(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6049760号
(P6049760)
(45)発行日　平成28年12月21日(2016.12.21)　(24)登録日　平成28年12月2日(2016.12.2)

(51)Int.Cl.		F I	
C07H 19/10	(2006.01)	C07H	19/10
A61P 11/10	(2006.01)	A61P	11/10
A61P 11/00	(2006.01)	A61P	11/00
A61P 27/02	(2006.01)	A61P	27/02
A61K 31/7084	(2006.01)	A61K	31/7084

請求項の数 8　(全 22 頁)　最終頁に続く

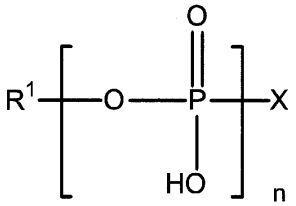
(21)出願番号　特願2014-554298 (P2014-554298)
(86)(22)出願日　平成25年12月10日 (2013.12.10)
(86)国際出願番号　PCT/JP2013/083100
(87)国際公開番号　WO2014/103704
(87)国際公開日　平成26年7月3日 (2014.7.3)
審査請求日　平成27年11月25日 (2015.11.25)
(31)優先権主張番号　特願2012-287578 (P2012-287578)
(32)優先日　平成24年12月28日 (2012.12.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000006770
ヤマサ醤油株式会社
千葉県銚子市新生町２丁目１０番地の１
(74)代理人　110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(74)代理人　100077562
弁理士　高野　登志雄
(74)代理人　100096736
弁理士　中嶋　俊夫
(74)代理人　100117156
弁理士　村田　正樹
(74)代理人　100111028
弁理士　山本　博人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｐ１，Ｐ４－ジ（ウリジン５’－）テトラホスフェートの製造法

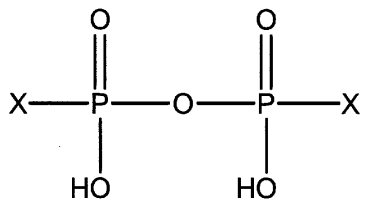
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記式［ＩＩ］または［ＩＩＩ］で示されるリン酸活性化合物と、ＵＭＰ、ＵＤＰ、ＵＴＰおよびピロリン酸から成る群より選択されるリン酸化合物またはその塩（ただしＵＴＰフリーを除く）とを、鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオン、３価アルミニウムイオン、３価ランタンイオンおよび３価セリウムイオンからなる群より選択される金属イオンの存在下、水または親水性有機溶媒中で反応させる工程を含むことを特徴とする、P^1，P^4－ジ（ウリジン５’－）テトラホスフェートの製造法。
【化１】



[II]

（式中、R^1は５’位で結合したウリジル基を示し；Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾリル基から成る群より選択される１つの複素環式基

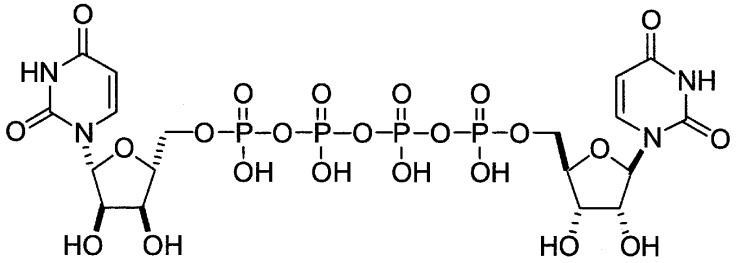
を示し；ｎは１または２の整数を示す。）
【化２】



[III]

（式中、Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾイル基から成る群より選択される１つの複素環式基を示す）
【請求項２】
リン酸活性化合物がＵＤＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＤＰまたはＵＤＰ塩である、請求項１記載の製造法。
【請求項３】
リン酸活性化合物がＵＭＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＴＰ塩である、請求項１記載の製造法。
【請求項４】
リン酸活性化合物がＵＭＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がピロリン酸またはピロリン酸塩である、請求項１記載の製造法。
【請求項５】
リン酸活性化合物がピロリン酸ジイミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＭＰまたはＵＭＰ塩である、請求項１記載の製造法。
【請求項６】
金属イオンが鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオンおよびアルミニウムイオンから成る群より選ばれる、請求項１～４のいずれか１項に記載の製造法。
【請求項７】
金属イオンが鉄（ＩＩＩ）イオンまたはアルミニウムイオンである、請求項５記載の製造法。
【請求項８】
金属イオンが、金属の塩化物、臭化物、硝酸化物、硫酸化物または酢酸化物の形態で供給される請求項１記載の製造法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はP^1，P^4－ジ（ウリジン５’－）テトラホスフェートの効率的な新規製造法に関する。
【背景技術】
【０００２】
下記式［Ｉ］で表されるP^1，P^4－ジ（ウリジン５’－）テトラホスフェート（以下「UP_4U」と表記する）またはその塩は、ドライアイに伴う角結膜上皮障害の治療薬として用いられている。また、痰排出誘導作用を有し、去痰剤または肺炎治療薬としての開発が期待されている化合物である。
【０００３】
従来、UP_4Uの合成法として、ウリジン５’－トリリン酸（ＵＴＰ）の脱水縮合反応により調製されるウリジン５’－環状トリリン酸とウリジン５’－モノリン酸（ＵＭＰ）とを反応させる方法（非特許文献１）及びその改良法（特許文献１）が報告されている。
【０００４】

【化１】



[I]

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】国際公開第２００８／０１２９４９号
【特許文献２】国際公開第２００８／０２４１６９号
【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】Ｂｉｏｏｒｇ．＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，ｖｏｌ．１１，１５７－１６０（２００１）
【非特許文献２】Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１１，Ｎｏ．９，７３０－７３８（２０１１）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
しかしながら、上記文献記載の従来技術は、以下の点で改善の余地を有していた。
【０００８】
第一に、特許文献１の方法では、実験室レベルでは８０％以上という高い収率でUP_4Uを合成できるが、該方法を工業的な規模で大量製造するには問題点があった。
具体的には、特許文献１の方法では、５’－ＵＴＰの５’－環状トリリン酸化反応を行うために、原料となるＵＴＰを、トリ－ｎ－ブチルアミンのような三級アミンの塩の形態で使用する必要がある。このため、ＵＴＰの３ナトリウム塩を事前にイオン交換カラムクロマトグラフィーにより遊離型のＵＴＰ（ＵＴＰフリー）とした後、三級アミンとの塩形成を行うという工程が必要であった。しかしながら後述する試験例でも検証しているように、ＵＴＰフリーは非常に不安定な物質であり、工業的な規模の大量製造においてＵＴＰフリーを原料として使用することは非常に困難である。
【０００９】
第二に、ＵＴＰの５’－環状トリリン酸化反応を効率的に合成するためには、反応直前にＵＴＰのトリ－ｎ－ブチルアミン塩を脱水状態にしておく必要がある。しかしながら後述する比較試験でも検証しているように、工業的規模の大量製造において、ＵＴＰのトリ－ｎ－ブチルアミン塩を共沸により脱水する場合、ＵＴＰの熱的な分解反応が起こるためにＵＴＰの純度が低下してしまい、結果として合成効率が低下してしまう。
【００１０】
このように、ＵＴＰを出発原料とする特許文献１の方法は、UP_4Uの工業的な大量製造に最適の方法と言えるものではない。そこで、本発明は、ＵＴＰフリーを使用しないことや、ウリジン５’－環状トリリン酸を合成するためのＵＴＰ塩の脱水操作を回避することにより、原料の分解による合成効率の低下を避けることができる新たな製造法の開発を目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１１】

特許文献１記載の合成法における問題点を回避する方法として、下記Ａ、Ｂに示す２つの方法が考えられるか、すでに知られている。
（Ａ）出発原料としてＵＴＰではなくＵＭＰを用い、反応系内でＵＭＰからＵＴＰを調製した後、これを精製することなく、特許文献１の方法に適用してＵＰ$_4$Ｕを合成する方法（以下「ワンポット合成法」）。
（Ｂ）ピロリン酸をイミダゾールによって活性化してピロリン酸ジイミダゾリドを合成し、これをＵＭＰと縮合させることによってＵＰ$_4$Ｕを合成する方法（以下「ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法」、特許文献２、非特許文献２）。

【００１２】

しかしながら、上記ワンポット合成法、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法は、いずれもＵＰ$_4$Ｕの合成反応の溶媒としてジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）などの有機溶媒を用い、無水環境下で行うものであった。一方、反応の原料に用いるＵＭＰ、ＵＴＰ、ピロリン酸等はいずれも親水性の高い化合物であり、これら原料を反応に供するためには各工程で脱水工程を経なければならなかった。特に、ピロリン酸塩は有機溶剤に対する溶解性も悪く、その取り扱いには注意が必要となるなどの問題があった。

