

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年7月3日(03.07.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/103704 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 19/10 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)  
A61K 31/7072 (2006.01) A61P 11/10 (2006.01)  
A61K 31/7105 (2006.01) C07B 61/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/083100

(22) 国際出願日: 2013年12月10日(10.12.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2012-287578 2012年12月28日(28.12.2012) JP

(71) 出願人: ヤマサ醤油株式会社(YAMASA CORPORATION) [JP/JP]; 〒2880056 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 Chiba (JP).

(72) 発明者: 山田 浩平(YAMADA, Kohei); 〒2880056 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 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT

OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

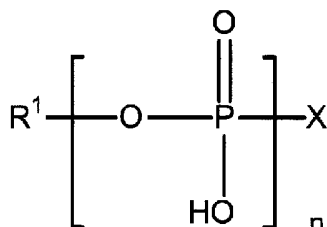
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

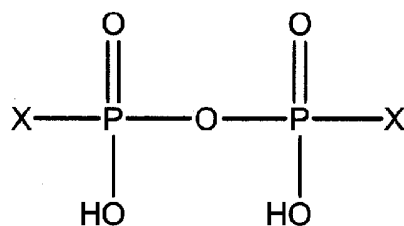
[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-DI(URIDINE 5'-)TETRAPHOSPHATE

(54) 発明の名称: P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-ジ (ウリジン5'-) テトラホスフェートの製造法



[II]



[III]

(57) Abstract: A method for producing P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-di(uridine 5'-)tetraphosphate (UP<sub>4</sub>U) is developed, which does not require the use of free UTP and does not undergo the decrease in synthesis efficiency. A method for producing UP<sub>4</sub>U, characterized by reacting a phosphoric-acid-activating compound represented by formula [II] or [III] with a phosphoric acid compound selected from the group consisting of UMP, UDP, UTP and pyrophosphoric acid or a salt thereof (excluding free UTP) in water or a hydrophilic organic solvent in the presence of a metal ion selected from the group consisting of an iron (II) ion, an iron (III) ion, a trivalent aluminum ion, a trivalent lanthanum ion and a trivalent cerium ion. (Each of R<sup>1</sup>, X and n in formula [II] and X in formula [III] is as defined in claim 1.)

(57) 要約: UTPフリーを使用せず、合成効率の低下を避けることができるP<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-ジ (ウリジン5'-) テトラホスフェート (UP<sub>4</sub>U) の製造法を開発する。式[II]または[III]で示されるリン酸活性化化合物と、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 (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ことを特徴とする、UP<sub>4</sub>Uの製造法。[II] [III] (式[II]中の、R<sup>1</sup>、X、n、式[III]中のXは、各々、請求項1に記載の意味を表す。)

**WO 2014/103704 A1**



---

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称： P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>

### ージ（ウリジン 5' -） テトラホスフェートの製造法

#### 技術分野

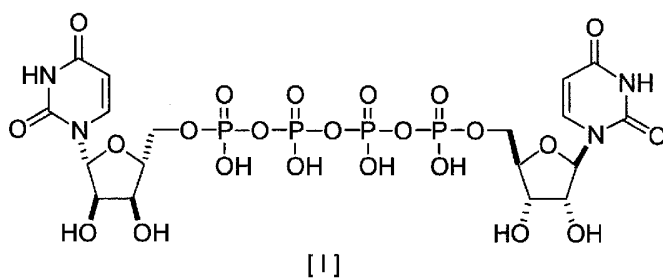
[0001] 本発明は P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup> - ジ（ウリジン 5' -） テトラホスフェートの効率的な新規製造法に関する。

#### 背景技術

[0002] 下記式 [1] で表される P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup> - ジ（ウリジン 5' -） テトラホスフェート（以下「UP<sub>4</sub>U」と表記する）またはその塩は、ドライアイに伴う角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<sub>4</sub>U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]



#### 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、トリー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のトリー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、工業的な規模の大量製造において、UTPのトリー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U T P 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 U T P ではなく U M P を用い、反応系内で U M P から U T P 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  $U P_4 U$  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 U M P と縮合させることによって  $U P_4 U$  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  $U P_4 U$  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 U M P、U T P、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  $U P_4 U$  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  $U P_4 U$  の対

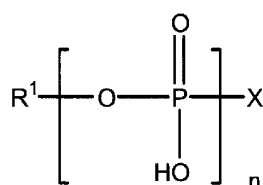
UMP 収率が十分に高いものとは到底言えないことを新たに見出した。すなわち、ワンポット合成法、ピロリン酸ジイミダゾリド法旧法のいずれも、工業規模での  $UP_4U$  大量生産に適した合成法とは言えないものであることが、明らかになった。

[0015] そこで本発明者は、工業的な大量製造に適した  $UP_4U$  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  $UP_4U$  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 [I I] または [I I I] で示されるリン酸活性化化合物と、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]

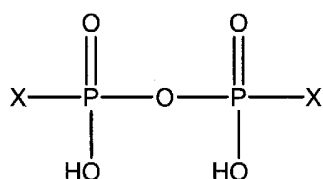
[化2]



[II]

[0018] (式中、 $\text{R}^1$ 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、 $\text{UP}_4\text{U}$ の合成を、工業的な大量製造に適さない $\text{UTP}$ フリーの利用および $\text{UTP}$ 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 $\text{UP}_4\text{U}$ 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、 $\text{UP}_4\text{U}$ 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 $\text{UP}_4\text{U}$ 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 $\text{UP}_4\text{U}$

、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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 、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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 、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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 、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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 、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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 、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。

