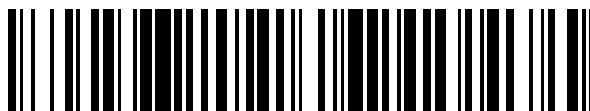


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 743**

51 Int. Cl.:

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 1/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/JP2013/083100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14103704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13869663 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2940030**

54 Título: **Procedimiento para producir P¹,P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato**

30 Prioridad:

28.12.2012 JP 2012287578

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.08.2017

73 Titular/es:

**YAMASA CORPORATION (100.0%)
10-1, Araoicho 2-chome
Choshi-shiChiba 288-0056, JP**

72 Inventor/es:

YAMADA, KOHEI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 629 743 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir P¹,P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un novedoso procedimiento eficaz para producir P¹,P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato.

Técnica antecedente

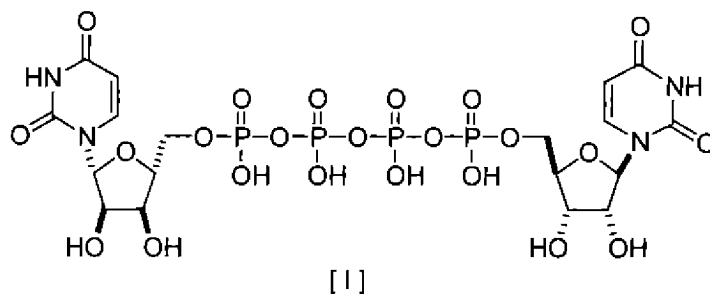
10

Se usa P¹, P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato (en lo sucesivo en este documento "UP₄U") representado por la siguiente fórmula [I] o una sal del mismo como fármaco terapéutico para el trastorno del epitelio queratoconjuntivo que acompaña al ojo seco y es también un compuesto que tiene un efecto inductor de la expectoración y por tanto se prevé que se desarrolle como un expectorante o un fármaco terapéutico para la neumonía.

15

Convencionalmente, como procedimiento para sintetizar UP₄U, se ha presentado un procedimiento para hacer reaccionar el ácido uridina 5'-trifosfórico cíclico preparado por condensación de deshidratación de ácido uridina 5'-trifosfórico (UTP) con ácido uridina 5'-monofosfórico (UMP) (Documento de no Patente 1) y un procedimiento mejorado del mismo (Documento de Patente 1).

20

**Listado de citas**25 **Documentos de Patentes**

Documento de Patente 1: WO 2008/012949 A

Documento de Patente 2: WO 2008/024169 A

30 **Documentos de no Patentes**

Documento de no Patente 1: Bioorg. & Medicinal Chemistry Letters, vol. 11, 157 a 160 (2001),

Documento de no Patente 2: Org. Biomol. Chem., 2011, N.º 9, 730 to 738 (2011)

35 **Shaver y col., Purinergic Signalling, 2005, 1, 183-191 divulga relaciones de la actividad estructural de los dinucleósidos.****Sumario de la invención**40 **Problema técnico**

Sin embargo, la técnica anterior descrita en los documentos anteriores tenía margen de mejora en los puntos siguientes.

45 **En primer lugar, el procedimiento del Documento de Patente 1 puede sintetizar UP₄U con un alto rendimiento de 80 % o más a nivel de laboratorio, pero plantea problemas en la producción en masa a escala industrial por el procedimiento.**

Específicamente, en el procedimiento del Documento de Patente 1, es necesario usar un material de partida UTP en una forma de sal de una amina terciaria tal como tri-n-butilamina, con el fin de llevar a cabo una reacción para formar ácido 5'-trifosfórico cíclico a partir de 5'-UTP. Por lo tanto, es necesario un procedimiento para preparar previamente una sal trisódica de UTP en una UTP libre (libre de UTP) mediante una cromatografía en columna de intercambio iónico y, entonces formar una sal con una amina terciaria. Sin embargo, como se verifica en los ejemplos de ensayo expuestos a continuación, el material libre de UTP es muy inestable, por tanto, es muy difícil usar UTP libre como material de partida en la producción en masa a escala industrial.

