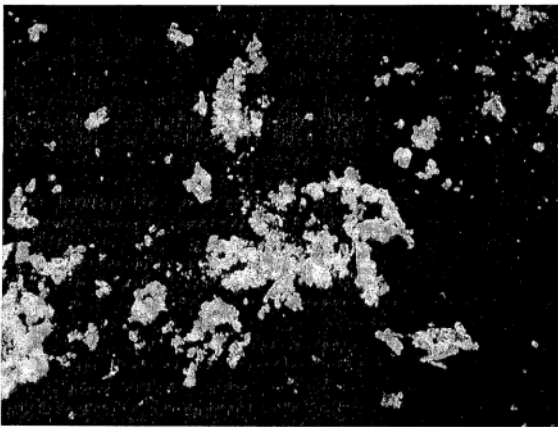
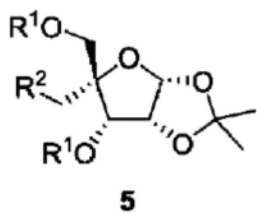
权利要求书2页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

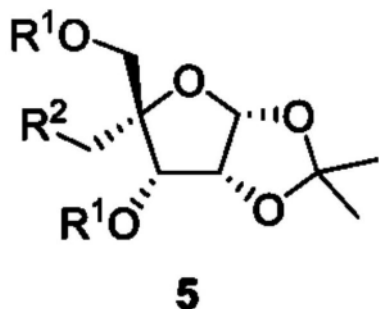
交联型核苷中间体的结晶及其制造方法以  
及交联型核苷亚磷酰胺的制造方法

(57) 摘要

式5所示的化合物的结晶。在上述式中,R<sup>1</sup>表  
示羟基的保护基,R<sup>2</sup>表示离去基团。



1. 式5所示的化合物的结晶,



在所述式中,  $R^1$  表示4-卤代苄基,  $R^2$  表示4-甲苯磺酰氧基、甲磺酰氧基、氯甲磺酰氧基或三氟甲磺酰氧基。

2. 根据权利要求1所述的结晶, 在粉末X射线分析中, 在作为衍射角  $2\theta$  的  $5.9 \pm 0.3$ 、 $11.4 \pm 0.6$ 、 $11.8 \pm 0.6$ 、 $13.2 \pm 0.7$ 、 $16.2 \pm 0.8$ 、 $17.2 \pm 0.9$ 、 $18.5 \pm 0.9$ 、 $19.5 \pm 1.0$ 、 $19.7 \pm 1.0$ 、 $20.1 \pm 1.0$ 、 $20.4 \pm 1.0$ 、 $21.4 \pm 1.1$ 、 $22.0 \pm 1.1$ 、 $23.0 \pm 1.2$ 、 $24.1 \pm 1.2$ 、 $24.3 \pm 1.2$ 、 $26.4 \pm 1.3$ 、 $29.9 \pm 1.5$  显示峰, 所述衍射角  $2\theta$  的单位为  $^\circ$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的结晶, 在利用热重测定/差示热分析即TG/DTA装置进行了测定时, 在  $124^\circ\text{C}$  显示吸热峰。

4. 根据权利要求1或2所述的结晶, 式5所示的所述化合物为交联型核苷中间体。

5. 式5所示的化合物的结晶的制造方法, 其包含下述工序1~工序5,

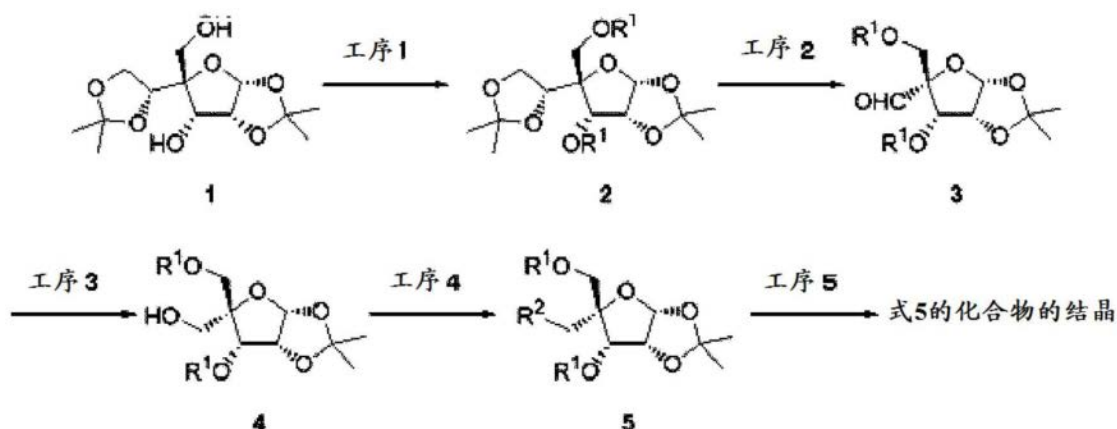
工序1: 对式1所示的化合物的羟基进行保护, 而获得式2所示的化合物的工序,

工序2: 将式2所示的化合物的4位二甲基二氧杂环戊烷基转变为醛基, 而获得式3所示的化合物的工序,

工序3: 将式3所示的化合物还原而使4位醛基为羟基, 而获得式4所示的化合物的工序,

工序4: 将式4所示的化合物的4位羟基转变为离去基团, 而获得式5所示的化合物的工序,

工序5: 将式5所示的化合物由结晶化溶剂结晶化, 而获得式5所示的化合物的结晶的工序,



在所述式中,  $R^1$  表示4-卤代苄基,  $R^2$  表示4-甲苯磺酰氧基、甲磺酰氧基、氯甲磺酰氧基或三氟甲磺酰氧基。

6. 根据权利要求5所述的结晶的制造方法, 在工序2与工序3之间, 进一步包含结晶化工

序。

7. 根据权利要求5或6所述的结晶的制造方法, 式5所示的所述化合物为交联型核苷中间体。

8. 一种交联型核苷亚磷酰胺的制造方法, 其包含以下工序,

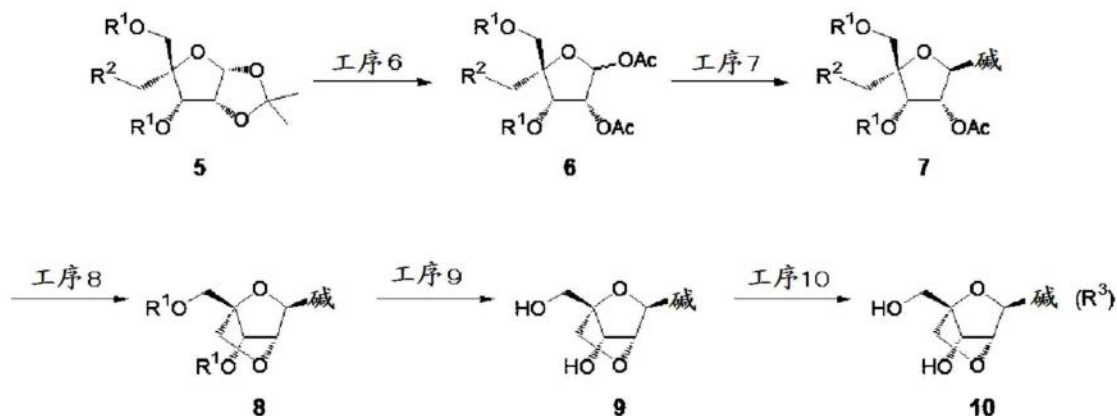
工序6: 使通过权利要求5~7中任一项的制造方法而获得的式5所示的化合物的结晶悬浮于溶剂后, 将该化合物的异亚丙基转变为乙酰基, 而获得式6所示的化合物的工序,

工序7: 将式6所示的化合物与进行了甲硅烷基化的碱缩合, 而获得式7所示的化合物的工序,

工序8: 在除去式7所示的化合物的保护基的同时进行环化反应, 而获得式8所示的化合物的工序,

工序9: 将式8所示的化合物的羟基保护基除去, 而获得式9所示的化合物的工序,

工序10: 根据需要向式9所示的化合物的碱部的氨基导入保护基, 而获得式10所示的化合物的工序,



在所述式中,  $R^1$ 表示4-卤代苄基,  $R^2$ 表示4-甲磺酰氧基、甲磺酰氧基、氯甲磺酰氧基或三氟甲磺酰氧基,  $R^3$ 表示氢原子或氨基保护基。

## 交联型核苷中间体的结晶及其制造方法以及交联型核苷亚磷酰胺的制造方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及交联型核苷中间体的结晶及其制造方法、以及交联型核苷亚磷酰胺(Amidite)的制造方法。

### 背景技术

[0002] 作为采用核酸医药的疾病的治疗方法,有反义法(antisense method)、反基因法(antigene method)、适体法(apramer method)、siRNA法等。

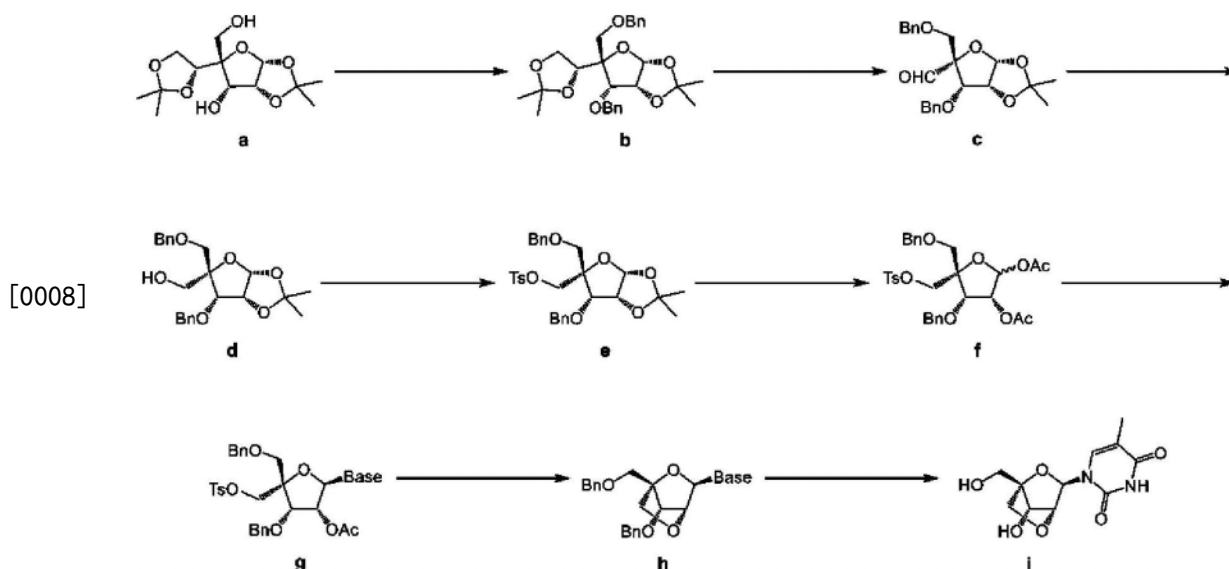
[0003] 通常,核苷糖部的呋喃糖环不是平面结构,而是采取被称为N型、S型的扭曲了的构象(歪んだコンフォメーション),根据环上的取代基而偏于特定的构象。作为例子,在2'位具有羟基的核糖核苷的情况下N型的构象占优势。

[0004] 今西等人通过将核苷糖部的4'位与2'位羟基交联,从而成功地将核苷的构象强制固定为N型。作为结果,明确了包含该交联型核苷的LNA(锁核酸,Locked Nucleic Acids)与互补序列的核酸形成极其稳定的双链(参照专利文献1)。