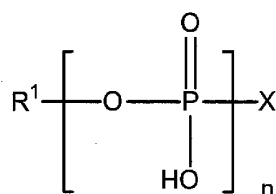
[0024] <リン酸活性化合物>

本発明で使用するリン酸活性化合物は、式[11]または[111]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]



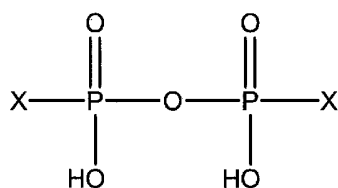
[化4]



[II]

[0026] (式中、R<sup>1</sup>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-トリアゾリ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<sub>1-6</sub>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

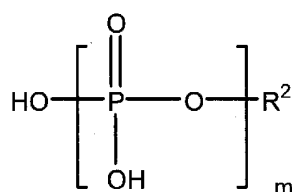
ことができる。

[0031]  $UP_4U$ の合成に当たっては、UDPーリン酸イミダゾリド、UDPーリン酸トリアゾリド、UMPー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<sub>4</sub>U 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、 $UP_4U$ 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、 $UP_4U$ 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、 $UP_4U$ 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、 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 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をトリー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のトリー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のトリー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I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（2.0 mmol, 2.1 ml）を加え、さらに2 M塩酸水溶液を加えてpH 4.9の混合溶液とした。氷冷下で1 M塩化第二鉄水溶液（1.5 mmol, 1.5 ml）を加え、さらに2 M塩酸水溶液を加えてpH 1.6の混合溶液とし、25℃で3時間攪拌した。反応液に6 M水酸化ナトリウム水溶液を加えpH 12とし、室温で30分間攪拌した。2 M塩酸を加えてpH 7.6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10 mlに濃縮し、リン酸一水素ナトリウム（4.2 mmol）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pH 2.5に調整後、30 ml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20 ml）で脱塩を行い、得られた回収液をpH 7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2.12 g（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I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

0.94 M UDPナトリウム水溶液（1.0 ml）に5.64 M イミダゾール-ジメチルアセトアミド溶液（0.5 ml）を加え、N,N-ジイソプロピルカルボジイミド（0.73 ml, 4.7 mmol）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2 M塩酸水溶液を加えpH 5.3の混合溶液とした後、1 M塩化第二鉄水溶液（0.24 mmol, 0.24 ml）を加え、さらに2 M塩酸水溶液を加えpH 1.9の混合溶液として、25℃で16時間攪拌した。H

PLC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I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 (15 $\mu$ l, 0.02mmol) を加え、10°C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°C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 $UP_4U$ 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 1 ml を添加した後、氷冷下で 2 M 塩酸水溶液を加えて pH を 4.6 に調製した。氷冷下で 1 M 塩化第二鉄水溶液 (94  $\mu$ l, 0.09 mmol) を加え、さらに 2 M 塩酸水溶液を加え pH 3.0 の混合溶液として、室温で 10 時間攪拌した。反応液に 6 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え pH 12 とし、室温で 1 時間攪拌した。2 M 塩酸を加えて pH 7.3 とした。HPLC 分析で定量し、UP<sub>4</sub>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 I 中、R<sup>1</sup>=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 I V 中、R<sup>2</sup>=5'-ウリジル、m=2) との反応

0.37 M UDP-トリブチルアミン塩の水溶液 (1.6 ml, 0.6 mmol) にジメチルアセトアミド (2.0 ml) 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 (2.0 ml) で溶解し、1, 1'-カルボニルジ- (1, 2, 4-トリアゾール) (0.25 g, 1.5 mmol) を加え室温で 1 時間攪拌した。氷冷下で反応液に水 (0.2 ml) を加え、さらに 0.5 M 塩酸水溶液を加えて pH 7.4 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 (0.25 mmol, 0.9 ml) を加え、さらに 1 M 塩化第二鉄水溶液 (0.19 mmol, 0.19 ml) を加え (pH 6.3)、25 °C で 5 時間攪拌した。反応液に 6 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え pH 12 とし、室温で 30 分間攪拌した。2 M 塩酸を加えて pH 7.0 とした。HPLC 分析で定量し、UP<sub>4</sub>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 I I 中、R<sup>1</sup>=5'-ウリジル、X=イミダゾイル、n=1) と UTP ナトリウム塩 (式 I V 中、R<sup>2</sup>=5'-ウリジル、m=3) との反応

2.05 M UMP フリー水溶液 (0.49 ml, 1.0 mmol) にトリブチルアミン (0.25 ml, 1.1 mmol) を加え、室温で 20 分間

攪拌した後、ジメチルアセトアミド（1.5 ml）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（1.5 ml）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（486 mg, 3.0 mmol）を加え室温で1時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（0.2 ml）を加え、さらに0.5 M塩酸水溶液（4.0 ml）を滴下した（pH 7.2）。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、165 mM UTPナトリウム水溶液（8.0 ml, 1.3 mmol）に上記UMP-リン酸イミダゾリド溶液および2 M塩酸水溶液を加え、pH 5.1の混合溶液とした。氷冷下で塩化第二鉄水溶液（0.5 mmol, 0.2 ml）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、1 M水酸化ナトリウム水溶液（11 ml）を加えてpH 10.4とし、室温で40分間攪拌した。その後、2 M塩酸（3.5 ml）を加えてpH 6.9とした。HPLC分析で定量し、UP<sub>4</sub>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<sub>4</sub>Uを471 mg（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I中、R<sup>1</sup>=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<sup>2</sup>は水素原子、m=2）との反応