55

En segundo lugar, con el fin de sintetizar eficientemente ácido 5' trifosfórico cíclico a partir de UTP, es necesario mantener la sal de tributilamina de UTP en un estado deshidratado inmediatamente antes de la reacción. Sin embargo, como se verifica también en el ensayo comparativo expuesto a continuación, en la producción en masa a escala industrial, cuando la sal de tri-n-butilamina de UTP se deshidrata azeotrópicamente, se produce una reacción de descomposición térmica de UTP y por tanto la pureza de UTP se reduce y, por consiguiente, se reduce la eficiencia sintética.

Como se ha descrito anteriormente, no se puede decir que el procedimiento del Documento de Patente 1 que usa UTP como material de partida sea un procedimiento óptimo para la producción industrial en masa de UP₄U. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es desarrollar un nuevo procedimiento de producción que pueda evitar la reducción de la eficiencia sintética debido a la descomposición de un material de partida, al no usar UTP libre, o evitando la operación de deshidratación de la sal de UTP para sintetizar ácido uridina 5'-trifosfórico cíclico.

Solución al problema

Como procedimiento para evitar los problemas en el procedimiento de síntesis descrito en el Documento de Patente 1, se consideran, o ya se conocen, los dos procedimientos siguientes mostrados en los siguientes A y B.

(A) Un procedimiento para sintetizar UP₄U, usando UMP no UTP como material de partida, preparando UTP a partir de UMP en el sistema de reacción y aplicando entonces el procedimiento del Documento de Patente 1 sin purificación (en lo sucesivo en este documento "procedimiento de síntesis en un solo recipiente").

(B) Un procedimiento para sintetizar UP₄U activando un ácido pirofosfórico por imidazol para sintetizar pirofosfato de diimidazolilo y condensarlo con UMP (en lo sucesivo en este documento "antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo", Documento de Patente 2, Documento de no Patente 2).

Sin embargo, el procedimiento de síntesis en un solo recipiente y el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo se realizaron ambos usando un disolvente orgánico tal como dimetilformamida (DMF) como disolvente de reacción de síntesis de UP₄U en medio anhidro. Por otra parte, UMP, UTP, ácido pirofosfórico y similares usados como materiales de partida de la reacción son todos compuestos altamente hidrófilos, por tanto estos materiales de partida deben someterse a una etapa de deshidratación en cada procedimiento, con el fin de someterse a la reacción. En concreto, un pirofosfato tenía el problema de que la solubilidad en un disolvente orgánico es también pobre, el manejo requiere precaución y similares.

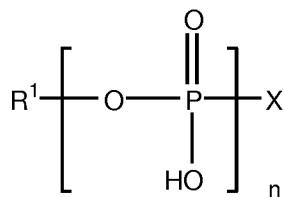
Asimismo, los presentes inventores estudiaron adicionalmente para los dos procedimientos de síntesis mejorados anteriores. En primer lugar, cuando se estudió en detalle el procedimiento de síntesis en un solo recipiente, el rendimiento del producto objetivo UP₄U se redujo en gran medida hasta aproximadamente un 40 %, como se muestra en los ejemplos expuestos a continuación. Además, cuando se llevó a cabo el procedimiento del Documento de Patente 1 como el procedimiento de síntesis en un solo recipiente, se generaron diversos subproductos, por tanto, se puso de manifiesto que es necesaria una purificación compleja mediante cromatografía en columna para la separación.

A continuación, también se estudió en detalle el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo. Como resultado, se descubrió recientemente que los subproductos se generaron mucho también en el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo y el rendimiento de UP₄U, un producto final, relativo a UMP está lejos de ser alto, como se muestra en los ejemplos expuestos a continuación. Más específicamente, se hizo evidente que tanto el procedimiento en un solo recipiente como el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo no se pueden poner como un procedimiento de síntesis adecuado para la producción en masa de UP₄U a escala industrial.