【００１３】

また本発明者は、上記２つの改良合成法についてさらに検討を行った。まず、ワンポット合成法について詳細に検討したところ、後述する実施例に示すように、目的産物であるＵＰ$_4$Ｕの合成収率はおよそ４０％と、大きく低下してしまった。また、特許文献１の方法をワンポット合成法として実施した場合、様々な副生成物が生じることから、その分離のために複雑なカラムクロマトグラフィーによる精製が必要であることが判明した。

【００１４】

次に、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法についても、詳細な検討を行った。その結果、後述する実施例に示すように、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法においても副生成物を多く生じてしまうこと、最終産物であるＵＰ$_4$Ｕの対ＵＭＰ収率が十分に高いものとは到底言えないことを新たに見出した。すなわち、ワンポット合成法、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法のいずれも、工業規模でのＵＰ$_4$Ｕ大量生産に適した合成法とは言えないものであることが、明らかになった。

【００１５】

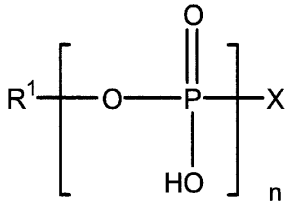
そこで本発明者は、工業的な大量製造に適したＵＰ$_4$Ｕの効率的合成法を確立すべく鋭意検討を重ねた結果、（ａ）ウリジン５’－ジリン酸（ＵＤＰ）、ＵＭＰまたはピロリン酸と、置換基を有しても良い、イミダゾール、ベンズイミダゾールまたは１，２，４－トリアゾールから成る群より選択される化合物とを縮合させることで合成されるリン酸活性化合物と、（ｂ）ＵＭＰ、ＵＤＰ、ＵＴＰおよびピロリン酸から成る群より選択されるリン酸化合物またはその塩（ただしＵＴＰフリーを除く）とを組み合わせ、触媒として、鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオン、３価アルミニウムイオン、３価ランタンイオン、３価セリウムイオンからなる群より選択される金属イオンの存在下、水または親水性有機溶媒中で反応させるという簡便な方法によって、ＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避でき、しかも副生成物が少なく、高い収率でもってＵＰ$_4$Ｕを合成できることを見出し、本発明を完成させた。

【００１６】

すなわち、本発明は、下記式［ＩＩ］または［ＩＩＩ］で示されるリン酸活性化合物と、ＵＭＰ、ＵＤＰ、ＵＴＰおよびピロリン酸から成る群より選択されるリン酸化合物またはその塩（ただしＵＴＰフリーを除く）とを鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオン、３価アルミニウムイオン、３価ランタンイオンおよび３価セリウムイオンからなる群より選択される金属イオンの存在下、水または親水性有機溶媒中で反応させる工程を含むことを特徴とする、Ｐ^1，Ｐ^4－ジ（ウリジン５’－）テトラホスフェートの製造法を提供するものである。

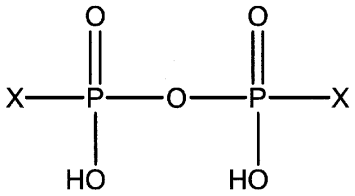
【００１７】

【化２】



[Ⅱ]

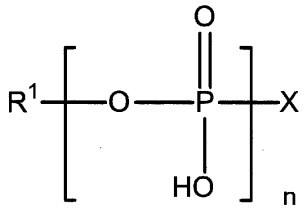
【００１８】
（式中、Ｒ^{1}は５’位で結合したウリジル基を示し；Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾリル基から成る群より選択される１つの複素環式基を示し；ｎは１または２の整数を示す。）
【００１９】
【化３】



[Ⅲ]

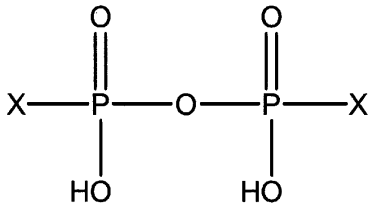
【００２０】
（式中、Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾリル基から成る群より選択される１つの複素環式基を示す）
【発明の効果】
【００２１】
本発明の製造方法では、ＵＰ$_4$Ｕの合成を、工業的な大量製造に適さないＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避しつつ、しかも収率よく行うことができる。また、本発明の製造方法では、副生成物がほとんど生成しないことから、合成したＵＰ$_4$Ｕの精製が容易である。さらに、親水性条件下で反応を行うことにより、煩雑な脱水工程を省略できる。すなわち、本発明の製造方法は、ＵＰ$_4$Ｕの工業的な大量合成にきわめて好適な方法である。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】本発明の方法でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、１０番のピークは目的生成物であるＵＰ$_4$Ｕ、６番のピークは原料であるＵＤＰを示す。
【図２】ワンポット合成法でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、１９番のピークは目的生成物であるＵＰ$_4$Ｕ、５番のピークは原料であるＵＭＰを示す。
【図３】本発明の方法でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、１６番のピークは目的生成物であるＵＰ$_4$Ｕ、６番のピークは原料であるＵＭＰを示す。
【図４】ピロリン酸イミダゾリド法旧法（触媒なし）でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、１７番のピークは目的生成物であるＵＰ$_4$Ｕ、５番のピークは原料であるＵＭＰを示す。

【図５】ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法（触媒ＺｎＣｌ$_2$）でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、１６番のピークは目的性生物であるＵＰ$_4$Ｕ、５番のピークは原料であるＵＭＰを示す。
【図６】ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法（触媒テトラゾール）でＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、反応液中の生成物を分析したＨＰＬＣチャートを示す。図中、２０番のピークは目的生成物であるＵＰ$_4$Ｕ、５番のピークは原料であるＵＭＰを示す。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。
【００２４】
＜リン酸活性化合物＞
本発明で使用するリン酸活性化合物は、式［ＩＩ］または［ＩＩＩ］で表される化合物であり、ＵＭＰ、ＵＤＰまたはピロリン酸と、置換基を有しても良い、イミダゾール、ベンズイミダゾールまたは１，２，４－トリアゾールとを縮合させることで合成される。
【００２５】
【化４】



［II］

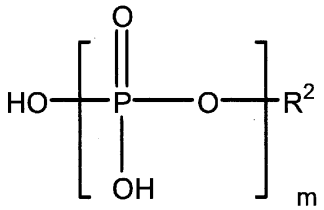
【００２６】
（式中、Ｒ^{1}は５’位で結合したウリジル基を示し；Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾリル基から成る群より選択される一つの複素環式基を示し；ｎは１または２の整数を示す。）
【００２７】
【化５】



［III］

【００２８】
（式中、Ｘはイミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基および１，２，４－トリアゾイル基から成る群より選択される１つの複素環置換基を示す）
【００２９】
Ｘで表される複素環置換基としては、イミダゾイル基、ベンズイミダゾイル基または１，２，４－トリアゾイル基等が挙げられる。また、これら複素環式基は、当該複素環式基中に置換基を有していてもよく、当該置換基としてはたとえばC_{1-6}アルキル基、ニトロ基、シアノ基等が挙げられる。

【００３０】
このようなリン酸活性化合物として、具体的にはＵＤＰ－リン酸イミダゾリド、ＵＤＰ－リン酸トリアゾリド、ＵＭＰ－リン酸イミダゾリドまたはピロリン酸ジイミダゾリド等が挙げられ、これらの化合物は既知の方法（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，ｖｏｌ．４，２８４３（１９７７）、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，ｖｏｌ．１２６，９５４８（２００４））に従って調製することができる。
【００３１】
Up_4Uの合成に当たっては、ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド、ＵＤＰ－リン酸トリアゾリド、ＵＭＰ－リン酸イミダゾリドまたはピロリン酸ジイミダゾリド等のリン酸活性化合物の合成液あるいはその濃縮液をそのまま、あるいは必要に応じて精製し、使用することができる。
【００３２】
＜リン酸化合物＞
本発明で使用するリン酸化合物は、下記式（ＩＶ）で表される化合物またはその塩であり、具体的には、ＵＴＰフリーを除く、ＵＭＰ、ＵＤＰ、ＵＴＰ、ピロリン酸、またはそれらの塩を挙げることができる。
【００３３】
【化６】



[Ⅳ]