2.05 M UMPフリー水溶液（0.49 ml, 1.0 mmol）にトリブチルアミン（0.25 ml, 1.1 mmol）を加え室温で20分間攪拌した後、ジメチルアセトアミド（1.5 ml）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（1.5 ml）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（486 mg, 3.0 mmol）を加え室温で1時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（0.2 ml）を加え、さらに0.5 M塩酸水溶液（4.0 ml）を滴下した（pH 7.2）。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0.95 M ピロリン酸トリエチルアミン水溶液(1.1 ml, 1.0 mmol)に加え、さらに1 M塩化第二鉄水溶液(0.5 mmol, 0.5 ml)を加えた。反応液を2 M塩酸水溶液でpH 5.1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(1.0 mmol)を加え、さらに2 M塩酸水溶液でpH 2.1に調整し、25℃で6時間攪拌した。6 M水酸化ナトリウム水溶液を加えpH 11とし、室温で30分間攪拌した。さらに2 M塩酸を加えてpH 7.6とし、HPLC分析で定量してUP<sub>4</sub>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<sup>2</sup>は5'-ウリジル、m=1)との反応

1.09 M ピロリン酸-トリエチルアミン塩の水溶液(1.86 ml, 2.0 mmol)にトリブチルアミン(0.95 ml, 4.0 mmol)、ホルムアミド(2.0 ml)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(8.0 ml)で溶解し、カルボニルジイミダゾール(0.97 g, 6.0 mmol)を加え室温で1時間攪拌した。氷冷下で反応液に水(0.2 ml)を加え、さらに2.0 M塩酸水溶液(1.5 ml)を滴下した(pH 7)。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(2.03 M, 2.47 ml, 5.0 mmol)を加えた。さらに1 M塩化第二鉄水溶液(2 ml, 2.0 mmol)を加え、2 M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6.0 M水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH 6.3とした。これに水を加えて50 ml水溶液に調製し、HPLC分析で定量してUP<sub>4</sub>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<sup>1</sup>=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<sup>2</sup>=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

、0.6 M) を添加し、2 M塩酸水溶液で  $\text{pH } 2 \pm 0.3$  として、25℃で6時間後の  $\text{UP}_4\text{U}$  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	$\text{UP}_4\text{U}$ の収率
$\text{FeCl}_3$	2.0	79.4%
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	2.0	81.8%
$\text{AlCl}_3$	2.0	69.2%
$\text{LaCl}_3$	2.0	52.1%
$\text{CeCl}_3$	2.0	53.5%
$\text{MnCl}_2$	2.0	10.3%
$\text{MgCl}_2$	2.2	6.3%
$\text{FeCl}_2$	2.3	68.3%
$\text{ZnCl}_2$	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、 $\text{UP}_4\text{U}$  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 I I I 中、 $\text{X} = \text{イミダゾイル}$ ) とUMPフリー (式 I V 中、 $\text{R}^2 = 5'$  -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0.4 mmol) に各種金属触媒 (0.4 mmol) を添加し、2 M塩酸水溶液で  $\text{pH } 2.5 \pm 0.5$  として、0℃で5時間後の  $\text{UP}_4\text{U}$  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 <sub>4</sub> Uの収率
FeCl <sub>3</sub>	2.9	51.1%
AlCl <sub>3</sub>	2.7	49.2%
MnCl <sub>2</sub>	2.7	17.7%
MgCl <sub>2</sub>	2.8	5.2%
FeCl <sub>2</sub>	2.9	10.6%
ZnCl <sub>2</sub>	2.9	0.6%
NiCl <sub>2</sub>	2.7	0.2%
CoCl <sub>2</sub>	2.7	1.2%
CaCl <sub>2</sub>	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<sub>4</sub>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<sub>4</sub>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<sub>4</sub>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



0.95 Mピロリン酸－トリエチルアミン塩水溶液 (9.0 ml, 8.5 mmol) にトリ－n－ブチルアミン (2.2 ml, 9.2 mmol)、DMAC (3.0 ml) 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 (0.4 ml, 2.8 mmol)、ピリジン (4.0 ml) を加えて、これを合成液2とした。

[0089] (3) UMP－TBA溶液の調製

2.05 MのUMPフリー水溶液 (3.1 ml, 6.4 mmol) にトリ－n－ブチルアミン (1.7 ml, 6.9 mmol) 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 (3.5 ml) に溶解し、UMP－TBA溶液を調製した。

[0090] (4) UP<sub>4</sub>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 (2.3 ml, 17.0 mmol) 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 (1.7 g, 8.4 mmol) を加え、0℃で1時間、室温で19時間攪拌した。0℃で水 (20 ml) 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 (50 ml) を加え室温で2時間静置した。沈殿物をろ過して除きUP<sub>4</sub>U合成液を調製した。HPLCによりUP<sub>4</sub>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<sub>4</sub>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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 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、 $UP_4U$ 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、 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 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 $UP_4U$ 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. 0.9M 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（1.5 ml）を滴下した（pH 7）。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（2.03 M, 2.47 ml, 5.0 mmol）にトリブチルアミン（3.56 ml, 15.0 mmol）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（2.0 ml）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50 ml水溶液に調製し、HPLC分析で定量してUP<sub>4</sub>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