Por lo tanto, los presentes inventores han realizado estudios exhaustivos para establecer un procedimiento eficiente para sintetizar UP₄U adecuado para la producción industrial en masa y por consiguiente, han descubierto que, mediante un simple procedimiento de combinar (a) un compuesto activador de ácido fosfórico sintetizado por condensación de ácido uridina 5-difosfórico (UDP), UMP o un ácido pirofosfórico con un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, bencimidazol y 1,2,4-triazol que tiene opcionalmente un sustituyente y (b) un compuesto de ácido fosfórico seleccionado entre el grupo que consiste en UMP, UDP, UTP y un ácido pirofosfórico o una sal del mismo (excluyendo UTP libre) y hacer reaccionar los compuestos en agua o un disolvente orgánico hidrofílico, en presencia de un ión metálico seleccionado entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ión de hierro (III), un ión de aluminio trivalente, un ión de lantano trivalente y un ión de cerio trivalente, como catalizador, se podría evitar el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP y UP₄U se podría sintetizar con un alto rendimiento con menos subproducto. La presente invención se ha logrado sobre la base de este hallazgo.

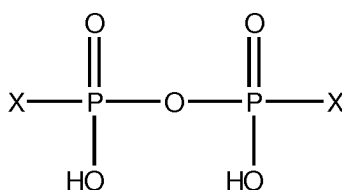
Más específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para producir P¹,P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato, que comprende hacer reaccionar un compuesto activador de ácido fosfórico representado por la siguiente fórmula [II] o [III] con un compuesto de ácido fosfórico seleccionado entre el grupo que consiste en UMP, UDP, UTP y un ácido pirofosfórico o una sal del mismo (excluyendo UTP libre) en agua o un disolvente orgánico hidrofílico, en presencia de un ión metálico seleccionado entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ión

de hierro (III), un ión de aluminio trivalente, un ión de lantano trivalente y un ión de cerio trivalente.



[II]

- 5 donde R¹ representa un grupo uridilo que se une a la posición 5'; X representa un grupo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo; y n representa un número entero de 1 o 2.



[III]

- 10 donde X representa un grupo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo.

Efectos ventajosos de la invención

- 15 El procedimiento de producción de la presente invención puede sintetizar UP₄U con un alto rendimiento, evitando al mismo tiempo el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP. Asimismo, en el procedimiento de producción de la presente invención, casi no se produce ningún subproducto, por tanto es fácil la purificación de UP₄U. Además, se lleva a cabo una reacción en condiciones hidrofílicas, a través de la cuál se puede omitir una
20 etapa de deshidratación complicada. Más específicamente, el procedimiento de producción de la presente invención es muy adecuado para la síntesis industrial en masa de UP₄U.

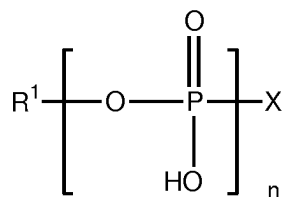
Breve descripción de los dibujos

- 25 La Fig. 1 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el procedimiento de la presente invención. En la figura, el 10° pico ilustra un producto objetivo UP₄U y el 6° pico ilustra un material de partida UDP.
La Fig. 2 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el procedimiento de síntesis en un solo recipiente. En la figura, el 19° pico ilustra un producto
30 objetivo UP₄U y el 5° pico ilustra un material de partida UMP.
La Fig. 3 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el procedimiento de la presente invención. En la figura, el 16° pico ilustra un producto objetivo UP₄U y el 6° pico ilustra un material de partida UMP.
La Fig. 4 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (sin catalizador). En la figura, el 17° pico
35 ilustra un producto objetivo UP₄U y el 5° pico ilustra un material de partida UMP.
La Fig. 5 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (catalizador ZnCl₂). En la figura, el 16° pico ilustra un producto objetivo UP₄U y el 5° pico ilustra un material de partida UMP.
La Fig. 6 ilustra un gráfico de HPLC que analiza un producto en una mezcla de reacción cuando se sintetiza UP₄U mediante el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (catalizador tetrazol). En la figura, el 20°
40 pico ilustra un producto objetivo UP₄U y el 5° pico ilustra un material de partida UMP. Descripción de las realizaciones

- 45 Más adelante en el presente documento, se describirá en detalle la realización de la presente invención.