【００３４】
（式中、R^2は、水素原子または５’位で結合したウリジル基を示し；ｍは１～３の整数を示す。）
【００３５】
当該リン酸化合物は、ナトリウムやカリウムなどのアルカリ金属塩、トリエチルアンモニウム、トリブチルアンモニウムなどの３級アンモニウム塩、テトラエチルアンモニウム塩やテトラブチルアンモニウムのような４級アンモニウム塩の形態で用いることができる。
【００３６】
＜原料化合物の組合せ＞
このようなリン酸活性化合物とリン酸化合物との原料化合物の組み合わせとしては、合目的的に決定すればよく、好ましくは以下の組み合わせで用いるのが好適である。
組み合わせ１：ＵＤＰ活性化合物とＵＤＰまたはＵＤＰ塩の組み合わせ
組み合わせ２：ＵＭＰ活性化合物とＵＴＰ塩の組み合わせ
組み合わせ３：ＵＭＰ活性化合物とピロリン酸またはピロリン酸塩の組み合わせ
組み合わせ４：ピロリン酸活性化合物と、ＵＭＰまたはＵＭＰ塩の組み合わせ。
いずれの組み合わせにおいても、縮合反応における、リン酸活性化合物とリン酸化合物とのモル比は、１：１０～１０：１の範囲に設定すれば、Up_4Uの収率が向上するため好ましい。もっとも、このモル比は、例えば、
（１）上記組み合わせ１のとき、モル比３：８、４：７、５：６、６：５、７：４、８：３、９：２、１０：１のいずれか、

（２）組み合わせ２のときにはモル比１：１０、２：９、３：８、４：７、５：６、６：５、７：４、８：３のいずれか、
（３）組み合わせ３のときには４：７、５：６、６：５、７：４、８：３、９：２、１０：１のいずれか、さらに、
（４）組み合わせ４のときには４：７、５：６、６：５、７：４、８：３、９：２、１０：１のいずれか、
であり、ここで例示した何れか２つの数値の範囲内であってもよい。

【００３７】

＜金属イオン＞

本発明に使用する金属イオンは、目的の金属イオンを含む金属塩の形態で溶液に添加することによって、水または親水性有機溶媒中で金属イオンとなり、反応系に供給することができる。金属塩の種類としては、金属ハロゲン化物、金属無機酸塩、金属有機酸塩等を提示することができる。さらなる具体例としては、（ｉ）金属ハロゲン化物の例として塩化第一鉄、塩化第二鉄、臭化第二鉄、三塩化アルミニウム、三塩化セリウム、三塩化ランタニウム等を、（ｉｉ）金属無機酸塩の例として鉄（２価）、鉄（３価）、アルミニウム、セリウム、ランタンから成る群より選択される金属の硫酸、硝酸、過塩素酸等の無機酸塩を、（ｉｉｉ）金属有機酸塩の例として、鉄（２価）、鉄（３価）、アルミニウム、セリウム、ランタンから成る群より選択される金属のトリフルオロメタンスルホン酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩等を用いることが、ＵＰ$_4$Ｕの収率が向上するため好ましい。中でも、合成収率および取り扱い易さの点で、第二鉄塩が好ましく、塩化第二鉄が特に好ましい。なお、用いる金属塩は、無水物であっても水和物であっても良い。ただし、上記リン酸活性化合物とリン酸化合物の組み合わせのうち、特に組み合わせ４の場合は、鉄（ＩＩＩ）イオン、３価アルミニウムイオン等を用いることが特に好ましい。

【００３８】

金属イオン源である金属塩は、ＵＰ$_4$Ｕの収率を向上させるためには、反応に用いるリン酸化合物の総モル数に対して０．００１～１０倍モル量とすることが好ましく、特に好ましくは０．００１～１倍モル量を使用できる。もっとも、この金属塩の量は、例えば反応に用いるリン酸化合物の総モル数に対して０．００１、０．００５、０．０１、０．０５、０．１、０．５、１倍モル量のいずれかであり、ここで例示した何れか２つの数値の範囲内であってもよい。

【００３９】

＜縮合反応・精製の条件＞

本発明におけるリン酸活性化合物とリン酸化合物との縮合反応は、水または親水性有機溶剤を溶媒として実施する。合成収率および取り扱い易さの点から、親水性有機溶剤としては、メタノール、エタノール等の炭素数６以下のアルコール類、アセトン等のケトン類、ジオキサン等のエーテル類、アセトニトリル等のニトリル類、ジメチルホルムアミド等のアミド類等を使用することができる。

【００４０】

この縮合反応においては、ＵＰ$_4$Ｕの収率を向上させるために、反応ｐＨは７以下であることが好ましく、特に好ましくはｐＨ１～４付近である。また、この縮合反応では、ＵＰ$_4$Ｕの収率を向上させるためには、反応温度は０℃～６０℃であることが好ましい。上記原料化合物の組み合わせにおいて、組み合わせ１～組み合わせ３の場合は、反応温度２０～３０℃であることが特に好ましく、組み合わせ４の場合は、反応温度０～２０℃であることが特に好ましい。この縮合反応の時間は、必要十分な縮合反応を行うためには、１～３６時間程度であることが好ましく、特に好ましくは２～２０時間である。

【００４１】

縮合反応終了後は、一般のヌクレオチドの単離精製に使用される方法（たとえば、結晶法、イオン交換カラムクロマトグラフィー、吸着カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィーなど）を適宜組み合わせることで、生成したＵＰ$_4$Ｕを分離精製することができ、必要に応じて塩型とすることもできる。

【００４２】
イオン交換カラムクロマトグラフィーで使用するイオン交換樹脂としては、強塩基性陰イオン交換樹脂（例えば、アンバーライトＩＲＡ４０２〔ローム＆ハース社製〕、ダイアイオンＰＡ－３１２、ダイアイオンＳＡ－１１Ａ〔三菱化学社製〕）、弱塩基性陰イオン交換樹脂（例えば、アンバーライトＩＲＡ６７〔ローム＆ハース社製〕、ダイアイオンＷＡ－３０〔三菱化学社製〕）、強酸性陽イオン交換樹脂（例えば、ダイアイオンＰＫ－２１６〔三菱化学社製〕）又は弱酸性陽イオン交換樹脂（ダイアイオンＷＫ－３０〔三菱化学社製〕）等を使用することができる。
【００４３】
活性炭としては、破砕状あるいは粒状に形成されたクロマト用活性炭を使用すればよく、例えば和光純薬工業社、二村化学工業社製等の市販品を使用できる。
【００４４】
また、結晶化には既知の方法を用いればよく、例えば、得られたUP_4U又はその塩に親水性有機溶媒を加えて、結晶を析出させることにより得られる。使用する親水性有機溶媒としては、メタノール、エタノール等の炭素数６以下のアルコール類、アセトン等のケトン類、ジオキサン等のエーテル類、アセトニトリル等のニトリル類、ジメチルホルムアミド等のアミド類を例示することができ、アルコール類が好ましく、さらにエタノールが特に好ましい。
【００４５】
＜本発明の作用効果＞
これまで説明したとおり、本発明では、（ａ）ウリジン５’－ジリン酸（ＵＤＰ）、ＵＭＰまたはピロリン酸と、置換基を有しても良い、イミダゾール、ベンズイミダゾールまたは１，２，４－トリアゾールから成る群より選択される化合物とを縮合させることで合成されるリン酸活性化合物と、（ｂ）ＵＭＰ、ＵＤＰ、ＵＴＰおよびピロリン酸から成る群より選択されるリン酸化合物またはその塩（ただしＵＴＰフリーを除く）とを組み合わせ、触媒として、鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオン、３価アルミニウムイオン、３価ランタンイオン、３価セリウムイオンからなる群より選択される金属イオンの存在下、水または親水性有機溶媒中で反応させるという方法を用いることによって、後述の実施例に示すように、簡便な工程でUP_4Uの工業的な大量製造を行うことができる。
【００４６】
一方で、既に説明したように、従来公知の特許文献１の方法では、実験室レベルでは８０％以上という高い収率でUP_4Uを合成できるが、該方法を工業的な規模で大量製造するには問題点があった。具体的には、特許文献１の方法では、５’－ＵＴＰの５’－環状トリリン酸化反応を行うために、原料となるＵＴＰをトリ－ｎ－ブチルアミンのような三級アミンの塩の形態で使用する必要がある。このため、ＵＴＰの３ナトリウム塩を事前にイオン交換カラムクロマトグラフィーにより遊離型のＵＴＰ（ＵＴＰフリー）とした後、三級アミンとの塩形成を行うという工程が必要であった。しかしながら、後述する試験例に示したように、ＵＴＰフリーは非常に不安定な物質であり、工業的な規模の大量製造においてＵＴＰフリーを原料として使用することは非常に困難なことであった。また、ＵＴＰの５’－環状トリリン酸化反応を効率的に合成するためには、反応直前にＵＴＰのトリ－ｎ－ブチルアミン塩を脱水状態にしておく必要がある。しかしながら、後述する比較試験例に示したように、工業的な規模な大量製造において、ＵＴＰのトリ－ｎ－ブチルアミン塩を共沸により脱水する場合、ＵＴＰの熱的な分解反応が起こるためにＵＴＰの純度が低下してしまい、結果として合成効率を低下させる原因となっていた。
【００４７】
また、特許文献２および非特許文献２の方法では、上記ＵＴＰフリーを使用した工程を用いることなくUP_4Uを合成することが可能であったが、後述する比較試験にも示したように、対ＵＭＰ収率が著しく低下してしまうものであった。また、副生成物を多く生成せしめるものであり、やはり工業的な大規模製造に適した製法であるとは言えなかった。
【００４８】