[0005] 基于上述特性等,近年来作为核酸药品的原材料,对LNA的期待提高。

[0006] 作为交联型核苷合成法的例子,已知以核苷作为原料的方法(专利文献1)、以糖作为起始原料的方法(专利文献2、非专利文献1、非专利文献2)。

[0007] 在现有的交联型核苷的合成法中,作为特别优异的方法之一,由日本的东北大学提出了以下合成法(非专利文献3)。



[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特开平10-304889号公报

[0012] 专利文献2:日本特表2002-521310号公报

[0013] 非专利文献

- [0014] 非专利文献1:J.Org.Chem.2001,66,8504-8512  
 [0015] 非专利文献2:Tetrahedron 1998,54,3607-3630  
 [0016] 非专利文献3:日本东北大学博士论文(11301甲第17068号,2016年)

## 发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 在现有的交联型核苷的合成法(例如专利文献1、2、非专利文献2所记载的方法)中,以通过一系列工序合成交联型核苷亚磷酰胺作为目的。因此,关于反应中间体(以下,有时称为“交联型核苷中间体”)的稳定性、保存等,没有进行研究是现状。

[0019] 然而,发明人进行了研究,结果发现对于现有的交联型核苷的合成方法,存在必须经由比较不稳定的反应中间体这样的课题。在工业上制造交联型核苷时,需要从特定的反应中间体根据需要合成多个交联型核苷,理想的是期望能够稳定地保存特定的反应中间体。

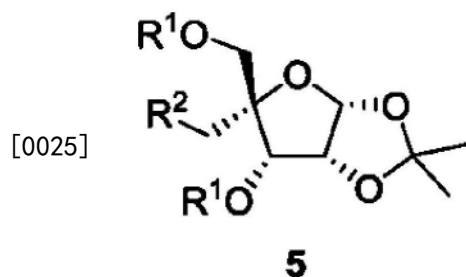
[0020] 即,本公开的课题是提供能够长期稳定地保存的能够作为交联型核苷中间体而使用的化合物的结晶及其制造方法。此外,本公开的课题是提供使用该化合物的结晶的交联型核苷亚磷酰胺的制造方法。

[0021] 用于解决课题的手段

[0022] 发明人为了解决上述课题而进行了研究,结果发现,具有特定的取代基的化合物容易结晶化,在该结晶的形态下作为交联型核苷中间体而能够稳定地保存。

[0023] 即,本公开涉及以下特定的发明。

[0024] [1]以下式5所示的化合物的结晶。



[0026] 在上述式中, $R^1$ 表示羟基的保护基, $R^2$ 表示离去基团。

[0027] [2]根据[1]所述的结晶,在粉末X射线分析中,在作为衍射角( $2\theta$ )的 $5.9 \pm 0.3$ 、 $11.4 \pm 0.6$ 、 $11.8 \pm 0.6$ 、 $13.2 \pm 0.7$ 、 $16.2 \pm 0.8$ 、 $17.2 \pm 0.9$ 、 $18.5 \pm 0.9$ 、 $19.5 \pm 1.0$ 、 $19.7 \pm 1.0$ 、 $20.1 \pm 1.0$ 、 $20.4 \pm 1.0$ 、 $21.4 \pm 1.1$ 、 $22.0 \pm 1.1$ 、 $23.0 \pm 1.2$ 、 $24.1 \pm 1.2$ 、 $24.3 \pm 1.2$ 、 $26.4 \pm 1.3$ 、 $29.9 \pm 1.5$ (°)显示峰。

[0028] [3]根据[1]或[2]所述的结晶,在利用热重测定/差示热分析(TG/DTA)装置进行了测定时,在 $124^\circ\text{C}$ 显示吸热峰。

[0029] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的结晶,式5所示的上述化合物为交联型核苷中间体。

[0030] [5]式5所示的化合物的结晶的制造方法,其包含下述工序1~工序5。

[0031] 工序1:对式1所示的化合物的羟基进行保护,而获得式2所示的化合物的工序,

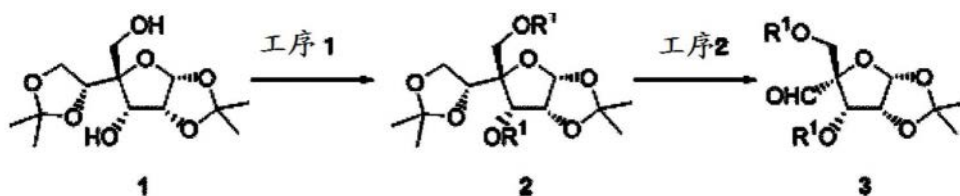
[0032] 工序2:将式2所示的化合物的4位二甲基二氧杂环戊烷基转变为醛基,而获得式3

所示的化合物的工序,

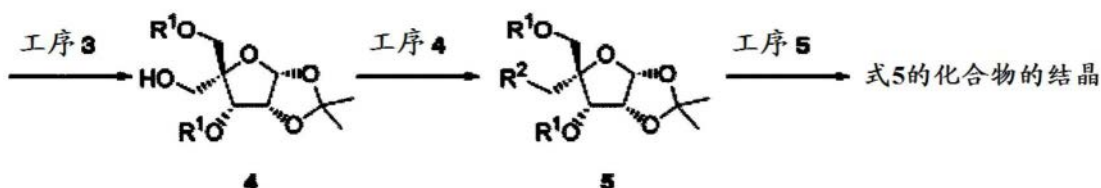
[0033] 工序3:将式3所示的化合物还原而使4位醛基为羟基,而获得式4所示的化合物的工序,

[0034] 工序4:将式4所示的化合物的4位羟基转变为离去基团,而获得式5所示的化合物的工序,

[0035] 工序5:将式5所示的化合物由结晶化溶剂结晶化,而获得式5所示的化合物的结晶的工序,



[0036]



[0037] 在上述式中, $R^1$ 表示羟基的保护基, $R^2$ 表示离去基团。

[0038] [6]根据[5]所述的结晶的制造方法,在工序2与工序3之间,进一步包含结晶化工序。

[0039] [7]根据[5]或[6]所述的结晶的制造方法,式5所示的上述化合物为交联型核苷中间体。

[0040] [8]一种交联型核苷亚磷酰胺的制造方法,其包含以下工序。

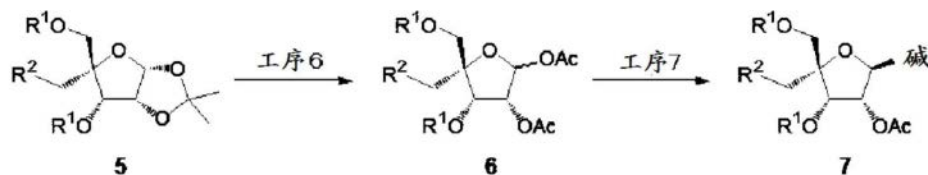
[0041] 工序6:使通过[5]~[7]中任一项的制造方法而获得的式5所示的化合物的结晶悬浮于溶剂后,将该化合物的异亚丙基转变为乙酰基,而获得式6所示的化合物的工序,

[0042] 工序7:将式6所示的化合物与进行了甲硅烷基化的碱缩合,而获得式7所示的化合物的工序,

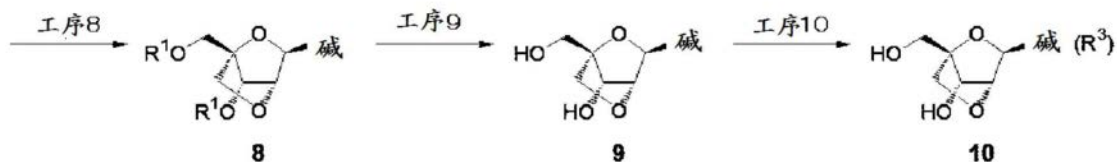
[0043] 工序8:在除去式7所示的化合物的保护基的同时进行环化反应,而获得式8所示的化合物的工序,

[0044] 工序9:将式8所示的化合物的羟基保护基除去,而获得式9所示的化合物的工序,

[0045] 工序10:根据需要向式9所示的化合物的碱部的氨基导入保护基,而获得式10所示的化合物的工序,



[0046]

[0047] 在上述式中, $R^1$ 表示羟基的保护基, $R^2$ 表示离去基团, $R^3$ 表示氢原子或氨基保护基。

[0048] 发明的效果

[0049] 根据本公开,可以提供能够长期稳定地保存的能够作为交联型核苷中间体而使用的化合物的结晶及其制造方法。此外,根据本公开,可以提供使用该化合物的结晶的交联型核苷亚磷酰胺的制造方法。

### 附图说明

[0050] 图1显示式5所示的化合物的结晶的照片。

[0051] 图2显示式5所示的化合物的结晶的粉末X射线衍射光谱。

[0052] 图3显示式5所示的化合物的结晶的热重测定/差示热分析结果。

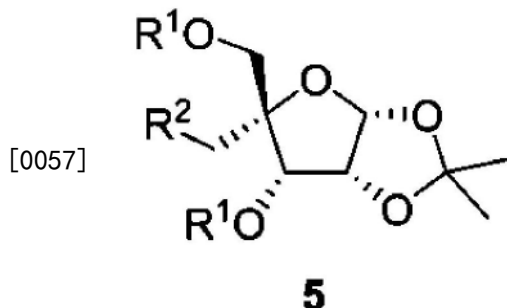
[0053] 图4显示式5所示的化合物的结晶的加速试验结果。

[0054] 图5 (i) 显示通过工序2而获得的式3所示的化合物的结晶的溶解液的TLC分析结果。图5 (ii) 显示在非专利文献3所记载的条件下获得的式c所示的化合物的反应液的TLC分析结果。

### 具体实施方式

[0055] 以下,参照附图对本公开的实施方式具体地说明。本公开不限于以下实施方式,应该理解在不超出本公开的宗旨的范围,基于本领域技术人员的通常知识,对以下实施方式适当加入了变更、改良等的实施方式也落入本公开的范围。

[0056] 本公开如上述那样,涉及以下式5所示的化合物的结晶。

[0058] 在上述式中, $R^1$ 表示羟基的保护基, $R^2$ 表示离去基团。

[0059] 本公开的结晶如果如后述实施例所记载的那样用显微镜观察,则显示图1那样的外观。

- [0060] 本公开的结晶在粉末X射线分析中具有特征性峰。
- [0061] 本说明书中的粉末X射线衍射在以下条件下进行。
- [0062] [X射线解析装置]X' Pert PRO MPD (スペクトリス)
- [0063] [靶]Cu
- [0064] [X射线管电流]40mA
- [0065] [X射线管电压]45kV
- [0066] [扫描范围] $2\theta=4.0 \sim 40^\circ$
- [0067] 如果将本公开的结晶使用上述所记载的条件用粉末X射线衍射装置进行分析,则如后述实施例所记载的那样,在以下表1所示那样的衍射角 ( $2\theta$ ) 附近显示特征性峰 (参照图2)。
- [0068] [表1]



No.	Pos. [°2Th.]	d值[Å]	NET强度 [cts]	相对强度 [%]	
1	5.9165	14.93835	2502.83	25.18	
2	10.1471	8.71762	625.56	6.29	
3	11.3691	7.78318	2243.71	22.57	
4	11.8382	7.47580	7576.93	76.22	
5	13.1577	6.72893	3047.28	30.66	
6	15.3195	5.78389	610.48	6.14	
7	16.1935	5.47364	3654.28	36.76	
8	17.1773	5.16231	1409.99	14.18	
9	17.7460	4.99814	478.93	4.82	
10	18.4906	4.79851	4680.94	47.09	
11	19.4686	4.55962	9940.27	100.00	
12	19.7004	4.50649	6210.24	62.48	
13	20.0967	4.41850	4495.28	45.22	
14	20.3630	4.36133	2937.43	29.55	
15	21.4153	4.14933	5525.77	55.59	
16	21.9978	4.04075	3202.83	32.22	
17	22.9853	3.86935	7071.51	71.14	
[0069]	18	24.0829	3.69542	2077.87	20.90
	19	24.3163	3.66048	2619.89	26.36
	20	25.7510	3.45970	702.44	7.07
	21	25.9498	3.43365	600.86	6.04
	22	26.4303	3.37230	1359.33	13.67
	23	27.9228	3.19535	787.09	7.92
	24	28.5826	3.12308	596.98	6.01
	25	28.8891	3.09064	811.35	8.16
	26	29.2447	3.05386	958.89	9.65
	27	29.8553	2.99278	995.33	10.01
	28	30.7443	2.90824	420.84	4.23
	29	31.7594	2.81756	287.01	2.89
	30	32.1622	2.78319	612.03	6.16
	31	32.7859	2.73165	320.05	3.22
	32	33.3645	2.68560	249.63	2.51
	33	34.4102	2.60634	761.54	7.66
	34	36.0061	2.49439	579.68	5.83
	35	36.9022	2.43586	691.66	6.96
	36	38.2233	2.35465	315.45	3.17