1.09 M ピロリン酸-トリエチルアミン塩の水溶液（1.86 ml, 2.0 mmol）にトリブチルアミン（0.95 ml, 4.0 mmol）、ホルムアミド（2.0 ml）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（8.0 ml）で溶解し、カルボニルジイミダゾール（0.97 g, 6.0 mmol）を加え室温で1時間攪拌した。氷冷下で反応液に水（0.2 ml）を加え、さらに2.0 M 塩酸水溶液（1.5 ml）を滴下した（pH 7）。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（2.03 M, 2.47 ml, 5.0 mmol）にトリブチルアミン（3.56 ml, 15.0 mmol）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（2.0 ml）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（1.34 g, 9.8 mmol）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50 ml水溶液に調製し、HPLC分析で定量してUP<sub>4</sub>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. 0.9 M ピロリン酸-トリエチルアミン塩の水溶液 (1.86 ml, 2.0 mmol) にトリブチルアミン (0.95 ml, 4.0 mmol)、ホルムアミド (2.0 ml) 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 (8.0 ml) で溶解し、カルボニルジイミダゾール (0.97 g, 6.0 mmol) を加え室温で1時間攪拌した。氷冷下で反応液に水 (0.2 ml) を加え、さらに2.0 M 塩酸水溶液 (1.5 ml) を滴下した (pH 7)。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 (2.03 M, 2.47 ml, 5.0 mmol) にトリブチルアミン (3.56 ml, 15.0 mmol) 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 (2.0 ml) 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1 H-テトラゾール (0.5 g, 7.2 mmol) 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50 ml 水溶液に調製し、HPLC分析で定量してUP<sub>4</sub>U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<sub>4</sub>U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 <sub>4</sub> U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<sub>4</sub>U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<sub>4</sub>U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<sub>4</sub>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<sub>4</sub>U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。

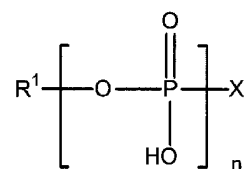
[0104] 以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