これに対して、本発明方法では、ＵＤＰまたはＵＭＰを出発原料としているので、ＵＴＰフリーを使用する必要もなく、さらにウリジン５’－環状トリリン酸を合成するためのＵＴＰ塩の脱水操作を回避することもできるため、後述する実施例で示すように、原料の分解による合成効率の低下を避けることができる。また、ＵＴＰのトリ－ｎ－ブチルアミン塩を共沸により脱水する必要もないので、ＵＴＰの熱的な分解反応が起こることもなく、後述する実施例で示すように、余計な副産物が発生してＵＴＰの純度が低下してしまうこともない。そのため、本発明の製造方法は、UP_4Uの工業的な大量合成にきわめて好適な方法である。

【００４９】

本発明では、リン酸活性化合物がＵＤＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＤＰまたはＵＤＰ塩であることが好ましい。この場合、UP_4Uの合成を、工業的な大量製造に適さないＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避しつつ、しかも収率よく行うことができることが後述する実施例で実証されているからである。

【００５０】

また、本発明では、リン酸活性化合物がＵＭＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＴＰまたはＵＴＰ塩であることが好ましい。この場合にも、UP_4Uの合成を、工業的な大量製造に適さないＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避しつつ、しかも収率よく行うことができることが後述する実施例で実証されているからである。

【００５１】

また、本発明では、リン酸活性化合物がＵＭＰ－リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がピロリン酸またはピロリン酸塩であることが好ましい。この場合にも、UP_4Uの合成を、工業的な大量製造に適さないＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避しつつ、しかも収率よく行うことができることが後述する実施例で実証されているからである。

【００５２】

また、本発明では、リン酸活性化合物がピロリン酸ジイミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＭＰまたはＵＭＰ塩であることが好ましい。この場合にも、UP_4Uの合成を、工業的な大量製造に適さないＵＴＰフリーの利用およびＵＴＰ塩の脱水操作を回避しつつ、しかも収率よく行うことができることが後述する実施例で実証されているからである。

【００５３】

また、本発明では、金属イオンが鉄（ＩＩ）イオン、鉄（ＩＩＩ）イオンまたはアルミニウムイオンから成る群より選ばれることが好ましい。とくに、リン酸活性化合物がピロリン酸ジイミダゾリドであり、リン酸化合物がＵＭＰフリーまたはＵＭＰ塩である場合には、鉄（ＩＩＩ）イオンまたはアルミニウムイオンから成る群より選ばれることが好ましい。これらの場合、他の金属イオンを用いる場合に比べて、UP_4Uの合成を効率よく行うことができることが後述する比較試験で実証されているからである。

【００５４】

また、本発明では、金属イオンが、金属の塩化物、臭化物、硝酸化物、硫酸化物、酢酸化物から成る群より選択される塩の形態で供給されることが好ましい。この場合にも、UP_4Uの合成を効率よく行うことができるからである。

【００５５】

以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

【実施例】

【００５６】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【００５７】

（実施例１）組み合わせ１（その１）：ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、R^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、R^2＝

５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応
０．３２Ｍ　ＵＤＰ－トリブチルアミン塩の水溶液（１．２６ｍｌ，４．０ｍｍｏｌ）にジメチルアセトアミド（６．０ｍｌ）を加え、共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルアセトアミド（６．０ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（１．９５ｇ，１２．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに０．５Ｍ塩酸水溶液（１２．０ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７．０）。反応液を減圧下で濃縮し、ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド溶液を調製した。

【００５８】
氷冷下でＵＤＰ－リン酸イミダゾリド溶液にＵＤＰナトリウム水溶液（２．０ｍｍｏｌ，２．１ｍｌ）を加え、さらに２Ｍ塩酸水溶液を加えてｐＨ４．９の混合溶液とした。氷冷下で１Ｍ塩化第二鉄水溶液（１．５ｍｍｏｌ，１．５ｍｌ）を加え、さらに２Ｍ塩酸水溶液を加えてｐＨ１．６の混合溶液とし、２５℃で３時間攪拌した。反応液に６Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加えｐＨ１２とし、室温で３０分間攪拌した。２Ｍ塩酸を加えてｐＨ７．６とした。ＨＰＬＣ分析で定量し、UP_4Uの合成収率８７％を算出した。

【００５９】
合成液を１０ｍｌに濃縮し、リン酸一水素ナトリウム（４．２ｍｍｏｌ）を加えて溶解し、リン酸鉄を析出させた。懸濁液を４℃で一晩静置した後、遠心分離で沈殿物を除去した。上澄み液をｐＨ２．５に調整後、３０ｍｌ溶液としてカラム吸着液とした。

【００６０】
上記カラム吸着液について、活性炭カラムクロマトグラフィー（樹脂量２０ｍｌ）で脱塩を行い、得られた回収液をｐＨ７に調整し濃縮後、メンブランろ過を行った。さらに濃縮を行い、残渣にエタノールを滴下し、室温で一晩結晶化を行った。結晶をろ取し、５０℃で３時間、真空乾燥し、目的物UP_4Uを２．１２ｇ（４水和物として収率７５％）得た。

【００６１】
（実施例２）組み合わせ１（その２）：ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、R^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、R^2＝５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応
０．９４Ｍ　ＵＤＰナトリウム水溶液（１．０ｍｌ）に５．６４Ｍ　イミダゾール－ジメチルアセトアミド溶液（０．５ｍｌ）を加え、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルカルボジイミド（０．７３ｍｌ，４．７ｍｍｏｌ）を加え室温で５時間、５０℃で２時間攪拌し、ＵＤＰとＵＤＰ－リン酸イミダゾリド溶液の混合液を調製した。

【００６２】
氷冷下で２Ｍ塩酸水溶液を加えｐＨ５．３の混合溶液とした後、１Ｍ塩化第二鉄水溶液（０．２４ｍｍｏｌ，０．２４ｍｌ）を加え、さらに２Ｍ塩酸水溶液を加えｐＨ１．９の混合溶液として、２５℃で１６時間攪拌した。ＨＰＬＣ分析で定量し、UP_4Uの合成収率６３％を算出した。

【００６３】
（実施例３）組み合わせ１（その３）：ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、R^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、R^2＝５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応
０．１７Ｍ　ＵＤＰ－トリブチルアミン塩の水溶液　（１１．８ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）にプロピオニトリル（３．０ｍｌ）を加え共沸脱水を４回行った。得られた残渣をプロピオニトリル（３．０ｍｌ）で溶解した。これを１，１’－カルボニルジイミダゾール（０．９７ｇ，６．０ｍｍｏｌ）のプロピオニトリル（２．０ｍｌ）懸濁液に滴下した。室温で３０分間攪拌した後、反応液を減圧下で濃縮し、ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド溶液を調製した。

【００６４】
氷冷下でＵＤＰ－リン酸イミダゾリド溶液にＵＤＰ－２ナトリウム（０．５３ｇ，１．０ｍｍｏｌ）を加え、６Ｍ塩酸水溶液でｐＨ３．９に調製した。さらに１Ｍ塩化第二鉄水

溶液（１５μｌ，０．０２ｍｍｏｌ）を加え、１０℃で２７時間攪拌した。反応液に７．５Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加えｐＨ１０とし、氷冷下で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に１０ｍｌのエタノールを添加し、４℃で一晩静置した。沈殿物を回収しｐＨ７．５の２０ｍｌ水溶液に調製し、ＨＰＬＣ分析で定量してＵＰ$_4$Ｕの合成収率９４％を算出した。すなわち、塩化鉄触媒の使用量を大幅に減らした場合でも、反応は良好に進むことが明らかになった。

【００６５】

（実施例４）組み合わせ１（その４）：ＵＤＰ－リン酸ベンズイミダゾリド（式ＩＩ中、Ｒ^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝ベンズイミダゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、Ｒ^2＝５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応

ＵＤＰ－２ナトリウム塩（０．５ｇ，０．９４ｍｍｏｌ）を水２．７ｍｌに溶解し、ベンズイミダゾール（０．３３ｇ，２．８２ｍｍｏｌ）のジメチルアセトアミド溶液（１．８ｍｌ）、およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルカルボジイミド（０．４４ｍｌ，２．８２ｍｍｏｌ）を加え、室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、ＵＤＰ－２ナトリウムとＵＤＰ－リン酸ベンズイミダゾリドの混合物を調製した。