[0070] 在将本公开的结晶在上述条件下用粉末X射线衍射装置进行了分析的情况下,在5.9、11.4、11.8、13.2、16.2、17.2、18.5、19.5、19.7、20.1、20.4、21.4、22.0、23.0、24.1、24.3、26.4、29.9(°)显示相对强度10%以上的峰。

[0071] 一般而言,粉末X射线衍射中的衍射角(2 $\theta$ )有时包含小于5%的误差范围。因此,除了粉末X射线衍射中的峰的衍射角完全一致的结晶以外,峰的衍射角以小于5%的误差一致的结晶也包含于本公开的结晶。在粉末X射线衍射中,例如,相对强度10%以上的峰的衍射角(2 $\theta$ )显示 $5.9\pm0.3$ 、 $11.4\pm0.6$ 、 $11.8\pm0.6$ 、 $13.2\pm0.7$ 、 $16.2\pm0.8$ 、 $17.2\pm0.9$ 、 $18.5\pm0.9$ 、 $19.5\pm1.0$ 、 $19.7\pm1.0$ 、 $20.1\pm1.0$ 、 $20.4\pm1.0$ 、 $21.4\pm1.1$ 、 $22.0\pm1.1$ 、 $23.0\pm1.2$ 、 $24.1\pm1.2$ 、 $24.3\pm1.2$ 、 $26.4\pm1.3$ 、 $29.9\pm1.5$ ( $^{\circ}$ )。

[0072] 本公开的式5所示的化合物的结晶如后述实施例所记载的那样,在用热重测定/差示热分析(TG/DTA)装置(升温速度5 $^{\circ}\text{C}$ /分钟)进行了分析时,在124 $^{\circ}\text{C}$ 具有吸热峰(参照图3)。

[0073] 本说明书中的热重测定/差示热分析(TG/DTA)在以下条件下进行。

[0074] [使用设备]热分析装置STA7200(日立ハイテクサイエンス)

[0075] [测定条件]在30~190 $^{\circ}\text{C}$ 的范围每1分钟升温各5 $^{\circ}\text{C}$ ,测定试样的热量变化。作为对照,使用氧化铝。

[0076] 本公开的式5所示的化合物的结晶能够在室温下长期稳定地保存。关于化合物的长期稳定性,可以通过如后述实施例所记载那样的条件,实施加速试验来评价。

[0077] 此时,本公开的结晶即使在上述加速试验后HPLC纯度也显示90%以上,优选显示95%以上,进一步优选显示98%以上,进一步优选显示99%以上,进一步优选显示99.5%以上(参照图4)。

[0078] 此外,本公开涉及包含下述工序1~工序5的、式5所示的化合物的结晶的制造方法。

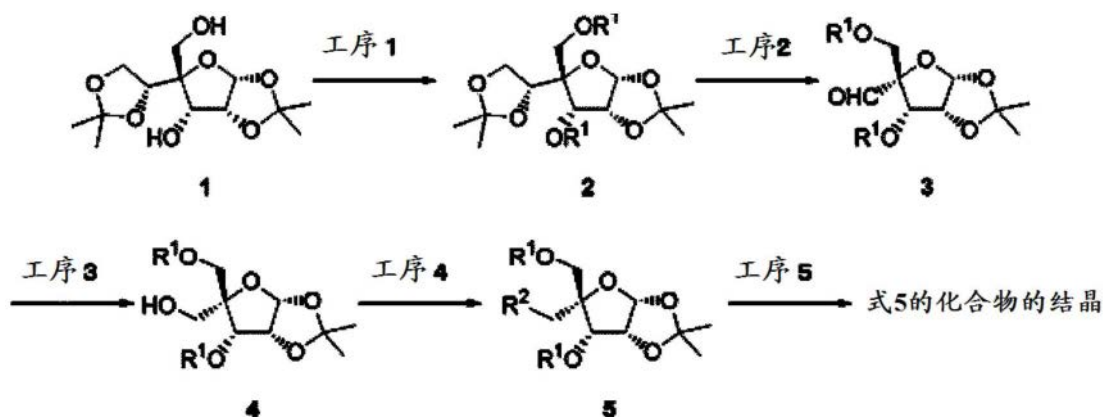
[0079] 工序1:对式1所示的化合物的羟基进行保护,而获得式2所示的化合物的工序,

[0080] 工序2:将式2所示的化合物的4位二甲基二氧杂环戊烷基转变为醛基,而获得式3所示的化合物的工序,

[0081] 工序3:将式3所示的化合物还原而使4位醛基为羟基,而获得式4所示的化合物的工序,

[0082] 工序4:将式4所示的化合物的4位羟基转变为离去基团,而获得式5所示的化合物的工序,

[0083] 工序5:将式5所示的化合物由结晶化溶剂结晶化,而获得式5所示的化合物的结晶的工序



[0085] 在上述式中, $\text{R}^1$ 表示羟基的保护基, $\text{R}^2$ 表示离去基团。

[0086] 关于以式1所示的化合物作为起始原料,包含上述工序1~工序5的合成法,以下详细记载。

[0087] 式2所示的化合物可以通过将式1所示的化合物的3位和5位的羟基用4-取代苄基保护来获得。在4-取代苄基中,从本公开的式5所示的化合物显示良好的结晶性考虑,优选4-氟苄基、4-氯苄基、4-溴苄基、4-碘苄基等4-卤代苄基和4-硝基苄基。它们之中,从本公开的式5所示的化合物的结晶性高考虑,优选4-氯苄基、4-溴苄基、4-碘苄基、4-硝基苄基,在获得的容易性、成本方面,优选4-溴苄基。

[0088] 4-取代苄基向该式1所示的化合物的导入只要按照公知的方法进行即可。例如如果是导入4-溴苄基的情况,则只要在DMF中,在0℃下用NaH处理15分钟~3小时左右后,与4-溴苄基溴在室温下反应1小时~24小时即可。此外,也可以使用采用氢氧化钠水溶液、氢氧化钾水溶液、与作为有机溶剂的二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃等醚系溶剂的组合的肖滕-鲍曼型条件。进一步,也可以使用Protective Groups in ORGANIC SYNTHESIS所记载的各种保护基导入法。

[0089] 式1所示的化合物是公知的,也可以使用市售品,也可以通过公知的方法(例如J.Org.Chem.2015,80,5337-5343)合成。

[0090] 工序2是将式2所示的化合物的4位二甲基二氧杂环戊烷基转变为醛基,而获得式3所示的化合物的工序。

[0091] 在本工序中,为了将4位的二甲基二氧杂环戊烷基脱保护而形成二醇体,而添加脱保护剂。作为所使用的脱保护剂,可以使用乙酸、三氟乙酸、盐酸、硫酸、碘等。它们之中,从其获得容易性和操作性考虑,优选使用乙酸。

[0092] 脱保护剂的添加量可以根据脱保护材料的种类来适当设定,例如如果是乙酸的情况则优选使用溶剂量。

[0093] 此外,如后述那样,从采用结晶化的精制容易考虑,优选使用水作为辅助溶剂。脱保护剂与辅助溶剂的比率以体积基准计优选为10:1~1:1左右,更优选为2:1。

[0094] 在本工序中,为了将对4位的二甲基二氧杂环戊烷基进行脱保护而生成的二醇体氧化断裂而转变为醛基,使用氧化剂。作为可以利用的氧化剂,有过碘酸钠、过碘酸钾等过碘酸盐、四乙酸铅等。它们之中,从成本、毒性等方面考虑,优选使用相对于二醇体为1~10摩尔当量的过碘酸钠。此外,其使用量更优选为1~2摩尔当量。

[0095] 在工序2中,为了提高氧化剂的反应性,可以使用添加剂。作为添加剂,有碘等。

[0096] 在上述工序2的反应条件的组合中,优选使用乙酸作为脱保护剂,使用水作为溶剂,使用过碘酸钠作为氧化剂。

[0097] 在使用该条件的情况下,可以在0~100℃下进行反应。反应温度特别更优选为50~80℃左右。只要在上述条件下反应1~24小时即可。

[0098] 通过使用该组合,从而在反应体系中不存在过剩的碘等,反应后的溶剂的废弃容易等,适于工业生产。此外,通过使用式1所示的化合物,从而可以不使用色谱等精制手段,通过结晶化而以70~90%以上这样的高收率获得目标的式3所示的化合物。

[0099] 工序3是将式3所示的化合物还原而使4位醛基为羟基,而获得式4所示的化合物的工序。

[0100] 在本工序中,需要添加还原剂。作为还原剂的种类,没有特别限制,但可以利用例

如硼氢化钠、氢化锂铝、硼烷衍生物等、接触还原等。它们之中,从成本、安全性方面考虑,优选使用硼氢化钠。还原剂的添加量可以根据还原剂的种类来适当调整。例如在硼氢化钠的情况下,优选相对于式3所示的化合物使用0.25~10摩尔当量,更优选使用0.25~2摩尔当量。在上述条件下,可以在-30~50℃,更优选在-10~25℃下进行10~120分钟反应。

[0101] 本工序中的溶剂可以根据还原剂等的种类来适当利用。例如作为水系溶剂,可以利用水,作为有机溶剂,可以利用甲醇、乙醇等醇溶剂、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、4-甲基四氢吡喃、和它们与水的组合。

[0102] 工序4是将式4所示的化合物的4位的羟基转变为离去基团,而获得式5所示的化合物的工序。

[0103] 作为在本工序中被导入的离去基团,没有特别限制,但为了高效率地进行交联化反应,优选为亲核取代反应中的反应性高的取代基。作为那样的取代基的例子,可举出4-甲苯磺酰氧基、甲磺酰氧基、氯甲磺酰氧基、三氟甲磺酰氧基、卤代基等。它们之中,从离去基团导入试剂易于获得、便宜方面考虑,优选4-甲苯磺酰氧基。

[0104] 在本工序中使用的溶剂可以根据导入的离去基团的种类来适当选择有机溶剂、水与有机溶剂的组合。具体而言,也可以利用采用作为有机溶剂的吡啶、二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂与三乙胺等有机碱的组合、作为水系溶剂的水-三乙胺等有机碱、氢氧化钠水溶液、氢氧化钾水溶液与作为有机溶剂的二氯甲烷、氯仿等卤素系溶剂、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃等醚系溶剂的组合的肖滕-鲍曼型条件。它们之中,从毒性、成本方面考虑,优选使用吡啶、氢氧化钠水溶液-四氢呋喃、氢氧化钠水溶液-2-甲基四氢呋喃之中的任一者。离去基团的导入试剂的使用量可以根据取代离去基团和溶剂的种类来适当选择。例如在使用4-甲苯磺酰氯作为离去基团、使用吡啶作为溶剂的情况下,相对于式3所示的化合物优选使用1~10摩尔当量,更优选使用1~2摩尔当量。在上述条件下,只要在-10~100℃、更优选在0~60℃下反应1~24小时即可。