[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。

## 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<sup>1</sup>、P<sup>4</sup>−ジ（ウリジン5′−）テトラホスフェートの製造法。

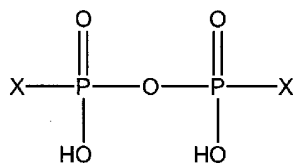
〔化1〕



〔Ⅱ〕

（式中、R<sup>1</sup>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〕



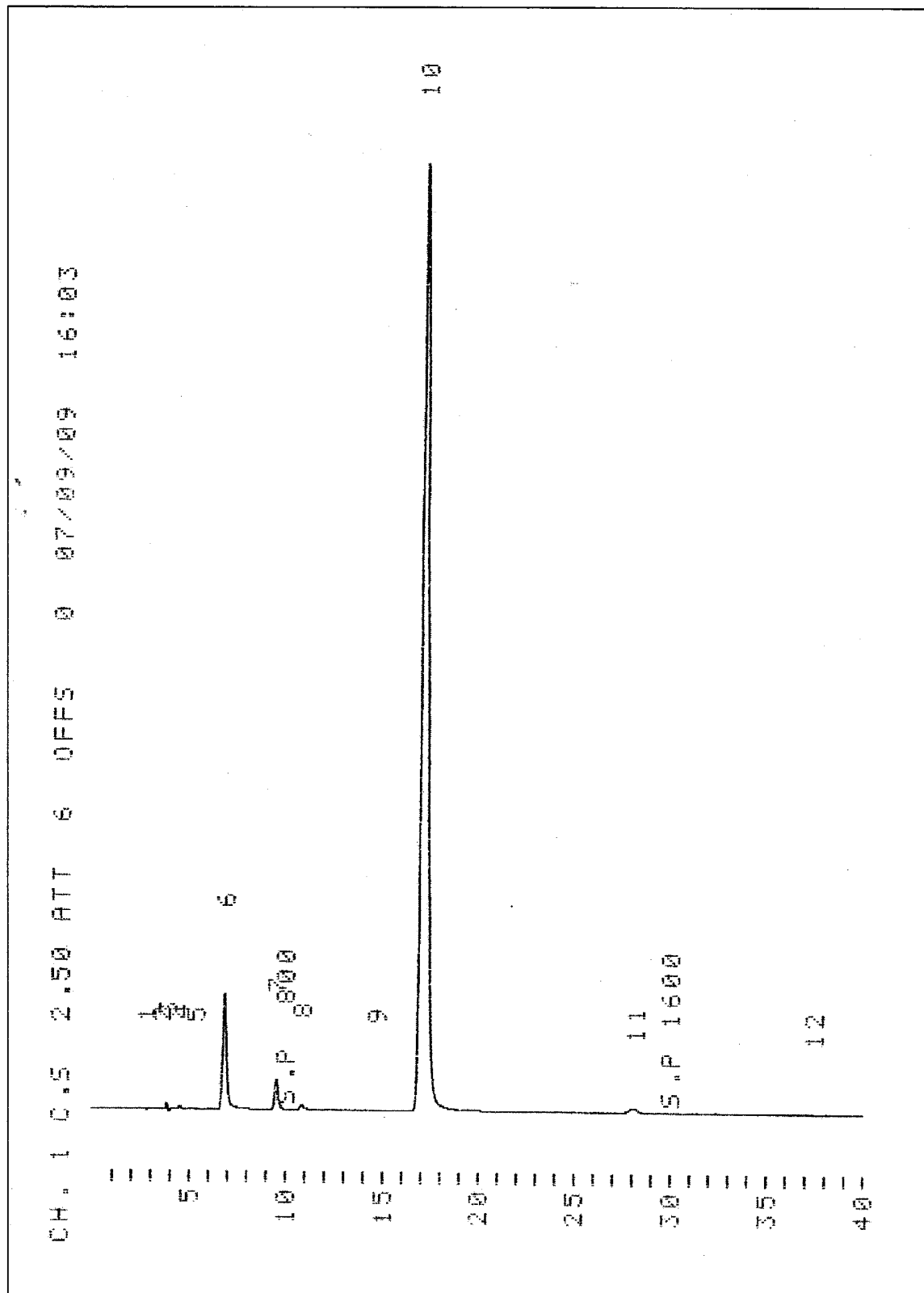
〔Ⅲ〕

（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）

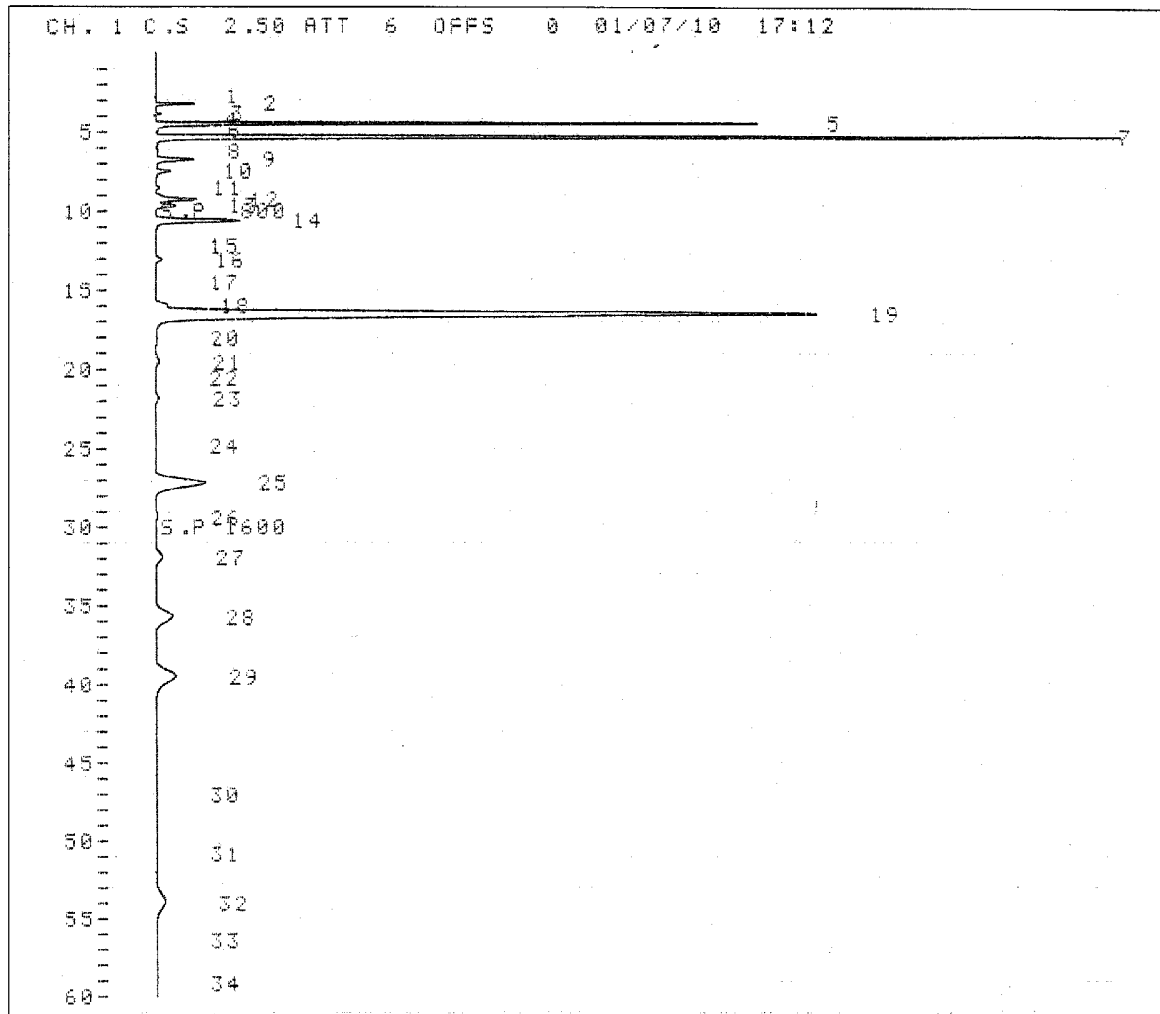
- [請求項2]           リン酸活性化化合物がUDP-リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がUDPまたはUDP塩である、請求項1記載の製造法。
- [請求項3]           リン酸活性化化合物がUMP-リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がUTP塩である、請求項1記載の製造法。
- [請求項4]           リン酸活性化化合物がUMP-リン酸イミダゾリドであり、リン酸化合物がピロリン酸またはピロリン酸塩である、請求項1記載の製造法。
- 。
- [請求項5]           リン酸活性化化合物がピロリン酸ジイミダゾリドであり、リン酸化合物がUMPまたはUMP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。