【００６６】

これに水１ｍｌを添加した後、氷冷下で２Ｍ塩酸水溶液を加えてｐＨを４．６に調製した。氷冷下で１Ｍ塩化第二鉄水溶液（９４μｌ，０．０９ｍｍｏｌ）を加え、さらに２Ｍ塩酸水溶液を加えｐＨ３．０の混合溶液として、室温で１０時間攪拌した。反応液に６Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加えｐＨ１２とし、室温で1時間攪拌した。２Ｍ塩酸を加えてｐＨ７．３とした。ＨＰＬＣ分析で定量し、ＵＰ$_4$Ｕの合成収率８３％を算出した。

【００６７】

（実施例５）組み合わせ１（その５）：ＵＤＰ－リン酸トリアゾリド（式ＩＩ中、Ｒ^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝１，２，４－トリアゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、Ｒ^2＝５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応

０．３７Ｍ　ＵＤＰ－トリブチルアミン塩の水溶液　（１．６ｍｌ，０．６ｍｍｏｌ）にジメチルアセトアミド（２．０ｍｌ）を加え共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルアセトアミド（２．０ｍｌ）で溶解し、１，１’－カルボニルジ－（１，２，４－トリアゾール）（０．２５ｇ，１．５ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水　（０．２ｍｌ）を加え、さらに０．５Ｍ塩酸水溶液を加えてｐＨ７．４とした。反応液を減圧下で濃縮し、ＵＤＰ－リン酸トリアゾリド溶液を調製した。

【００６８】

氷冷下でＵＤＰ－リン酸トリアゾリド溶液にＵＤＰナトリウム水溶液（０．２５ｍｍｏｌ，０．９ｍｌ）を加え、さらに１Ｍ塩化第二鉄水溶液（０．１９ｍｍｏｌ，０．１９ｍｌ）を加え（ｐＨ６．３）、２５℃で５時間攪拌した。反応液に６Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加えｐＨ１２とし、室温で３０分間攪拌した。２Ｍ塩酸を加えてｐＨ７．０とした。ＨＰＬＣ分析で定量し、ＵＰ$_4$Ｕの合成収率４８％を算出した。

【００６９】

（実施例６）組み合わせ２：ＵＭＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、Ｒ^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝１）とＵＴＰナトリウム塩（式ＩＶ中、Ｒ^2＝５’－ウリジル、ｍ＝３）との反応

２．０５Ｍ　ＵＭＰフリー水溶液（０．４９ｍｌ，１．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．２５ｍｌ，１．１ｍｍｏｌ）を加え、室温で２０分間攪拌した後、ジメチルアセトアミド（１．５ｍｌ）をさらに加え共沸脱水を３回行った。得られたＵＭＰ－トリブチルアミン塩溶液をジメチルアセトアミド（１．５ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（４８６ｍｇ，３．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに０．５Ｍ塩酸水溶液（４．０ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７．２）。反応液を減圧下で濃縮し、ＵＭＰ－リン酸イミダゾリド溶液を調製した。

【００７０】

氷冷下、１６５ｍＭ　ＵＴＰナトリウム水溶液（８．０ｍｌ，１．３ｍｍｏｌ）に上記

ＵＭＰ－リン酸イミダゾリド溶液および２Ｍ塩酸水溶液を加え、ｐＨ５．１の混合溶液とした。氷冷下で塩化第二鉄水溶液（０．５ｍｍｏｌ，０．２ｍｌ）を添加し、２５℃で４時間攪拌した。反応液をメンブランろ過した後、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（１１ｍｌ）を加えてｐＨ１０．４とし、室温で４０分間攪拌した。その後、２Ｍ塩酸（３．５ｍｌ）を加えてｐＨ６．９とした。ＨＰＬＣ分析で定量し、$ＵＰ_4$Ｕの合成収率６７％を算出した。

【００７１】

以下、実施例１と同様に精製を行った結果、目的物$ＵＰ_4$Ｕを４７１ｍｇ（４水和物として５０％）得た。

【００７２】

（実施例７）組み合わせ３：ＵＭＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、$Ｒ^1$＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝１）とピロリン酸トリエチルアミン塩（式ＩＶ中、$Ｒ^2$は水素原子、ｍ＝２）との反応

２．０５Ｍ　ＵＭＰフリー水溶液（０．４９ｍｌ，１．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．２５ｍｌ，１．１ｍｍｏｌ）を加え室温で２０分間攪拌した後、ジメチルアセトアミド（１．５ｍｌ）を加え共沸脱水を３回行った。得られたＵＭＰ－トリブチルアミン塩溶液をジメチルアセトアミド（１．５ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（４８６ｍｇ，３．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水　（０．２ｍｌ）を加え、さらに０．５Ｍ塩酸水溶液（４．０ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７．２）。反応液を減圧下で濃縮し、ＵＭＰ－リン酸イミダゾリド溶液を調製した（本操作を２回行った）。

【００７３】

氷冷下でＵＭＰ－リン酸イミダゾリド溶液に０．９５Ｍ　ピロリン酸トリエチルアミン水溶液（１．１ｍｌ，１．０ｍｍｏｌ）に加え、さらに１Ｍ塩化第二鉄水溶液（０．５ｍｍｏｌ，０．５ｍｌ）を加えた。反応液を２Ｍ塩酸水溶液でｐＨ５．１に調整後、２５℃で５時間攪拌した。攪拌後、氷冷下で、別途調製したＵＭＰ－リン酸イミダゾリド溶液（１．０ｍｍｏｌ）を加え、さらに２Ｍ塩酸水溶液でｐＨ２．１に調整し、２５℃で６時間攪拌した。６Ｍ　水酸化ナトリウム水溶液を加えｐＨ１１とし、室温で３０分間攪拌した。さらに２Ｍ塩酸を加えてｐＨ７．６とし、ＨＰＬＣ分析で定量して$ＵＰ_4$Ｕの合成収率４５％を算出した。

【００７４】

（実施例８）組み合わせ４：ピロリン酸ジイミダゾリド（式ＩＩＩ中、Ｘ＝イミダゾイル）とＵＭＰ（式ＩＶ中、$Ｒ^2$は５’－ウリジル、ｍ＝１）との反応

１．０９Ｍ　ピロリン酸－トリエチルアミン塩の水溶液（１．８６ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．９５ml，４．０ｍｍｏｌ）、ホルムアミド（２．０ｍｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルホルムアミド（８．０ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（０．９７ｇ，６．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに２．０Ｍ塩酸水溶液（１．５ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７）。反応液を減圧下で濃縮し、ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液を調製した。

氷冷下でピロリン酸－ジイミダゾリド溶液にＵＭＰ－フリー水溶液（２．０３Ｍ，２．４７ｍｌ，５．０ｍｍｏｌ）を加えた。さらに１Ｍ塩化第二鉄水溶液（２ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）を加え、２Ｍ塩酸水溶液を加えてｐＨを２．４に調整し、０℃で５時間攪拌した。反応液に６．０Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を加え、ｐＨ６．３とした。これに水を加えて５０ｍｌ水溶液に調製し、ＨＰＬＣ分析で定量して$ＵＰ_4$Ｕの合成収率５１％を算出した。

【００７５】

（試験例１）ＵＴＰおよび関連化合物の安定性の測定

ＵＴＰフリーの安定性を評価するため、ＵＴＰフリー、ＵＴＰナトリウム塩（ＵＴＰ－Ｎａ）の水溶液およびＵＴＰ－トリブチルアミン塩（ＵＴＰ－ＴＢＡ）のジメチルアセト

アミド溶液の安定性を調べた。また、比較対照としてＵＤＰ－フリーおよびＵＤＰ－Ｎａの水溶液の安定性も測定した。各物質の溶液を－２０℃、２５℃または５０℃で一定時間静置し、それぞれの物質の濃度をＨＰＬＣで測定し、分解率を算出した。なお、分解率は以下［数１］のように定義した。

【００７６】

【数１】

$$\text{各物質の分解率}(\%) = \{100 - (\text{測定時の各物質のHPLC\%} / \text{試験開始時の各物質のHPLC\%}) \times 100\}$$

【００７７】

結果、下記［表１］［表２］に示したように、ＵＴＰフリーおよびＵＴＰ－ＴＢＡは、ＵＴＰナトリウム塩、ＵＤＰフリー、ＵＤＰナトリウム塩といった他の化合物に比べて溶液保存時の安定性が明確に低いことが明らかになった。