[0105] 工序5是对式5所示的化合物的合成反应液进行后处理操作,而获得式5所示的化合物的结晶的工序。作为式5所示的化合物的结晶化溶剂,可以例示乙醇等醇溶剂、各种良溶剂与不良溶剂的组合。作为良溶剂,可例示乙酸乙酯、四氢呋喃、吡啶、氯仿、乙腈、丙酮、和它们的衍生物。此外,作为不良溶剂,可例示己烷、醇、水、和它们的衍生物。

[0106] 在上述各工序中,在必要情况下,可以在工序结束后进行分离/精制操作,但也可以不进行。作为分离/精制的方法,可举出离子交换、吸附等各种色谱、结晶化,但通过本公开的合成法而获得的化合物的结晶性高,因此优选进行结晶化。

[0107] 特别优选式3所示的化合物通过结晶化进行精制。即,优选在工序2与工序3之间进一步包含结晶化工序。在通过结晶化进行精制的情况下,反应的溶剂优选为乙酸-水。此时,随着反应的进行,式3所示的化合物的结晶析出。

[0108] 此时,随着反应的进行,目标化合物作为结晶而析出,因此可以防止因为由过剩反应引起的分解而生成副产物,精制效果也高。因此,在工序2中,即使不进行采用色谱的复杂的精制操作,也可以抑制杂质的副生和混入(参照图5(i))。

[0109] 另一方面,在通过非专利文献3所记载的方法而从上述式b所示的化合物合成式c所示的化合物的情况下,杂质更多地副生(参照图5(ii))。进一步,式c所示的化合物为非结晶性,因此在进行精制的情况下需要采用色谱的复杂的精制操作。

[0110] 本公开的式5所示的化合物的结晶由于可以长期稳定地保存,因此可以作为交联型核苷中间体而使用。此外,该结晶由于不需要采用色谱的精制工序,因此适于工业制造。

[0111] 本公开的式5所示的化合物的结晶可以按照非专利文献2等的公知的记载,通过以下所示的工序6~工序10来合成交联型核苷。

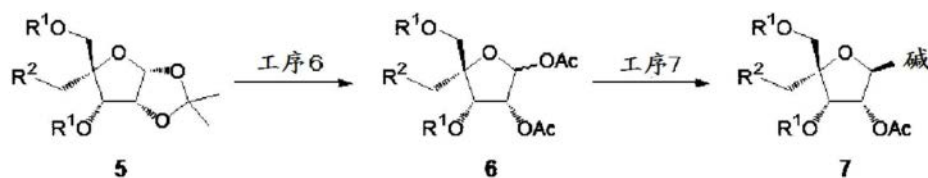
[0112] 工序6:使式5所示的化合物的结晶悬浮于溶剂后,将该化合物的异亚丙基转变为乙酰基,而获得式6所示的化合物的工序

[0113] 工序7:将式6所示的化合物与进行了甲硅烷基化的碱缩合,而获得式7所示的化合物的工序

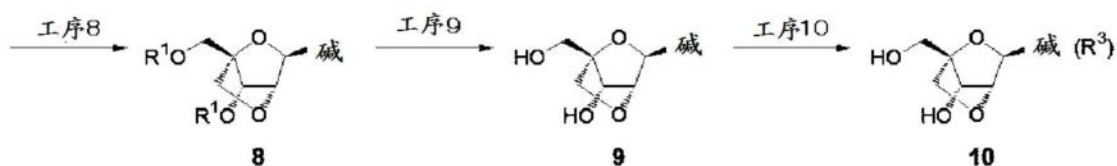
[0114] 工序8:在除去式7所示的化合物的保护基的同时进行环化反应,而获得式8所示的化合物的工序

[0115] 工序9:将式8所示的化合物的羟基保护基除去,而获得式9所示的化合物的工序

[0116] 工序10:根据需要向式9所示的化合物的碱部的氨基导入保护基,而获得式10所示的化合物的工序



[0117]



[0118] 在上述式中, $R^1$ 表示羟基的保护基, $R^2$ 表示离去基团, $R^3$ 表示氢原子或氨基保护基。

[0119] 上述式中的碱除了胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、鸟嘌呤以外可以为2-硫尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤这样的碱。进一步,在工序中这些碱可以进一步受到化学反应而转变为其它碱。

[0120] 这些碱上的氨基可以被乙酰基、苯氧基乙酰基、苯甲酰基、异丁酰基这样的酰基、二甲基甲脒基这样的保护基保护。

[0121] 进一步,关于上述交联型核苷能够转变为对应的交联型核苷亚磷酰胺,通过非专利文献2等的公知的记载,只要是本领域技术人员就可以容易理解。

[0122] 本公开的交联型核苷的制造方法由于使用可以稳定地保存的式5所示的化合物的结晶作为交联型核苷中间体,因此可以根据需要制造各种交联型核苷。

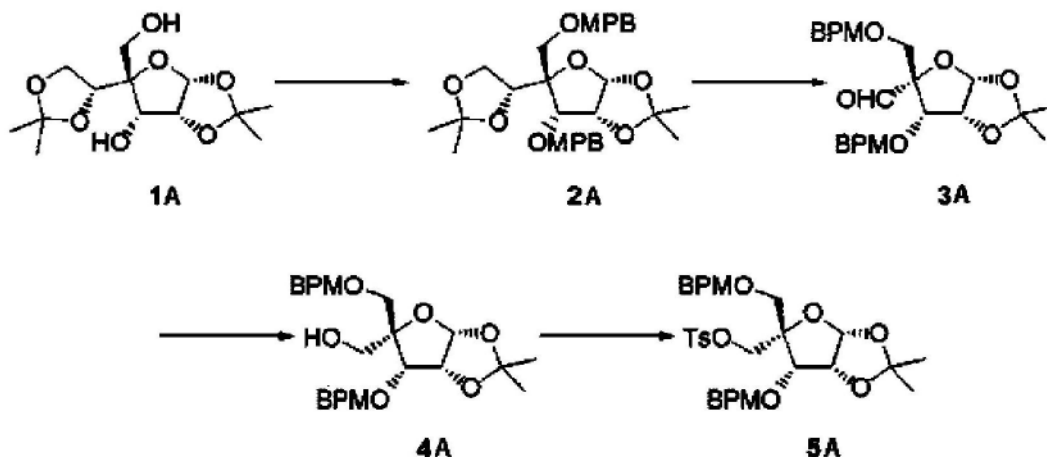
[0123] 以下,记载实施例,但本发明不受实施例的内容限定。

[0124] 实施例

[0125] (实施例1)

[0126] <化合物5A的结晶的制造>

[0127] 以化合物1A作为起始原料,通过以下工序而制造出化合物5A的结晶。需要说明的是,式中,“BPMO”和“OMPB”都表示BPM基结合了的O基。此外,“BPM”表示溴(苯基)甲基(也被称为4-溴苄基)。



[0128]

[0129] 从化合物1A获得化合物2A(式2所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基)的工序

[0130] 将化合物1A(20.43g, 70.37mmol)溶解于二甲基乙酰胺(脱水, 352mL), 冷却到0℃。加入氢化钠(60质量%油性, 7.04g, 0.176mol), 搅拌1小时后, 加入4-溴苄基溴(44.0g, 0.176mol), 在室温下搅拌17小时。在反应液中加入甲醇(10mL)进行搅拌后, 进行了浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯进行水洗后, 将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩, 获得了化合物2A。

[0131] 从化合物2A获得化合物3A(式3所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基)的工序

[0132] 将化合物2A在乙酸(507mL)中在60℃下加热溶解后, 添加过碘酸钠(30.1g, 0.141mol)水溶液(253mL, 在60℃下加热溶解)之中的50mL。在5分钟后添加30mL, 进一步经5分钟添加剩余, 在该温度下搅拌3小时。将反应液冷却到0℃并搅拌45分钟后, 滤取析出的固体(结晶)。用乙酸:去离子水(以体积比计为2:1), 接着用去离子水洗涤后, 进行真空干燥, 获得了化合物3A的结晶(33.10g, 59.51mmol, 84.57%)。

[0133]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz);  $\delta$ 9.89(1H, s), 7.48-7.44(4H, m), 7.20-7.09(4H, m), 5.86(1H, d), 4.66(1H, d), 4.63(1H, t), 4.52(1H, s), 4.47(1H, d), 4.41(1H, d), 4.31(1H, d), 3.66(1H, d), 3.60(1H, d), 1.60(3H, s), 1.36(3H, s)。

[0134] 从化合物3A获得化合物4A(式4所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基)的工序

[0135] 将化合物3A的结晶(33.10g, 59.51mmol)悬浮于甲醇(298mL)、四氢呋喃(298mL), 冷却到0℃。将硼氢化钠(563mg, 14.9mmol)每次少量分次添加, 在搅拌5分钟后, 进一步添加相同量的硼氢化钠(563mg, 14.9mmol), 搅拌2小时。将反应液浓缩直到少量后, 在残渣中加入乙酸乙酯, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩, 获得了化合物4A。

[0136] 从化合物4A获得化合物5A(式5所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基)的结晶的工序

[0137] 将化合物4A用吡啶共沸3次后, 将残渣溶解于吡啶(脱水, 119mL), 加入4-甲苯磺酰氯(22.7g, 0.119mol), 在30℃下搅拌17小时。加入去离子水(10mL)进行搅拌后, 将反应液浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩后, 将残渣用甲苯共沸3次。将固化了的残渣溶解于乙酸乙酯(50mL), 将己烷(100mL)每次少量分次添加(结晶析出)。进一步添加己烷(100mL), 静置过夜。滤取析出的固体, 用己烷洗涤后, 进行真空干燥, 获得了化合物5A的结晶(32.22g, 45.20mmol, 75.95%)。

[0138]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz);  $\delta$ 7.77(2H, d), 7.45(2H, d), 7.44(2H, d), 7.29(2H, d), 7.13

(2H,d), 7.08 (2H,d), 5.68 (1H,d), 4.63 (1H,d), 4.54 (1H,dd), 4.44 (1H,d), 4.43 (1H,d), 4.38 (1H,d), 4.32 (1H,d), 4.14 (1H,d), 3.51 (1H,d), 3.48 (1H,d), 2.42 (3H,s), 1.29 (3H,s), 1.27 (3H,s) .