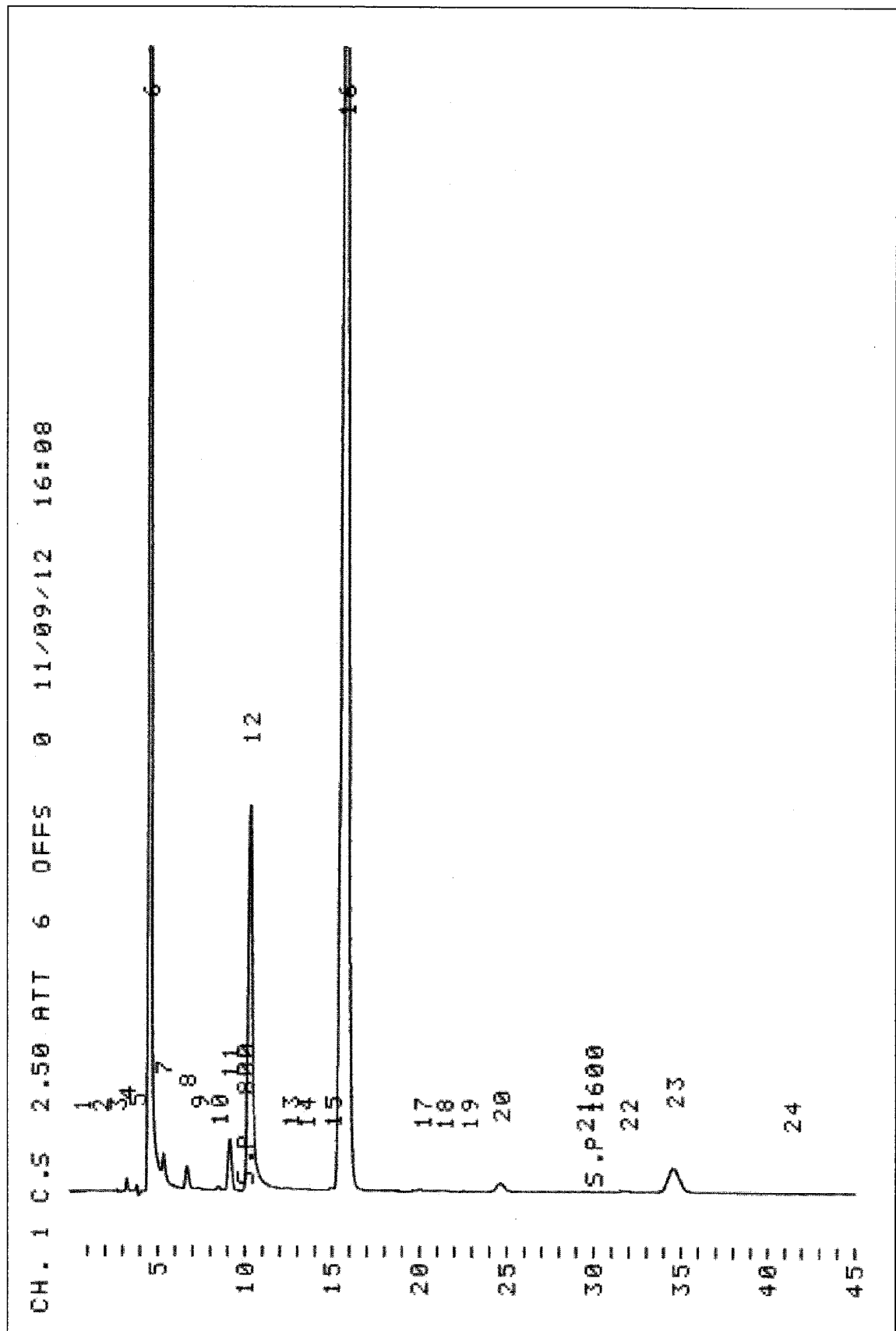
[図1]



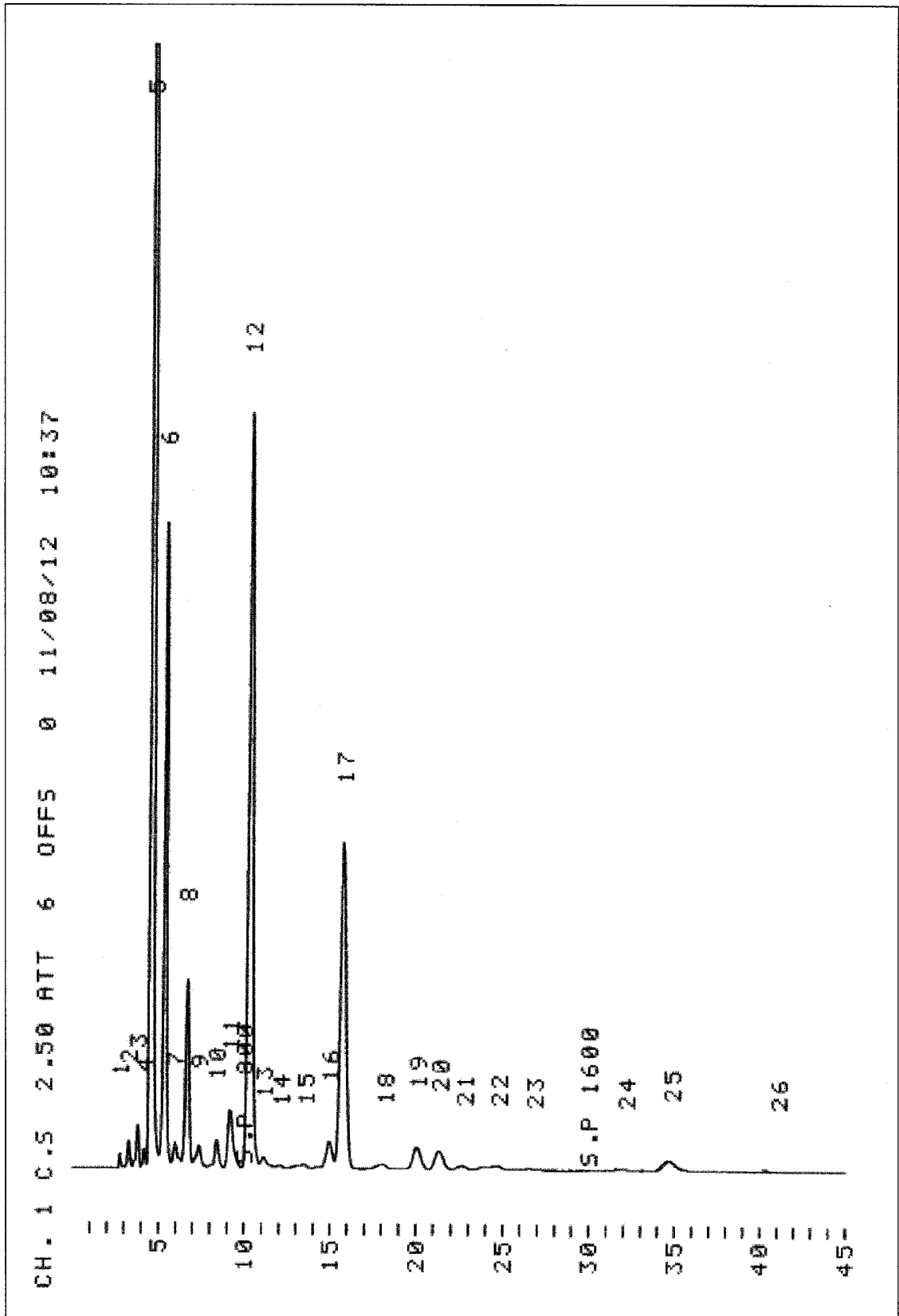
[図2]