【００７８】

【表１】

	－２０℃，１８ｈ	２５℃，８ｈ	２５℃，２４ｈ
１６ｍＭ　ＵＴＰフリー	４％	４％	１２％
１０ｍＭ　ＵＤＰフリー	－	０％	０％

（表中の数値は、各条件での分解率を示す）

【００７９】

【表２】

	５０℃，８ｈ	５０℃，２４ｈ
３５ｍＭ　ＵＴＰ－ＴＢＡ	７％	１８％
４０ｍＭ　ＵＴＰ－Ｎａ	２％	６％
４０ｍＭ　ＵＤＰ－Ｎａ	２％	５％

（表中の数値は、各条件での分解率を示す）

【００８０】

（比較試験１）ＵＤＰ－リン酸イミダゾリド（式ＩＩ中、R^1＝５’－ウリジル、Ｘ＝イミダゾイル、ｎ＝２）とＵＤＰナトリウム塩（式ＩＶ中、R^2＝５’－ウリジル、ｍ＝２）との反応における金属触媒効果

実施例１の方法で調製されたＵＤＰ－リン酸イミダゾリドとＵＤＰナトリウム塩とのモル比１：１の混合水溶液（各０．１５Ｍ）に各種金属触媒（０．０６Ｍ）を添加し、２Ｍ塩酸水溶液でｐＨ２±０．３として、２５℃で６時間後のUP_4Uの生成量をＨＰＬＣで定量した。結果を表３に示す。

【００８１】

【表３】

触媒	反応ｐＨ	ＵＰ$_4$Ｕの収率
ＦｅＣｌ$_3$	２．０	７９．４％
Ｆｅ（ＮＯ$_3$）$_3$	２．０	８１．８％
ＡｌＣｌ$_3$	２．０	６９．２％
ＬａＣｌ$_3$	２．０	５２．１％
ＣｅＣｌ$_3$	２．０	５３．５％
ＭｎＣｌ$_2$	２．０	１０．３％
ＭｇＣｌ$_2$	２．２	６．３％
ＦｅＣｌ$_2$	２．３	６８．３％
ＺｎＣｌ$_2$	２．２	７．０％
添加なし	２．１	２．８％

【００８２】
結果、金属塩として塩化第一鉄、塩化第二鉄、硝酸第二鉄、塩化アルミニウム、塩化ランタン、塩化セリウムを触媒として用いたとき、ＵＰ$_4$Ｕを特に高い収率でもって得られることが明らかになった。

【００８３】
（比較試験２）ピロリン酸ジイミダゾリド（式ＩＩＩ中、Ｘ＝イミダゾイル）とＵＭＰフリー（式ＩＶ中、Ｒ^2＝５’－ウリジル、ｍ＝１）との反応における金属触媒効果
実施例８の方法で調製されたピロリン酸－ジイミダゾリドとＵＭＰフリーとのモル比２：５の混合水溶液（ピロリン酸－ジイミダゾリドとして０．４ｍｍｏｌ）に各種金属触媒（０．４ｍｍｏｌ）を添加し、２Ｍ塩酸水溶液でｐＨ２．５±０．５として、０℃で５時間後のＵＰ$_4$Ｕの生成量をＨＰＬＣで定量した。結果を［表４］に示す。

【００８４】
【表４】

触媒	反応ｐＨ	ＵＰ$_4$Ｕの収率
ＦｅＣｌ$_3$	２．９	５１．１％
ＡｌＣｌ$_3$	２．７	４９．２％
ＭｎＣｌ$_2$	２．７	１７．７％
ＭｇＣｌ$_2$	２．８	５．２％
ＦｅＣｌ$_2$	２．９	１０．６％
ＺｎＣｌ$_2$	２．９	０．６％
ＮｉＣｌ$_2$	２．７	０．２％
ＣｏＣｌ$_2$	２．７	１．２％
ＣａＣｌ$_2$	２．８	０．５％
添加なし	２．３	０％

【００８５】
結果、原料としてピロリン酸活性化合物とＵＭＰの組み合わせを用いる場合、金属塩として塩化第二鉄、塩化アルミニウムを触媒として用いたときにおいて、ＵＰ$_4$Ｕを特に高い収率でもって得られることが明らかになった。

【００８６】
（比較試験３）ワンポット合成法と本発明方法を用いた際のＵＰ$_4$Ｕ収率および不純物の生成度合の比較
従来法を改善し、ＵＴＰフリーを使う工程を回避した合成法であるワンポット合成法と

、本実施例の方法を用いてそれぞれＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、最終産物の収率をそれぞれ比較した。本実施例の方法としては、上記実施例１の方法に従った。従来の方法を変更したワンポット合成法での合成は、以下の工程によって行った。

【００８７】

（１）合成液１の調製

２．０５ＭのＵＭＰフリー水溶液（２．１ｍｌ，４．３ｍｍｏｌ）にトリ－ｎ－ブチルアミン（２．２ｍｌ，９．２ｍｍｏｌ）を加え２０分間攪拌した後、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）で４回共沸脱水した。残渣をＤＭＡＣ（５．５ｍｌ）に溶解し、１０℃でクロロリン酸ジフェニル（ＤＰＣ）（１．１ｍｌ，５．２ｍｍｏｌ）を加え、室温で１時間攪拌した。トリ－ｎ－ブチルアミン（４．１ｍｌ，１７．２ｍｍｏｌ）を加え室温で１０分間攪拌し、これを合成液１とした。

【００８８】

（２）合成液２の調製

０．９５Ｍピロリン酸－トリエチルアミン塩水溶液（９．０ｍｌ，８．５ｍｍｏｌ）にトリ－ｎ－ブチルアミン（２．２ｍｌ，９．２ｍｍｏｌ）、ＤＭＡＣ（３．０ｍｌ）を加えた後、ピリジンで３回共沸脱水した。残渣にトリ－ｎ－ブチルアミン（０．４ｍｌ，２．８ｍｍｏｌ）、ピリジン（４．０ｍｌ）を加えて、これを合成液２とした。

【００８９】

（３）ＵＭＰ－ＴＢＡ溶液の調製

２．０５ＭのＵＭＰフリー水溶液（３．１ｍｌ，６．４ｍｍｏｌ）にトリ－ｎ－ブチルアミン（１．７ｍｌ，６．９ｍｍｏｌ）を加え２０分間攪拌した後、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（ＤＭＡＣ）で４回共沸脱水した。残渣をＤＭＡＣ（３．５ｍｌ）に溶解し、ＵＭＰ－ＴＢＡ溶液を調製した。

【００９０】

（４）ＵＰ$_4$Ｕ合成液の調製

室温下で合成液２に合成液１を滴下し、室温で１時間攪拌した（ＨＰＬＣ分析でＵＴＰが約６０％生成していることを確認した）。Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルカルボジイミド（２．３ｍｌ，１７．０ｍｍｏｌ）を加え室温で３時間攪拌した後、０℃でＵＭＰ－ＴＢＡ溶液および塩化マグネシウム－６水和物（１．７ｇ，８．４ｍｍｏｌ）を加え、０℃で１時間、室温で１９時間攪拌した。０℃で水（２０ｍｌ）を加えた後、室温で１時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、水（５０ｍｌ）を加え室温で２時間静置した。沈殿物をろ過して除きＵＰ４Ｕ合成液を調製した。ＨＰＬＣによりＵＰ$_4$Ｕを定量し、ＵＭＰからの合成収率を４２％と算出した。

【００９１】

（結果の考察・収率）

その結果、本実施例の方法でＵＰ$_4$Ｕを合成した際には、上述の実施例１で示したように、ＵＤＰからの合成収率８７％であるのに対し、ワンポット合成法ではＵＭＰからの合成収率は４２％に過ぎず、本発明の方法はワンポット合成法に比較して、著しく高い収率を達成するものであることが判明した。

【００９２】

（結果の考察・副生成物）

さらに、本実施例の方法とワンポット合成法での不純物の生成度合の差を比較するため、それぞれの方法でＵＰ$_4$Ｕを合成後の反応液中の生成物をＨＰＬＣで分析した。ＨＰＬＣチャートを［図１］［図２］に示す。図１及び２から明らかなように、ワンポット合成法では、産物であるＵＰ$_4$Ｕおよび原料のＵＭＰ以外の副生成物がＨＰＬＣチャートの面積の割合で約４８％生じていた上に、副生成物の種類数も多いのに対して、本発明の方法では、ＵＰ$_4$Ｕおよび原料であるＵＤＰ以外の副生成物の割合は４．８％と明らかに低下しており、副生成物の種類も極めて少なくなっていることから、本発明の方法では副生成物の発生を著しく低下させることができ、もって収率よく合成できるとともに、単離精製も容易である。