[0139] <化合物5A的结晶的物性测定>

[0140] 关于上述获得的化合物5A的结晶,测定了下述(1)~(4)的物性。

[0141] (1)晶形的显微镜观察

[0142] 用数字显微镜观察了化合物5A的结晶的晶形。所使用的数字显微镜使用了Dino-Lite AD-4113ZT(AnMo Electronics Corporation社制),观察倍率使用了230倍。

[0143] (2)粉末X射线分析

[0144] 将化合物5A的结晶供于粉末X射线分析。所使用的粉末X射线分析机为スペクトリス株式会社制,分析条件如以下那样。

[0145] [X射线解析装置]X'Pert PRO MPD(スペクトリス株式会社)

[0146] [靶]Cu

[0147] [X射线管电流]40mA

[0148] [X射线管电压]45kV

[0149] [扫描范围] $2\theta=4.0\sim 40^\circ$

[0150] 将测定的结果示于图2中。

[0151] 化合物5A在图2所示的衍射角( $2\theta$ )附近显示特征性峰。

[0152] (3)热重测定/差示热分析(TG/DTA)

[0153] 将化合物5A的结晶供于热重测定/差示热分析(TG/DTA)。所使用的热重测定/差示热分析(TG/DTA)机为热分析装置STA7200(日立ハイテクサイエンス社制),分析条件如以下那样。

[0154] 分析条件:在30~190℃的范围每1分钟升温各5℃,测定了试样的热量变化。作为对照,使用了氧化铝。

[0155] 将测定的结果示于图3中。

[0156] 化合物5A的结晶在124℃显示吸热峰。

[0157] (4)稳定性的加速试验

[0158] 将化合物5A的结晶供于稳定性的加速试验。该加速试验的条件如以下那样。

[0159] 取化合物5A的结晶50mg到玻璃制样品瓶中,在80℃下加热7天。将试样1mg溶解于5mM三乙基铵乙酸盐-70体积%乙腈1mL,通过高效液相色谱测定了纯度。

[0160] 此外,作为比较对象,将化合物5A的乙腈溶液在相同条件下供于加速试验。将化合物5A的结晶10mg溶解于乙腈1mL,在80℃下加热7天。将试样溶液用5mM三乙基铵乙酸盐-70体积%乙腈稀释为10倍,通过高效液相色谱测定了纯度。

[0161] 将结果示于图4中。

[0162] 化合物5A在80℃、7天加热条件下,对于溶液状态,纯度减少到35%,与此相对,对于结晶状态,几乎不发生分解。

[0163] 因此可知,化合物5A只要在结晶状态下保存,即使在不进行特别的管理的情况下,也能够稳定地长期保存。另一方面可知,即使为化合物5A,也与现有的交联型核苷中间体的合成法相同,对于溶液状态,不能长期稳定地保存中间体。

[0164] <本公开的工序2与非专利文献3所记载的工序的比较>

[0165] 将通过上述方法而获得的化合物3A的结晶、与在非专利文献3所记载的条件下合成的式c所示的化合物的溶液的性状进行了比较。

[0166] 从式b化合物获得式c化合物的工序

[0167] 按照非专利文献3所记载的方法,从式b所示的化合物制造出式c所示的化合物。

[0168] 使用TLC,确认了杂质的生成量。TLC的条件如下那样。

[0169] TLC板:Merck社制TLC Silica gel 60F<sub>254</sub>

[0170] 展开溶剂:己烷:乙酸乙酯=2:1(体积比)

[0171] 将化合物3A的结晶的TLC的结果记载于图5(i),将非专利文献3所记载的式c所示的化合物的溶液的TLC结果记载于图5(ii)。

[0172] 确认了如果通过上述方法合成化合物3A,则随着反应的进行,目标物质结晶析出,仅将其过滤,不进行色谱操作,就可获得纯度高的化合物3A。

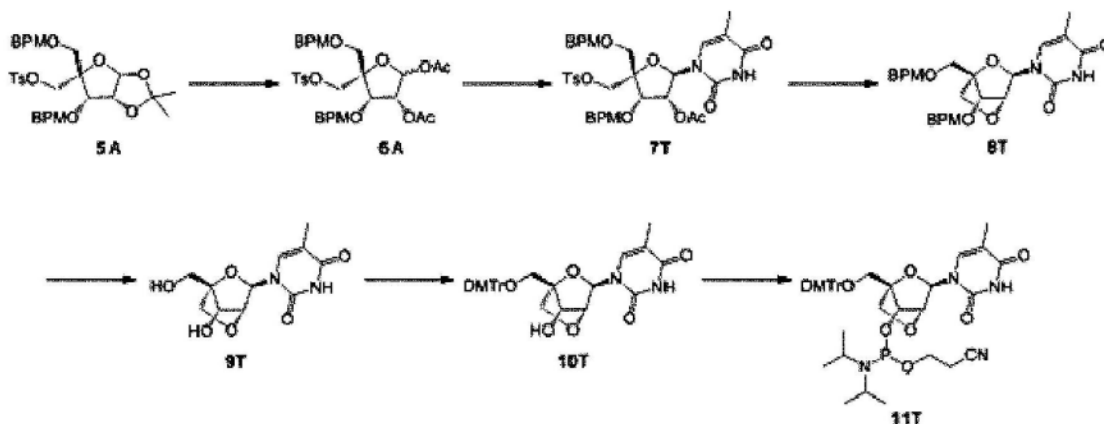
[0173] 与此相对,对于在非专利文献3所记载的条件下合成的式c所示的化合物的反应混合液,除了式c所示的化合物以外还观察到副产物的生成。明确了式c所示的化合物由于为非结晶性,因此在为了除去该副产物而进行进一步精制的情况下,需要色谱操作。

[0174] (实施例2)

[0175] 使用在实施例1中制造的化合物5A作为原料,制造出胸腺嘧啶、腺嘌呤、5-甲基胞嘧啶、鸟嘌呤的各种交联型核苷亚磷酰胺。

[0176] (实施例2-1) 胸腺嘧啶交联型核苷亚磷酰胺的制造

[0177] 从化合物5A合成出胸腺嘧啶交联型核苷亚磷酰胺11T。



[0179] 从化合物5A获得化合物6A(式6所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基)的工序

[0180] 将化合物5A(33.10g, 59.51mmol)悬浮于乙酸(366mL)、乙酸酐(45.0mL),加入硫酸(0.393mL)的乙酸溶液(30.0mL),在室温下搅拌2小时。在反应液中添加乙酸钠(1.50g)进行搅拌后,进行浓缩,将残渣用甲苯共沸5次。在残渣中加入乙酸乙酯,用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩,获得了化合物6A。

[0181] 从化合物6A获得化合物7T(式7所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基,碱=胸腺嘧啶)的工序

[0182] 在化合物6A、胸腺嘧啶(7.96g, 63.1mmol)、N,O-双(三甲基甲硅烷基)乙酰胺(33.9mL, 0.139mol)中加入乙腈(105mL),在85℃下搅拌1小时。将反应液冷却到0℃后,加入



三氟甲磺酸三甲基硅酯 (9.89mL, 54.7mmol), 在85℃下搅拌4小时。将反应液冷却到0℃后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液进行了搅拌。将析出的固体通过硅藻土过滤而除去后, 用乙酸乙酯提取 (如果将乙酸乙酯层用1M氢氧化钠水溶液, 接着用饱和氯化铵水溶液洗涤, 则能够除去残存的胸腺嘧啶)。将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩, 获得了化合物7T。

[0183] 从化合物7T获得化合物8T (式8所示的化合物, R<sup>1</sup>=4-溴苄基, 碱=胸腺嘧啶) 的工序

[0184] 在化合物7T中加入甲醇 (211mL), 加入氢氧化钠 (8.42g, 0.211mol), 在40℃下搅拌3小时。在反应液中加入饱和氯化铵水溶液, 用乙酸乙酯提取。将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩后, 在残渣中加入乙醇 (150mL), 添加乙酸乙酯直到溶解。在减压下, 将乙酸乙酯蒸馏除去, 滤取析出的固体, 用乙醇洗涤。将所得的固体真空干燥, 获得了化合物8T (20.00g, 32.88mmol, 78.1%)。

[0185] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz); δ8.39 (1H, s), 7.49 (2H, d), 7.46 (2H, d), 7.46 (1H, d), 7.18 (2H, d), 7.14 (2H, d), 5.64 (1H, s), 4.62-4.45 (5H, m), 4.02-3.78 (5H, m), 1.70 (3H, d)。

[0186] 从化合物8T获得化合物9T (式9所示的化合物, 碱=胸腺嘧啶) 的工序

[0187] 将化合物8T (7.13g, 11.7mmol)、甲酸铵 (7.56g, 0.12mol) 溶解于甲醇 (120mL)、乙酸乙酯 (120mL), 加入20质量% 氢氧化钯-活性炭 (20质量% Pd, 50质量% 含水) (3.57g), 在60℃下搅拌4小时。将催化剂通过硅藻土过滤而除去后, 将滤液浓缩, 通过硅胶柱色谱 (硅胶150mL, 氯仿: 甲醇=10:1 (体积比)) 进行精制, 获得了化合物9T (3.22g, 11.9mmol, 102%)。

[0188] <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400MHz); δ7.66 (1H, s), 5.67 (1H, s), 4.49 (1H, s), 4.22 (1H, s), 4.05-4.03 (3H, m), 3.96 (1H, d), 1.91 (3H, s)。

[0189] 从化合物9T获得化合物10T的工序

[0190] 将化合物9T (4.23g, 15.7mmol) 溶解于吡啶 (脱水, 52.3mL), 加入二甲氧基三苯甲基氯 (7.45g, 22.0mmol), 在室温下搅拌4小时。在反应液中加入甲醇 (5mL) 进行搅拌后, 进行了浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤后, 将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩。将残渣用甲苯共沸3次后, 通过硅胶柱色谱 (硅胶250mL, 己烷: 乙酸乙酯=1:1~1:2 (体积比) ~ 乙酸乙酯) 进行精制, 获得了化合物10T (8.99g, 15.7mmol, 100%)。

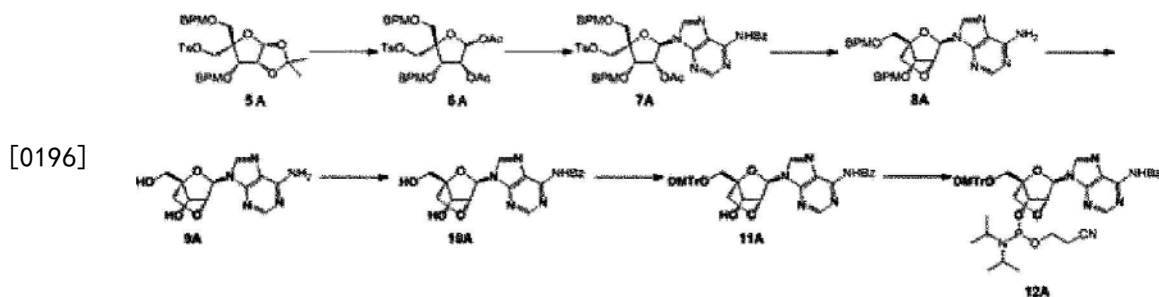
[0191] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz); δ8.54 (1H, s), 7.65-6.84 (14H, m), 5.63 (1H, s), 4.43 (1H, s), 4.28 (1H, d), 3.88 (2H, d), 3.81 (2H, d), 3.80 (6H, s), 3.58 (2H, d), 3.47 (2H, d), 2.31 (1H, d), 1.70 (3H, s)。

[0192] 从化合物10T获得化合物11T的工序

[0193] 将化合物10T (4.50g, 7.86mmol)、N,N-二异丙基乙基胺 (3.86mL, 17.3mmol) 溶解于二氯甲烷 (脱水, 39.3mL), 冷却到0℃。加入2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺 (3.86mL, 17.3mmol), 在室温下搅拌1小时。将反应液用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤后, 将有机层在无水硫酸镁上干燥、浓缩。将残渣通过硅胶柱色谱 (硅胶200mL, 己烷: 乙酸乙酯=1:1 (体积比)) 进行精制, 获得了化合物11T (6.00g, 7.76mmol, 98.7%)。

[0194] <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 160MHz); δ149.94, 149.80。

[0195] (实施例2-2) 腺嘌呤交联型核苷亚磷酰胺的制造



[0197] 从化合物5A获得化合物6A(式6所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基)的工序

[0198] 将化合物5A(24.0g, 33.7mmol) 悬浮于乙酸(340mL, 0.1mol/L), 一边在室温下搅拌一边依次加入乙酸酐(35mL, 262mmol)、硫酸(0.32mL, 6.07mmol)的乙酸溶液(371mL), 在相同温度下搅拌3小时。在反应结束后, 在相同温度下加入乙酸钠(1.2g, 14.5mmol)后, 在相同温度下搅拌5分钟后, 进行了浓缩。将残渣用甲苯(340mL)共沸3次。使所得的残渣溶解于乙酸乙酯(400mL)后, 实施采用饱和碳酸氢钠水(100mL)的洗涤3次。对水层进行了采用乙酸乙酯(400mL)的提取1次后, 合并所得的全部有机层, 依次进行采用硫酸镁的干燥和溶剂的减压蒸馏除去, 获得了化合物6A。

[0199] 从化合物6A获得化合物7A(式7所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基, 碱= $N^6$ -苯甲酰腺嘌呤)的工序