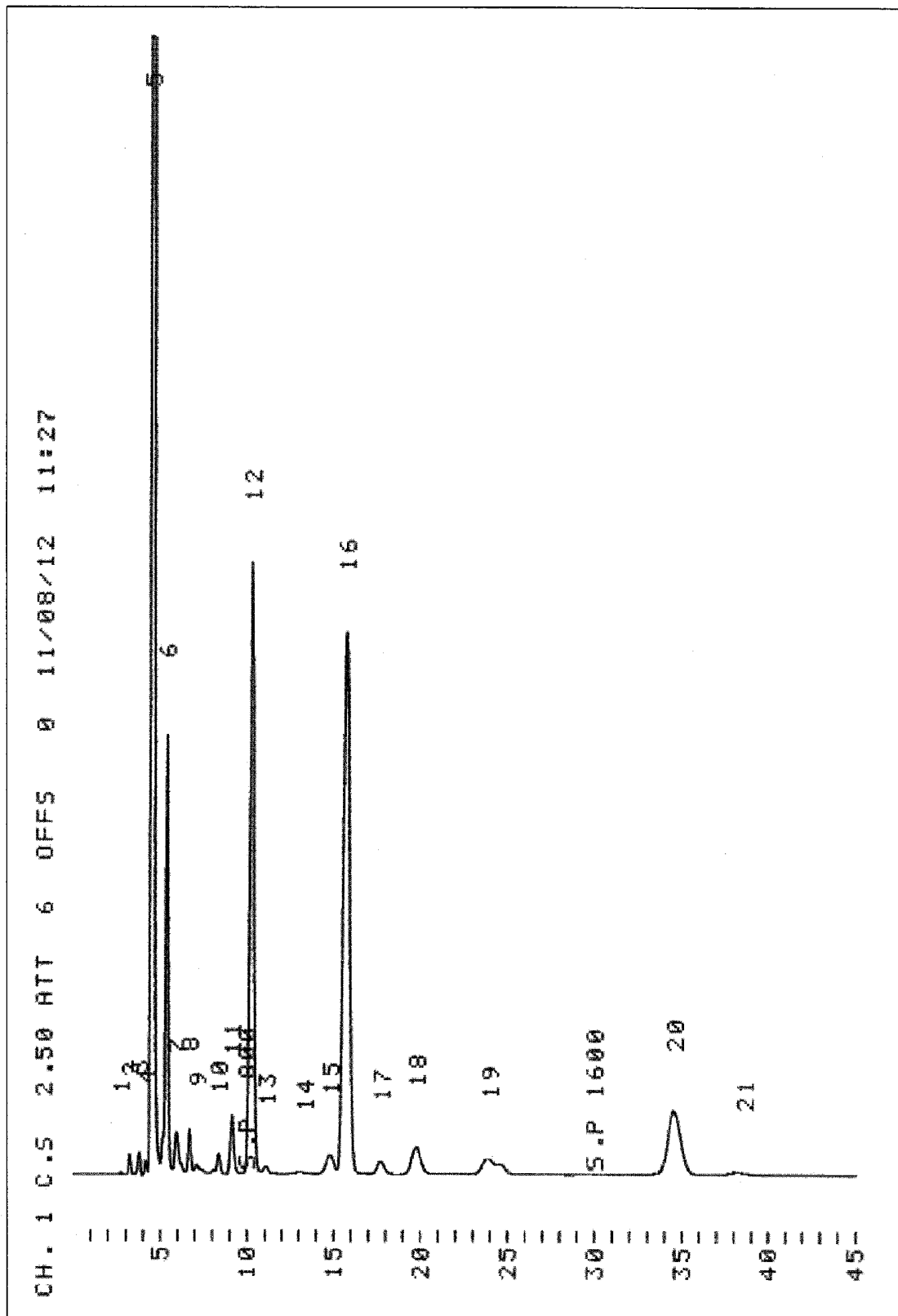
[図3]