【００９３】
以上のような比較から、本発明の方法は、ワンポット合成法に比べて不純物の生成が少なく、しかも収率が著しく向上したものであって、ＵＰ$_4$Ｕの工業的な大量製造法として極めて適していることが示された。
【００９４】
（比較試験４）ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法と本発明方法を用いた際のＵＰ$_4$Ｕ収率および不純物の生成度合の比較
イミダゾリド法旧法と本実施例の方法を用いてそれぞれＵＰ$_4$Ｕを合成した際の、最終産物の収率をおよび副生成物の生成をそれぞれ比較した。本実施例の方法としては、上記実施例８の方法に従った。イミダゾリド法旧法での合成は以下の工程によって行った。また反応時に用いる触媒に関しては、公知の方法（特許文献２および非特許文献２参照）を参考に、（１）反応時に触媒を添加しなかった場合、触媒として（２）塩化亜鉛または（３）テトラゾールを使用した場合について検討を行った。
【００９５】
（１）触媒なしの場合
１．０９Ｍ ピロリン酸－トリエチルアミン塩の水溶液（１．８６ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．９５ｍｌ，４．０ｍｍｏｌ）、ホルムアミド（２．０ｍｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルホルムアミド（８．０ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（０．９７ｇ，６．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに２．０Ｍ塩酸水溶液（１．５ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７）。反応液を減圧下で濃縮し、さらにジメチルホルムアミドで２回共沸脱水して、無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液を調製した。
ＵＭＰ－フリー水溶液（２．０３Ｍ，２．４７ｍｌ，５．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（３．５６ｍｌ，１５．０ｍｍｏｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで４回共沸脱水し、ジメチルホルムアミド（２．０ｍｌ）を加えて、無水ＵＭＰ－トリブチルアミン溶液を調製した。これを無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液に加え、減圧下で濃縮し、２５℃で４８時間攪拌した。反応液に水を加えて５０ｍｌ水溶液に調製し、ＨＰＬＣ分析で定量してＵＰ$_4$Ｕの合成収率１０％を算出した。
【００９６】
（２）塩化亜鉛を触媒に用いた場合
１．０９Ｍ ピロリン酸－トリエチルアミン塩の水溶液（１．８６ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．９５ml，４．０ｍｍｏｌ）、ホルムアミド（２．０ｍｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルホルムアミド（８．０ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（０．９７ｇ，６．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに２．０Ｍ塩酸水溶液（１．５ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７）。反応液を減圧下で濃縮し、さらにジメチルホルムアミドで２回共沸脱水して、無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液を調製した。
ＵＭＰ－フリー水溶液（２．０３Ｍ，２．４７ｍｌ，５．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（３．５６ｍｌ，１５．０ｍｍｏｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで４回共沸脱水し、ジメチルホルムアミド（２．０ｍｌ）を加えて、無水ＵＭＰ－トリブチルアミン溶液を調製した。これを無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液に加え、さらに塩化亜鉛（１．３４ｇ，９．８ｍｍｏｌ）を加えた後、減圧下で濃縮し、２５℃で５時間攪拌した。反応液に水を加えて５０ｍｌ水溶液に調製し、ＨＰＬＣ分析で定量してＵＰ$_4$Ｕの合成収率１７％を算出した。
【００９７】
（３）テトラゾールを触媒に用いた場合
１．０９Ｍ ピロリン酸－トリエチルアミン塩の水溶液（１．８６ｍｌ，２．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（０．９５ml，４．０ｍｍｏｌ）、ホルムアミド（２．０ｍｌ）

を加え、ジメチルホルムアミドで共沸脱水を４回行った。得られた残渣をジメチルホルムアミド（８．０ｍｌ）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（０．９７ｇ，６．０ｍｍｏｌ）を加え室温で１時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（０．２ｍｌ）を加え、さらに２．０Ｍ塩酸水溶液（１．５ｍｌ）を滴下した（ｐＨ７）。反応液を減圧下で濃縮し、さらにジメチルホルムアミドで２回共沸脱水して、無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液を調製した。

ＵＭＰ－フリー水溶液（２．０３Ｍ，２．４７ｍｌ，５．０ｍｍｏｌ）にトリブチルアミン（３．５６ｍｌ，１５．０ｍｍｏｌ）を加え、ジメチルホルムアミドで４回共沸脱水し、ジメチルホルムアミド（２．０ｍｌ）を加えて、無水ＵＭＰ－トリブチルアミン溶液を調製した。これを無水ピロリン酸－ジイミダゾリド溶液に加え、さらに１Ｈ－テトラゾール（０．５ｇ，７．２ｍｍｏｌ）を加えた後、減圧下で濃縮し、２５℃で１９時間攪拌した。反応液に水を加えて５０ｍｌ水溶液に調製し、ＨＰＬＣ分析で定量してUP_4Uの合成収率９％を算出した。

【００９８】

（４）結果の考察・収率

ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法と本発明の方法におけるUP_4Uの合成収率をまとめると、下記［表５］のようになった。すなわち、公知の方法であるリン酸イミダゾリド法旧法と比較して、本発明の方法は著しく高い収率を達成するものであることが判明した。

【００９９】

【表５】

方法	UP_4Uの収率
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒なし）	１０％
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒：塩化亜鉛）	１７％
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒：テトラゾール）	９％
本発明法（実施例８）	５１％

【０１００】

（５）結果の考察・副生成物

さらに、本発明の方法とピロリン酸ジイミダゾリド法旧法での不純物の生成度合の差を比較するため、それぞれの方法におけるUP_4Uを合成後の反応液中の生成物をＨＰＬＣで分析した。得られたＨＰＬＣチャートを［図３］～［図６］に示す。また、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法と本実施例の方法において、ＨＰＬＣチャートの面積における産物であるUP_4Uおよび原料のＵＭＰ以外の副生成物の割合をまとめると、下記［表６］のようになった。

【０１０１】

図３～６および表６より明らかなように、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法では、産物であるUP_4Uおよび原料のＵＭＰ以外の副生成物がＨＰＬＣチャートの面積の割合で約４０％も生じていた上に、副生成物の種類数も多かったのに対して、本発明の方法では、UP_4Uおよび原料であるＵＭＰ以外の副生成物の割合は１６％と明らかに低下しており、副生成物の種数も極めて少なくなっていることから、本発明の方法では副生成物の発生を著しく低下させることができ、もって収率よく合成できるとともに、単離精製も容易であることが判明した。

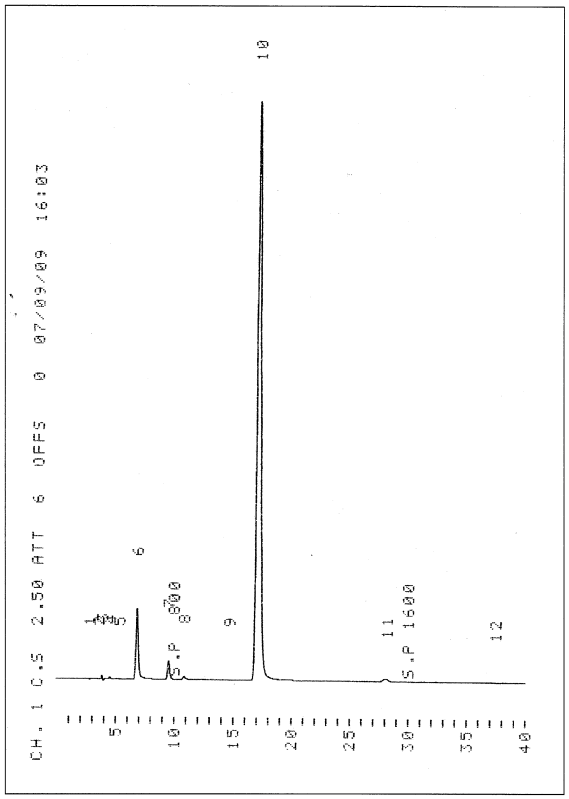
【０１０２】

【表６】

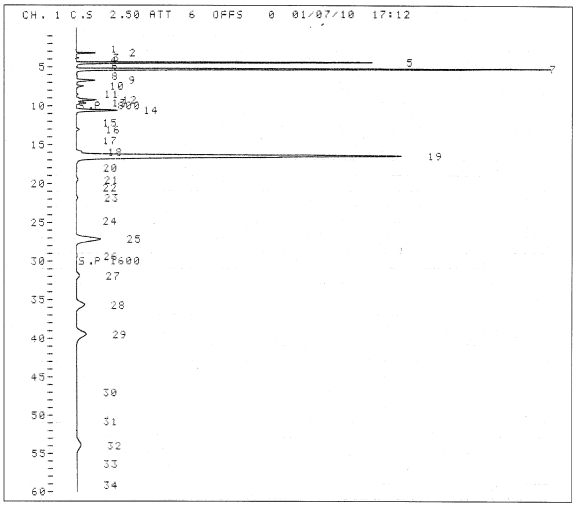
方法	副生成物の面積の割合
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒なし）	４０％
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒：塩化亜鉛）	３９％
リン酸イミダゾリド法旧法（触媒：テトラゾール）	４１％
本発明法（実施例８）	１６％