[0200] 在化合物6A、 $N^6$ -苯甲酰腺嘌呤(12.1g, 50.6mmol)中加入甲苯(85mL, 0.4mol/L)后, 一边在室温下搅拌一边加入N, O-双(三甲基甲硅烷基)乙酰胺(25mL, 101mmol), 在加热回流下搅拌1小时。接着, 在降温到0℃后, 在相同温度下添加三氟甲磺酸三甲基硅酯(7.9mL, 43.8mmol), 在加热回流下搅拌2小时。反应结束后, 在0℃下加入乙酸乙酯(300mL)和1mol/L氢氧化钠水溶液(100mL), 在相同温度下搅拌5分钟。接着, 将析出的固体通过过滤而除去后, 进行了有机层与水层的分离。将所得的有机层用1mol/L氢氧化钠水溶液(50mL)洗涤3次后, 依次进行采用硫酸镁的干燥和溶剂的减压蒸馏除去, 获得了化合物7A。

[0201] 从化合物7A获得化合物8A(式8所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基, 碱=腺嘌呤)的工序

[0202] 对化合物7A加入甲醇:四氢呋喃(9:1(体积比), 170mL)后, 加入氢氧化钠(6.7g, 169mmol), 在40℃下搅拌1小时。在反应结束后, 在相同温度下加入饱和氯化铵水溶液(170mL)后, 在相同温度下搅拌5分钟。接着, 加入乙酸乙酯(200mL)进行搅拌后, 将析出的固体通过过滤而除去。在滤液的浓缩后, 使残渣溶解于乙酸乙酯(400mL)后, 进行了有机层与水层的分离。对所得的有机层进行了采用去离子水(100mL)的洗涤1次后, 依次进行采用硫酸镁的干燥和溶剂的减压蒸馏除去。对所得的残渣加入甲醇(67mL, 0.5mol/L), 在加热回流下搅拌从而使残渣完全溶解。然后, 降温到室温, 搅拌过夜, 将析出的结晶回收。将所得的结晶用甲醇(20mL)洗涤2次, 获得了化合物8A(14.3g, 23.2mmol, 68.7%)。

[0203]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz);  $\delta$  8.33(1H, s), 7.99(1H, s), 7.47(2H, d), 7.41(2H, d), 7.18(2H, d), 7.10(2H, d), 6.03(1H, s), 5.63(2H, brs), 4.87(1H, s), 4.58(1H, d), 4.57(2H, dd), 4.48(1H, d), 4.26(1H, s), 4.11(1H, d), 3.99(1H, d), 3.81(2H, dd)。

[0204] 从化合物8A获得化合物9A(式9所示的化合物, 碱=腺嘌呤)的工序

[0205] 对化合物8A(14.3g, 23.2mmol)加入乙酸乙酯:甲醇(1:3(体积比), 600mL)后, 加入

甲酸铵 (21.9g, 348mmol) 和去离子水 (37mL), 在60℃下搅拌直到溶解。然后, 在室温下加入氢氧化钡-活性炭 (2.9g), 在60℃下搅拌17小时。接着, 追加甲酸铵 (7.3g, 116mmol) 和氢氧化钡-活性炭 (0.7g), 在60℃下搅拌24小时。在反应结束后, 通过硅藻土过滤将催化剂除去后, 进行溶剂的减压蒸馏除去, 获得了化合物9A。

[0206] 从化合物9A获得化合物10A(式10所示的化合物, 碱(R<sup>3</sup>) = N<sup>6</sup>-苯甲酰腺嘌呤)的工序

[0207] 对进行了共沸脱水(吡啶100mL, 3次)的化合物9A加入吡啶 (116mL, 0.2mol/L) 后, 在0℃下加入氯三甲基硅烷 (20.6mL, 162mmol), 在相同温度下搅拌30分钟。接下来, 在相同温度下添加苯甲酰氯 (13.5mL, 116mmol), 搅拌21小时。接着添加甲醇 (116mL) 后, 在室温下搅拌5分钟, 然后, 加入氨水 (34mL), 在相同温度下搅拌2.5小时。在反应结束后, 将析出的固体通过过滤而除去后, 将溶剂减压蒸馏除去。然后, 添加吡啶 (100mL), 搅拌5分钟后, 将未溶解的固体通过过滤而除去。将溶剂减压蒸馏除去, 获得了化合物10A。

[0208] 从化合物10A获得化合物11A的工序

[0209] 对进行了共沸脱水(吡啶70mL, 3次)的化合物10A加入吡啶 (77mL, 0.3mol/L) 后, 一边在室温下搅拌一边加入二甲氧基三苯甲基氯 (9.6g, 28.2mmol), 在相同温度下搅拌1小时。接着, 加入二甲氧基三苯甲基氯 (11.8g, 34.8mmol), 搅拌12小时。在反应结束后, 加入甲醇 (80mL), 在相同温度下搅拌5分钟后, 进行了溶剂的减压蒸馏除去。使所得的残渣溶解于乙酸乙酯 (320mL) 后, 实施采用去离子水 (80mL) 的洗涤1次。依次进行了采用硫酸镁的干燥和溶剂的减压蒸馏除去后, 通过中压硅胶柱色谱 (SiO<sub>2</sub> 100g, 乙酸乙酯: 己烷 = 66:34 (体积比) ~ 乙酸乙酯) 进行精制, 获得了化合物11A (9.41g, 13.7mmol, 59.1%)。

[0210] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz); δ9.10 (1H, s), 8.77 (1H, s), 8.28 (1H, s), 8.02 (2H, d), 7.63-7.21 (12H, m), 6.85 (4H, d), 6.13 (1H, s), 4.44 (1H, d), 4.04 (2H, s), 3.61 (1H, d), 3.56 (1H, d), 2.65 (1H, d)。

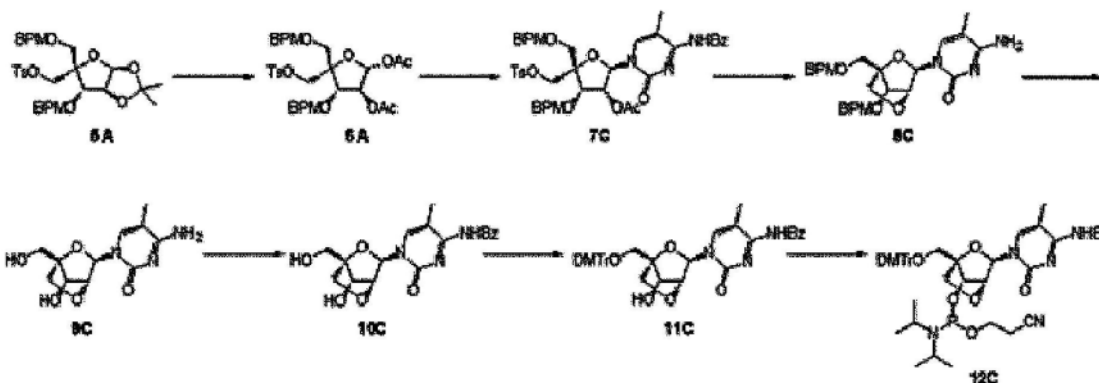
[0211] 从化合物11A获得化合物12A的工序

[0212] 对进行了共沸脱水(甲苯70mL, 3次)的化合物11A (9.41g, 13.7mmol) 依次加入二氯甲烷 (70mL) 和N,N-二异丙基乙基胺 (6.0mL, 34.3mmol) 后, 一边在0℃下搅拌一边加入(2-氰基乙基) (N,N-二异丙基) 氯代亚磷酰胺 (6.7mL, 30.1mmol), 在室温下搅拌2.5小时。在反应结束后, 在0℃下加入饱和碳酸氢钠水 (50mL), 在相同温度下搅拌5分钟后, 进行了有机层与水层的分离。对水层进行了采用乙酸乙酯 (70mL) 的提取1次后, 合并所得的全部有机层, 依次进行了采用硫酸镁的干燥和溶剂的减压蒸馏除去。然后, 通过中压硅胶柱色谱 (SiO<sub>2</sub> 100g, 乙酸乙酯: 己烷 = 69:31 ~ 90:10 (体积比)) 进行精制, 获得了化合物12A (9.4g, 10.6mmol, 77.0%)。

[0213] <sup>31</sup>P-NMR (MeCN-d<sub>3</sub>, 160MHz); δ149.54, 149.04。

[0214] (实施例2-3) 5-甲基胞嘧啶交联型核苷亚磷酰胺的制造

[0215] 从化合物5A合成出5-甲基胞嘧啶交联型核苷亚磷酰胺12C。



[0216]

[0217] 从化合物5A获得化合物6A(式6所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基)的工序

[0218] 将化合物5A(30.0g, 42.1mmol) 悬浮于乙酸(366mL)、乙酸酐(45.0mL), 慢慢地滴加浓硫酸(396 $\mu$ L)的乙酸溶液(30.0mL)后, 在室温下搅拌2小时。在反应液中加入乙酸钠(1.50g, 18.3mmol), 搅拌直到完全溶解后, 进行了浓缩。将残渣用甲苯-乙酸乙酯(以体积比为2:1)共沸(40mL $\times$ 5)后, 在残渣中加入乙酸乙酯(300mL), 用饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后, 进行了浓缩。将残渣用甲苯共沸(20mL $\times$ 3), 获得了化合物6A。

[0219] 从化合物6A获得化合物7C(式7所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基,  $R^2=4$ -甲苯磺酰氧基, 碱= $N^4$ -苯甲酰-5-甲基胞嘧啶)的工序

[0220] 将化合物6A溶解于乙腈(超脱水)(105mL), 加入 $N^4$ -苯甲酰-5-甲基胞嘧啶(12.7g, 55.4mmol)、N,O-双(三甲基甲硅烷基)乙酰胺(29.8mL, 0.122mol), 在85 $^{\circ}$ C下加热搅拌1小时。将反应液用冰冷却后, 加入三氟甲磺酸三甲基硅酯(11.4mL, 63.1mmol), 在85 $^{\circ}$ C下加热搅拌8小时。将反应液用冰冷却后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液(150mL), 搅拌直到发泡平息。用乙酸乙酯(150mL)提取, 将有机层在无水硫酸镁上干燥后, 进行浓缩, 获得了化合物7C。

[0221] 从化合物7C获得化合物8C(式8所示的化合物,  $R^1=4$ -溴苄基, 碱=5-甲基胞嘧啶)的工序

[0222] 将化合物7C溶解于四氢呋喃(21mL), 加入甲醇(211mL)、氢氧化钠(8.42g, 0.211mol), 在40 $^{\circ}$ C下加热搅拌14小时。将反应液浓缩直到少量后, 用乙酸乙酯(200mL)稀释, 用1mol/L盐酸(100mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(100mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后, 进行了浓缩。将残渣溶解于丙酮(30mL), 添加去离子水(15mL)。加入丙酮直到溶液变得透明后, 滤取析出的固体。将固体用50体积%乙醇洗涤后, 进行真空干燥, 获得了化合物8C(18.71g, 30.81mmol, 73.17%)。

[0223]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz);  $\delta$ 8.54(1H, s), 7.50-7.42(5H, m), 7.19-7.11(4H, m), 5.71(1H, s), 4.71(1H, s), 4.60-4.52(3H, m), 4.38(1H, d), 4.00(1H, d), 3.87-3.79(4H, m), 3.71(2H, s), 1.67(3H, d)。

[0224] 从化合物8C获得化合物9C(式9所示的化合物, 碱=5-甲基胞嘧啶)的工序

[0225] 将化合物8C(16.07g, 26.46mmol) 溶解于四氢呋喃(142mL)、甲醇(142mL), 加入甲酸铵(16.8g, 0.266mol), 进行了溶解。加入1mol/L盐酸(26.4mL, 26.4mmol)、氢氧化钡-活性炭(8.04g), 在60 $^{\circ}$ C下加热搅拌23小时。加入去离子水(27mL), 将析出物溶解后, 通过硅藻土过滤将氢氧化钡-活性炭除去, 用50体积%甲醇(100mL $\times$ 5)洗涤。将滤液、洗涤液浓缩, 将残