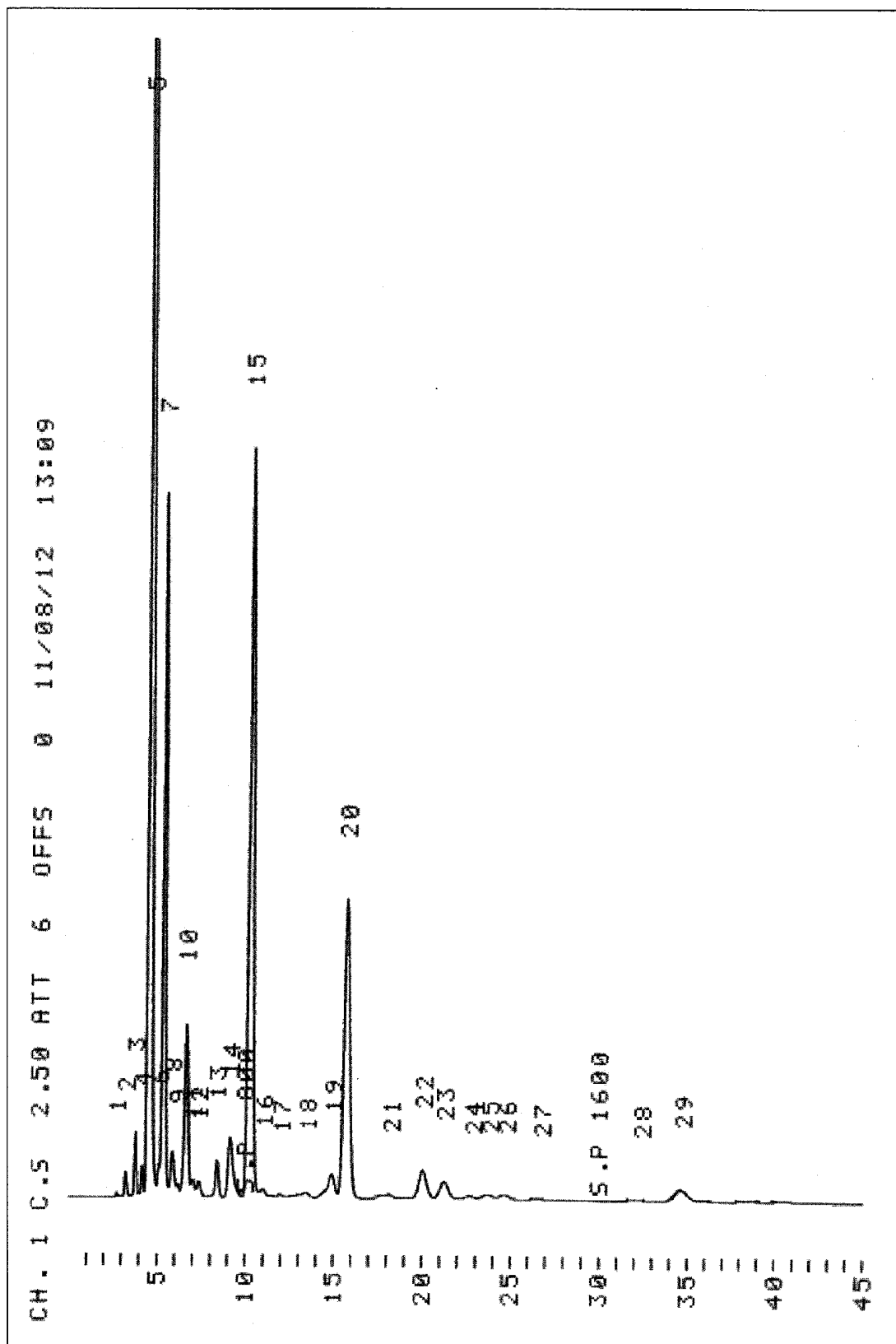
[図4]



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/083100

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H19/10(2006.01)i, A61K31/7072(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)n,  
A61P11/00(2006.01)n, A61P11/10(2006.01)n, C07B61/00(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H19/10, A61K31/7072, A61K31/7105, A61P11/00, A61P11/10, C07B61/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAplus/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/012949 A1 (Yamasa Corp.), 31 January 2008 (31.01.2008), entire text; particularly, claims; examples; table 1 & US 2010/16567 A1 & EP 2045257 A1	1-8
A	SHIMAZU, Masamitsu et al., Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by manganese(II) and cadmium(II) ion-catalyzed pyrophosphate bond formation in aqueous solution, Tetrahedron Letters, 1990, Vol.31, No.2, pp.235-238	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 January, 2014 (08.01.14)

Date of mailing of the international search report  
21 January, 2014 (21.01.14)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/083100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG, Kaisheng et al., Engineering Human Fhit, a Diadenosine Triphosphate Hydrolase, into an Efficient Dinucleoside Polyphosphate Synthase, Journal of the American Chemical Society, 2004, Vol.126, No.31, pp.9548-9549	1-8



## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07H19/10(2006.01)i, A61K31/7072(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)n, A61P11/00(2006.01)n, A61P11/10(2006.01)n, C07B61/00(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07H19/10, A61K31/7072, A61K31/7105, A61P11/00, A61P11/10, C07B61/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2008/012949 A1（ヤマサ醤油株式会社）2008.01.31, 全文、特に請求の範囲、実施例、表 1 & US 2010/16567 A1 & EP 2045257 A1	1-8
A	SHIMAZU, Masamitsu et al., Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by manganese(II) and cadmium(II) ion-catalyzed pyrophosphate bond formation in aqueous solution, Tetrahedron Letters, 1990, Vol.31, No.2, pp.235-238	1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）  
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5  
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

三上 晶子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

4 P

4 0 4 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	HUANG, Kaisheng et al., Engineering Human Fhit, a Diadenosine Triphosphate Hydrolase, into an Efficient Dinucleoside Polyphosphate Synthase, Journal of the American Chemical Society, 2004, Vol.126, No. 31, pp. 9548-9549	1-8