【０１０３】
以上のような比較から、本発明の方法は、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法に比べて不純物の生成が少なく、しかも収率が著しく向上したものであって、UP_4Uの工業的な大量製造法としてきわめて適していることが示された。
【０１０４】
以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。
【０１０５】
たとえば、上記実施例では、金属イオンを含む水溶液として塩化第二鉄水溶液を用いたが、特に限定する趣旨ではなく、（ｉ）金属ハロゲン化物の例として塩化第一鉄、塩化第二鉄、臭化第二鉄、三塩化アルミニウム、三塩化セリウム、三塩化ランタニウム等を、（ｉｉ）金属無機酸塩の例として鉄（２価）、鉄（３価）、アルミニウム、セリウム、ランタンから成る群より選択される金属の硫酸、硝酸、過塩素酸等の無機酸塩を、（ｉｉｉ）金属有機酸塩の例として、鉄（２価）、鉄（３価）、アルミニウム、セリウム、ランタンから成る群より選択される金属のトリフルオロメタンスルホン酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩等を溶解した水溶液を好適に用いることができる。これらの金属イオンを含む水溶液を用いた場合にも上記実施例と同様にUP_4Uの収率が向上することは当業者であれば容易に理解可能である。

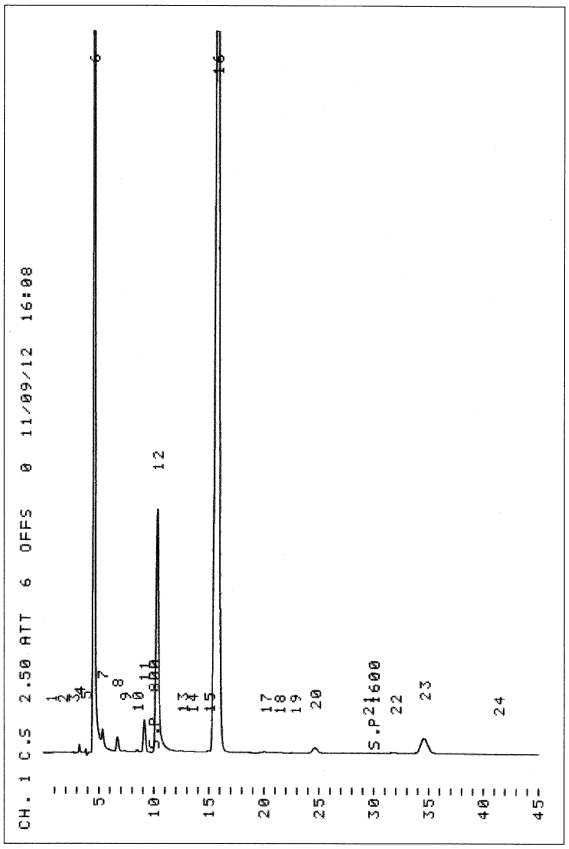
【図１】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 07/09/09 16:03
S.P 1600
S.P 1600

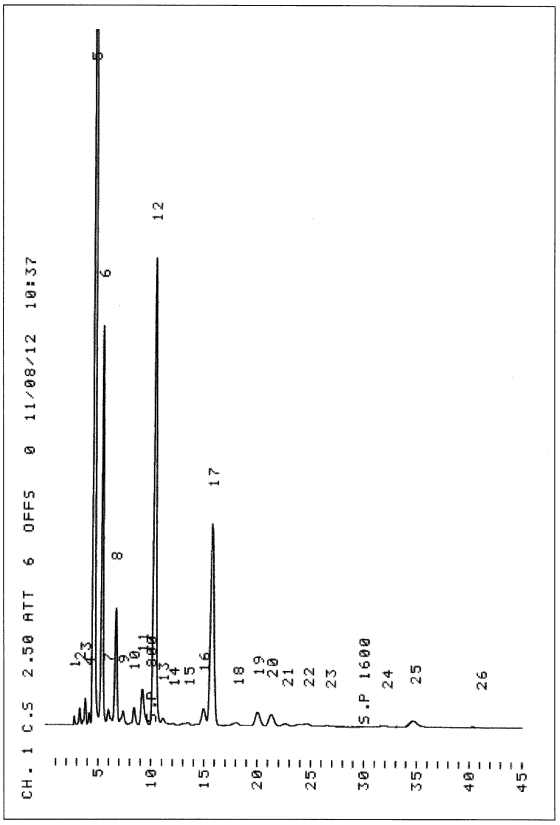
【図２】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 01/07/10 17:12

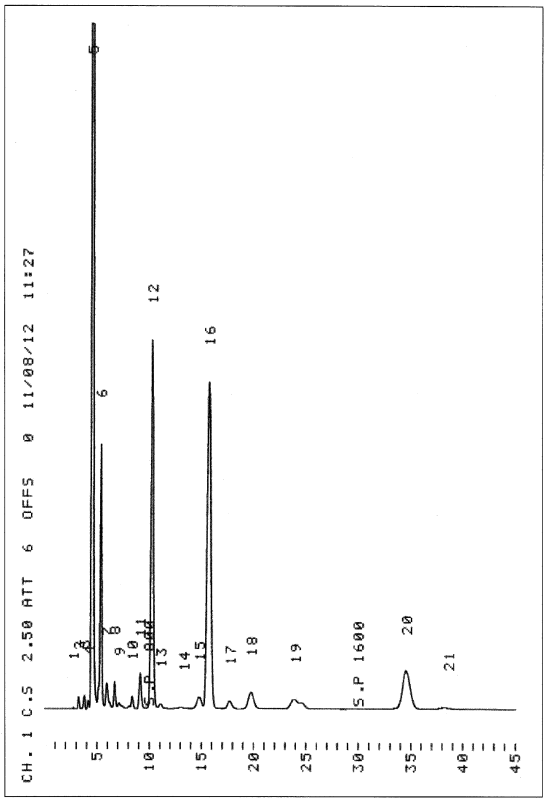
【図３】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 11/09/12 16:08
S.P 1600

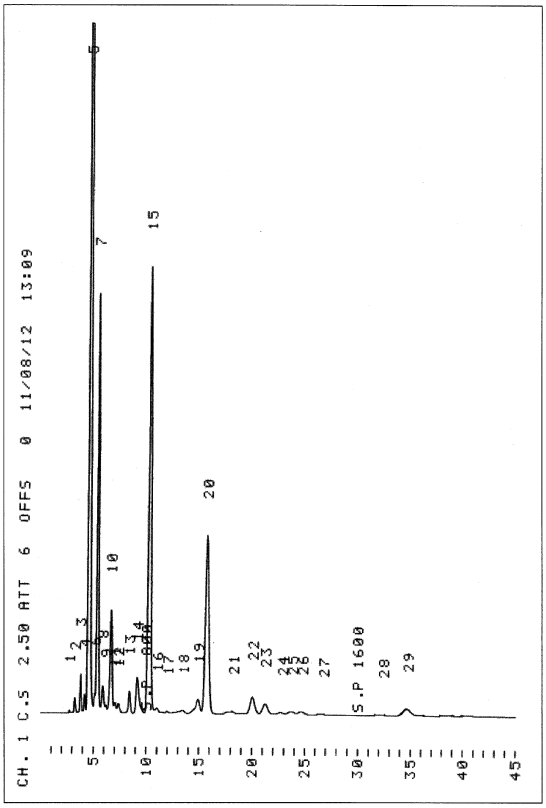
【図４】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 11/08/12 10:37
S.P 1600

【図５】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 11/08/12 11:27
S.P 1600

【図６】


CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 11/08/12 13:09
S.P 1600

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ０７Ｂ 61/00 (2006.01) Ｃ０７Ｂ 61/00 ３００

(72)発明者 山田 浩平
千葉県銚子市新生町２丁目１０番地の１ ヤマサ醤油株式会社内

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 国際公開第２００８／０１２９４９（WO，Ａ１）
SHIMAZU, Masamitsu et al., Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by manganese(II) and cadmium(II) ion-catal, Tetrahedron Letters, １９９０年, Vol.31, No.2, pp.235-238
HUANG, Kaisheng et al., Engineering Human Fhit, a Diadenosine Triphosphate Hydrolase, into an Efficient Dinucleoside Polypho, Journal of the American Chemical Society, ２００４年, Vol.126, No.31, pp.9548-9549

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｈ １／００－ ９９／００
Ｃ０７Ｂ ６１／００
Ａ６１Ｋ ３１／３３－ ３３／４４
Ａ６１Ｐ １／００－ ４３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）