渣溶解于去离子水(100mL),使其吸附于Dowex50W×8(H<sup>+</sup>型)柱(60mL)。将柱水洗后,用0.2-0.5mol/L氨水溶出。将包含目标物质的级分(fraction)浓缩后,进行真空干燥,获得了化合物9C(6.83g,25.4mmol,96.0%)。

[0226] <sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O,400MHz);δ7.62(1H,s),5.66(1H,s),4.46(1H,s),4.19(1H,s),4.04(1H,d),4.04(2H,s),3.96(1H,d),1.98(3H,s)。

[0227] 从化合物9C获得化合物10C(式10所示的化合物,碱(R<sup>3</sup>)=N<sup>4</sup>-苯甲酰-5-甲基胞嘧啶)的工序

[0228] 将化合物9C(9.15g,34.0mmol)溶解于吡啶(脱水)(118mL),加入苯甲酸酐(15.4g,68.1mmol),在室温下搅拌3天。在反应液中加入乙醇(116mL)、2mol/L氢氧化钠水溶液(174mL,0.348mol),搅拌1小时后,添加乙酸(23mL)。将反应液浓缩后,将残渣用去离子水共沸2次。将残渣溶解于去离子水(25mL),滤取析出的固体,进行了水洗。将所得的固体由去离子水再结晶化,获得了化合物10C(10.19g,27.29mmol,80.3%)。

[0229] <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,400MHz);δ8.15-7.45(6H,m),5.67(1H,d),5.46(1H,s),5.22(1H,t),4.17(1H,s),3.90(1H,d),3.83-3.63(4H,m),2.00(3H,s)。

[0230] 从化合物10C获得化合物11C的工序

[0231] 将化合物10C(7.00g,18.7mmol)用吡啶共沸3次后,溶解于吡啶(脱水)(62.3mL)。加入二甲氧基三苯甲基氯(8.24g,24.3mmol),在室温下搅拌2小时后,在反应液中加入甲醇(5mL)进行浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯(200mL),用饱和碳酸氢钠水溶液(50mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后,进行浓缩,将残渣用甲苯(20mL×3)共沸。将残渣在以下条件下通过中压硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>100g,己烷:乙酸乙酯=2:1~1:1~1:3(体积比))进行精制,获得了化合物11C(12.14g,18.00mmol,96.26%)。

[0232] <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>,400MHz);δ8.32(2H,d),7.83(1H,s),7.55-7.25(12H,m),6.89-6.85(4H,m),5.70(1H,s),4.47(1H,s),4.29(1H,d),3.85(2H,dd),3.81(6H,s),3.62(1H,d),3.48(1H,d),1.90(3H,s),1.86(1H,d)。

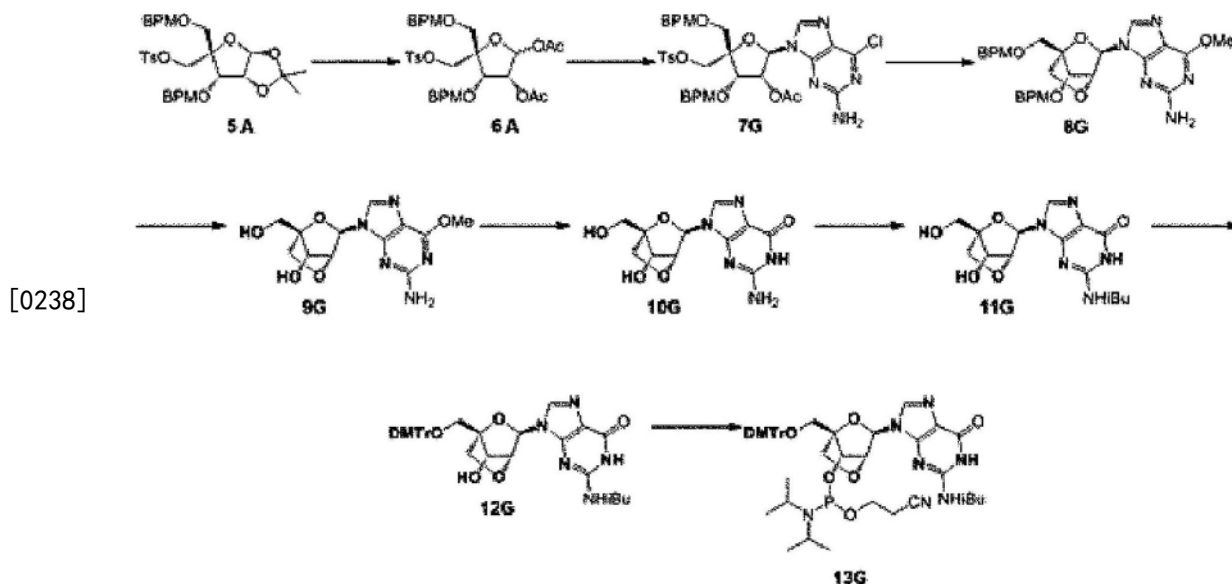
[0233] 从化合物11C获得化合物12C的工序

[0234] 将化合物11C(11.50g,17.02mmol)溶解于二氯甲烷(超脱水)(85.1mL),加入N,N-二异丙基乙基胺(6.02mmol,35.2mmol)、(2-氰基乙基)(N,N-二异丙基)氯代亚磷酰胺(6.83mL,30.6mmol),在室温下搅拌2小时。将反应液用氯仿(100mL)稀释后,用饱和碳酸氢钠水溶液-饱和氯化钠水溶液(50mL+50mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后,进行了浓缩。将残渣在以下条件下通过中压硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>100g,己烷:乙酸乙酯=3:1~2:1~1:1(体积比))进行精制,获得了化合物12C(10.70g,12.22mmol,71.80%)。

[0235] <sup>31</sup>P-NMR(CDCl<sub>3</sub>,160MHz);δ150.10,150.04。

[0236] (实施例2-4)鸟嘌呤交联型核苷亚磷酰胺的制造

[0237] 从化合物5A合成出鸟嘌呤交联型核苷亚磷酰胺13G。



藻土过滤将氢氧化钡-活性炭除去,用甲醇(100mL×5)洗涤。将滤液、洗涤液浓缩后,将残渣溶解于去离子水(300mL),用甲苯洗涤。将溶液通过于IRA93(OH<sup>-</sup>型)柱(150mL),进行水洗后,进行浓缩,获得了化合物9G。

[0247] 从化合物9G获得化合物10G(式9所示的化合物,碱=鸟嘌呤)的工序

[0248] 将化合物9G溶解于100mM Tris-HCl(pH7.5)(420mL),加入腺苷脱氨酶(37μL,42units),在40℃下搅拌24小时。追加腺苷脱氨酶(37μL,42units),在该温度下进一步搅拌24小时。滤取析出的固体,水洗后,进行真空干燥,获得了化合物10G(8.50g,28.8mmol,68.4%)

[0249] <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,400MHz);δ10.63(1H,s),7.79(1H,s),6.56(2H,s),5.68-5.67(2H,m),5.03(1H,t),4.28(1H,s),4.14(1H,d),3.88(1H,d),3.77(2H,m),3.71(1H,d)。

[0250] 从化合物10G获得化合物11G(式(10)所示的化合物,碱(R<sup>3</sup>)=N<sup>2</sup>-异丁酰鸟嘌呤)的工序

[0251] 将化合物10G(600mg,2.03mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(脱水)(4.1mL),加入叔丁基氯二甲基硅烷(1.22g,8.09mmol),在室温下搅拌20小时。将反应液用乙酸乙酯稀释,水洗后,将有机层在无水硫酸镁上进行了干燥、浓缩。将残渣通过硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>100mL,氯仿:甲醇=20:1(体积比))进行精制。

[0252] 将残渣溶解于吡啶(8.0mL),加入冰冷化异丁酰氯(336μL,3.18mmol),在室温下搅拌20小时。加入去离子水进行搅拌后,将反应液浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯,用饱和碳酸氢钠水洗涤后,将有机层在无水硫酸镁上进行了干燥、浓缩。将残渣用甲苯共沸3次后,将残渣通过硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>100mL,氯仿:甲醇=50:1(体积比))进行精制。

[0253] 将残渣溶解于甲醇(10.0mL),加入酸性氟化氢铵(860mg,15.0mmol),在60℃下加热搅拌17小时。在反应液中加入硅胶将溶剂蒸馏除去后,通过硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>100mL,氯仿:甲醇=10:1~5:1(体积比))进行精制,获得了化合物11G(0.53g,1.5mmol,74%)。

[0254] <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,400MHz);δ12.11(1H,s),11.77(1H,s),8.09(1H,s),5.80(1H,s),5.73(1H,d),5.06(1H,t),4.37(1H,s),4.15(1H,d),3.92-3.72(4H,m),2.77(1H,m),1.12(6H,d)。

[0255] 从化合物11G获得化合物12G的工序

[0256] 将化合物11G(1.87g,5.12mmol)用吡啶共沸3次后,溶解于吡啶(脱水)(17.1mL)。加入二甲氧基三苯甲基氯(2.43g,7.17mmol),在室温下搅拌2小时后,在反应液中加入甲醇(1mL)进行浓缩。在残渣中加入乙酸乙酯(200mL),用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后,进行浓缩,将残渣用甲苯(20mL×3)共沸。将残渣通过硅胶柱色谱(SiO<sub>2</sub>150g,己烷:乙酸乙酯=1:1~1:3(体积比)~乙酸乙酯)进行精制,获得了化合物12G(3.27g,4.90mmol,95.7%)。

[0257] <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>,400MHz);δ12.05(1H,s),8.93(1H,s),7.88(1H,s),7.44-7.13(9H,m),6.79(4H,m),5.78(1H,s),4.60(1H,s),4.44(1H,s),4.05(1H,d),3.99(1H,d),3.74(3H,s),3.74(3H,s),3.61(1H,d),3.55(1H,d),2.64(1H,m),1.24(3H,d),1.23(3H,d)。

[0258] 从化合物12G获得化合物13G的工序

[0259] 将化合物12G(3.20g,4.79mmol)溶解于二氯甲烷(超脱水)(24.0mL),加入N,N-二异丙基乙基胺(2.03mL,11.9mmol)、(2-氰基乙基)(N,N-二异丙基)氯代亚磷酰胺(2.35mL,

10.5mmol), 在室温下搅拌3小时。将反应液用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥后, 进行了浓缩。将残渣通过硅胶柱色谱 ( $\text{SiO}_2$  200g, 己烷: 乙酸乙酯 = 1:1 ~ 1:2 (体积比)) 进行精制, 获得了化合物13G (3.36g, 3.87mmol, 80.8%)。

[0260]  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{MeCN-d}_3$ , 160MHz) ;  $\delta$  149.09, 148.74.



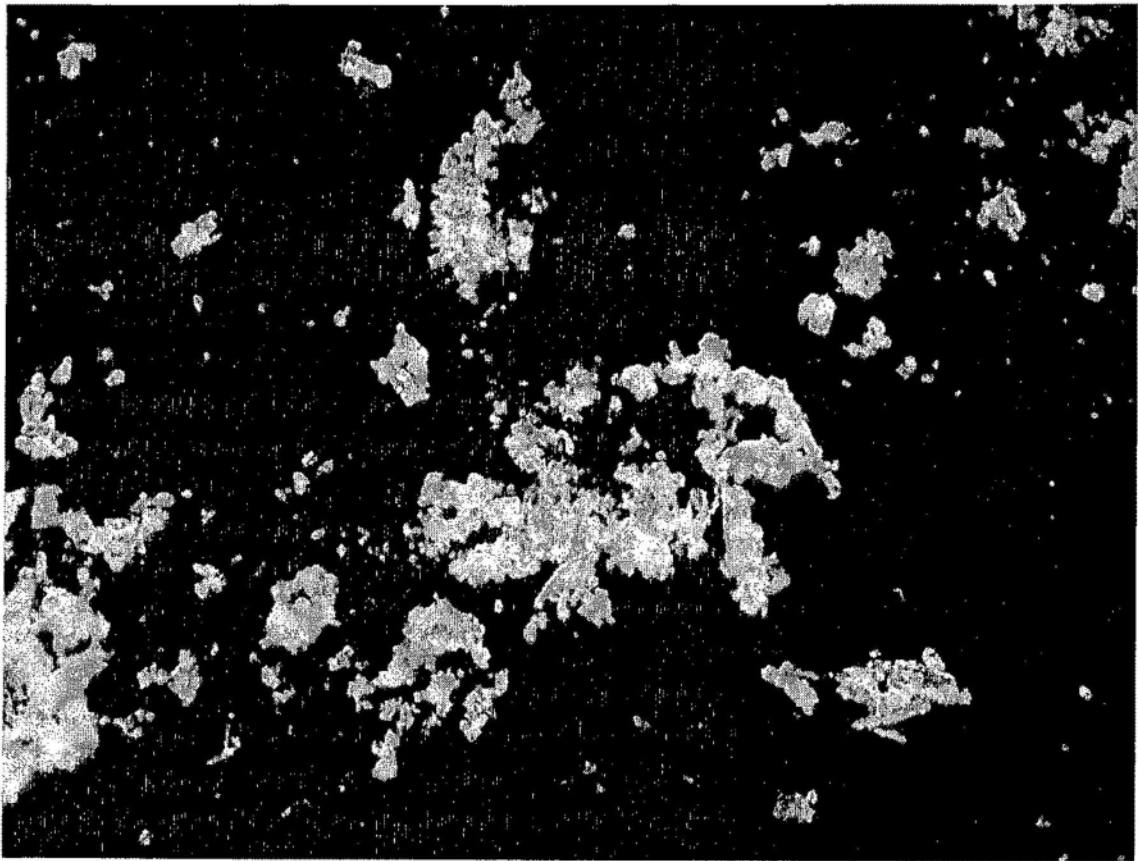


图1

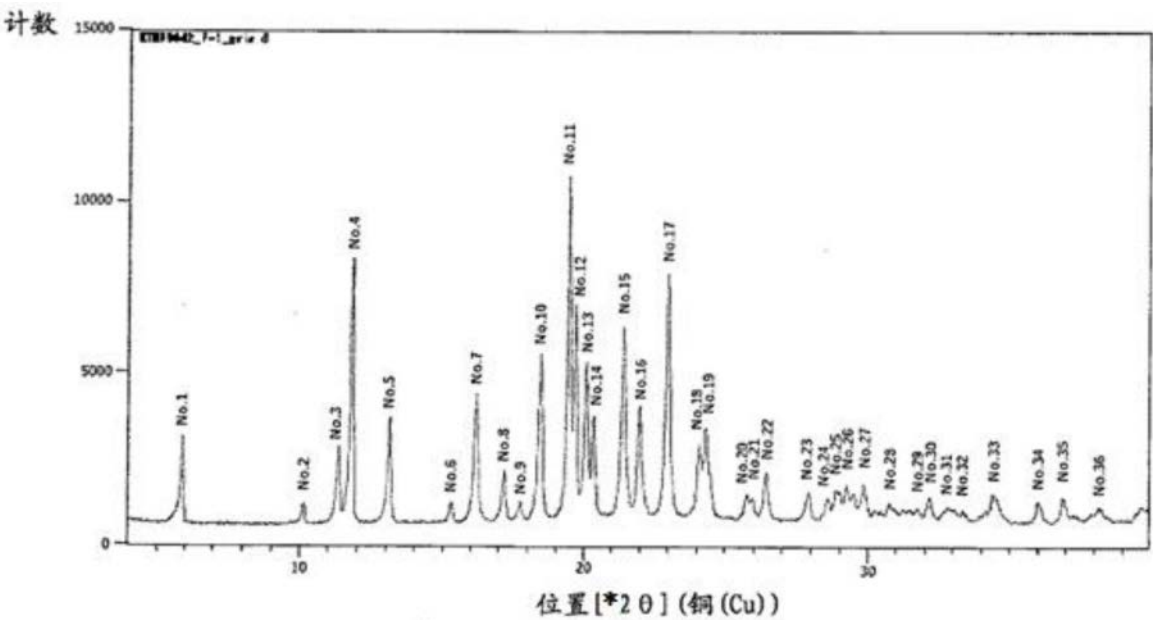


图2

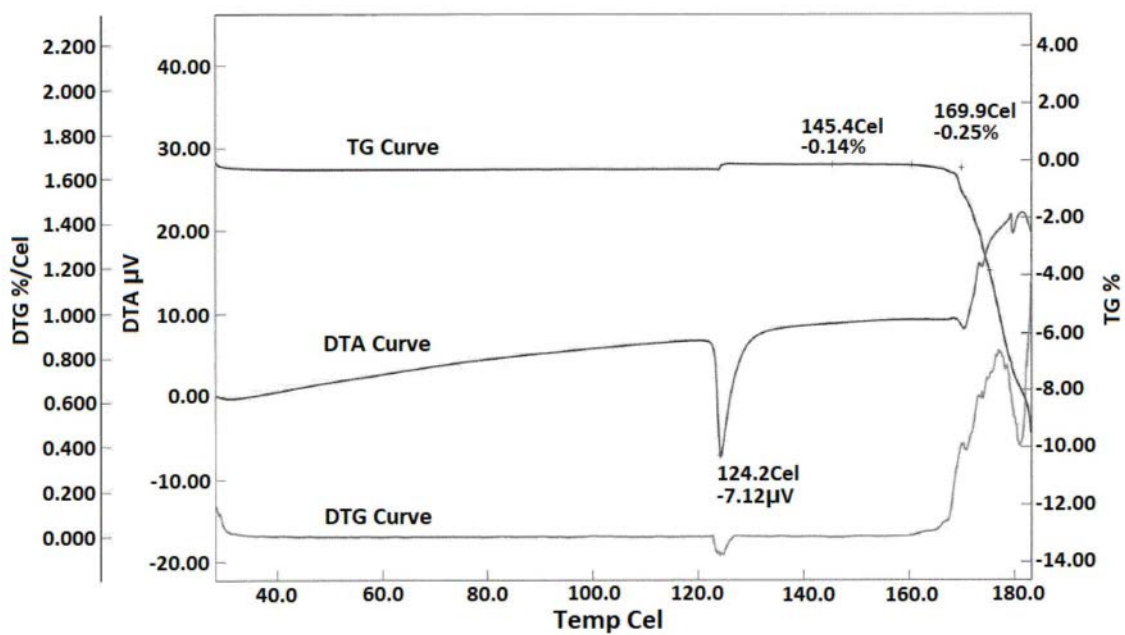


图3

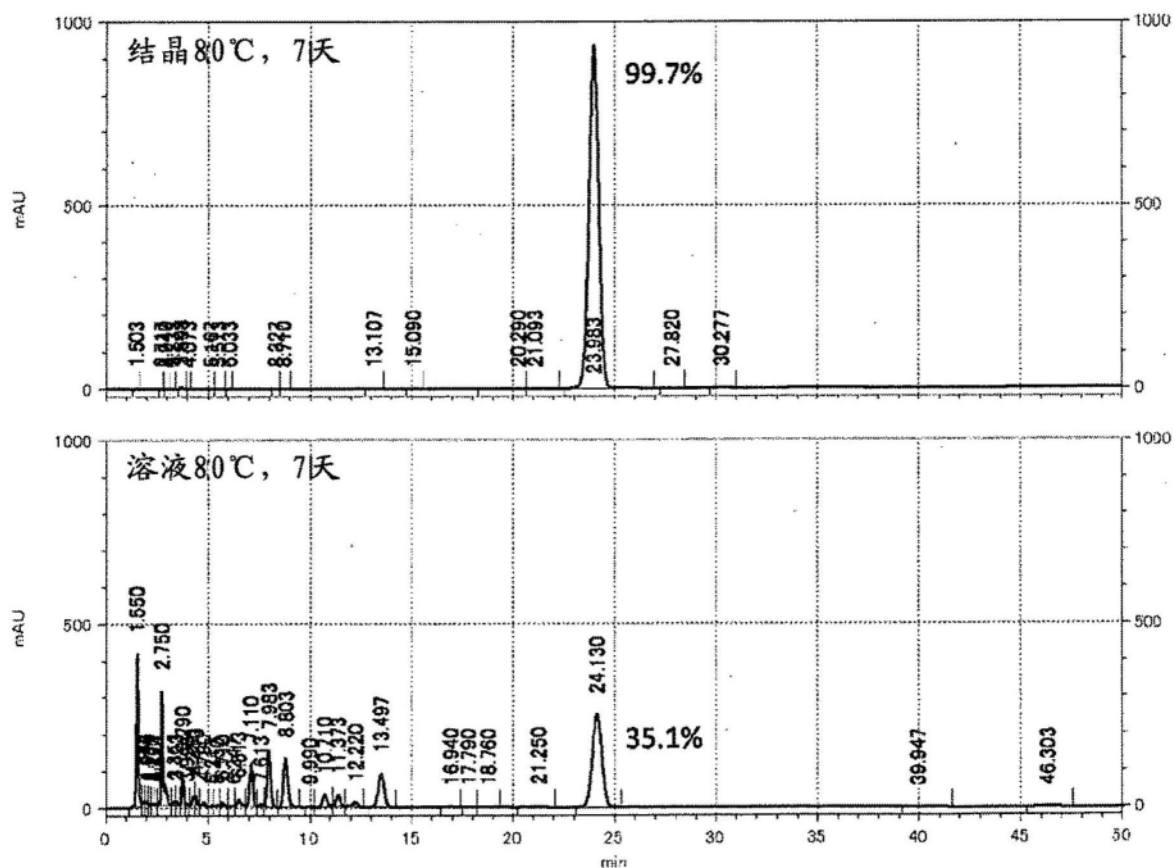
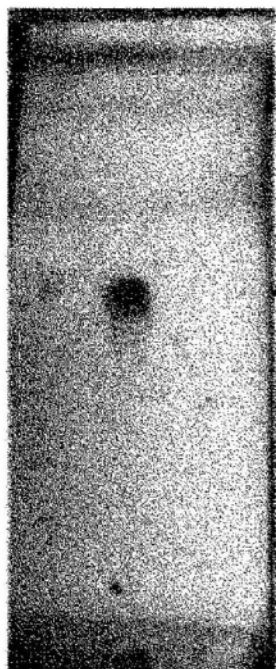


图4

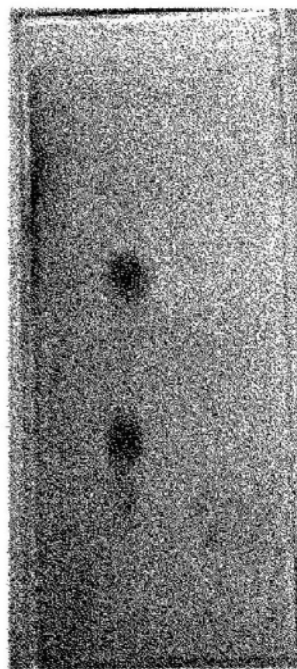
(i)



← 式3的化合物

通过工序2而获得的  
式3的化合物的  
结晶的溶解液

(ii)



← 式c的化合物

← 副产物

通过非专利文献3的  
方法而获得的式c的  
化合物的反应液

图5