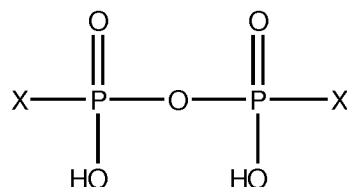
<Compuesto activador de ácido fosfórico>

El compuesto activador de ácido fosfórico usado en la presente invención es un compuesto representado por la fórmula [II] o [III], y sintetizado por condensación de UMP, UDP o un ácido pirofosfórico con imidazol, bencimidazol o 1,2,4 triazol que tiene opcionalmente un sustituyente.



[II]

donde R¹ representa un grupo urídilo que se une a la posición 5'; X representa un grupo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo; y n representa un número entero de 1 o 2.



[III]

donde X representa un sustituyente heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo.

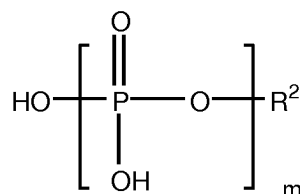
El sustituyente heterocíclico representado por X incluye un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo, un grupo 1,2,4-triazolilo y similares. Asimismo, estos grupos heterocíclicos pueden tener un sustituyente en el grupo heterocíclico y ejemplos del sustituyente incluyen grupos alquilo C₁₋₆, grupos nitro, grupos ciano y similares.

El compuesto activador de ácido fosfórico descrito anteriormente incluye específicamente UDP-imidazolida, UDP-triazolida, UMP-imidazolida, pirofosfato de diimidazolilo y similares y estos compuestos se pueden preparar de acuerdo con un procedimiento conocido (Nudeic Acids Research, vol. 4, 2843 (1977), Journal of American Chemical Society, vol. 126, 9548 (2004)).

En la síntesis de UP₄U, se puede usar una mezcla del compuesto activador de ácido fosfórico tal como UDP-imidazolida, UDP-triazolida, UMP-imidazolida o pirofosfato de diimidazolilo o una solución concentrada de la misma tal como está o usarse después de purificada según sea necesario.

<Compuesto de ácido fosfórico>

El compuesto de ácido fosfórico de la presente invención es un compuesto representado por la siguiente fórmula (IV) o una sal del mismo y específicamente incluye UMP, UDP, UTP, un ácido pirofosfórico y sus sales, excepto UTP libre.



[IV]

donde R² representa un grupo urídilo que se une al átomo de hidrógeno o a la posición 5'; y m representa un número entero de 1 a 3.

El compuesto de ácido fosfórico se puede usar en forma de una sal de metal alcalino tal como sodio y potasio, una sal de amonio terciaria tal como trietilamonio y tributilamonio y una sal de amonio cuaternario tal como sal de tetraetilamonio y tetrabutilamonio.

5 <Combinación de compuestos de material de partida>

La combinación de compuestos de material de partida del compuesto activador de ácido fosfórico y el compuesto de ácido fosfórico descritos anteriormente se puede determinar apropiadamente y es adecuada para usar preferentemente en las siguientes combinaciones.

10

- Combinación 1: combinación de compuesto activador de UDP y UDP o sal de UDP
- Combinación 2: combinación de compuesto activador de UMP y sal de UTP
- Combinación 3: combinación de compuesto activador de UMP y ácido pirofosfórico o pirofosfato
- Combinación 4: combinación de compuesto activador de ácido pirofosfórico y UMP o sal de UMP

15

En cualquier combinación, se prefiere cuando la relación molar del compuesto activador de ácido fosfórico y el compuesto de ácido fosfórico en la reacción de condensación se establece en el intervalo de 1:10 a 10:1, ya que se mejora el rendimiento de UP₄U. La relación molar es, por ejemplo,

20

- (1) en la combinación 1 anterior, la relación molar es 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2 o 10:1,
- (2) en la combinación 2 anterior, la relación molar es 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4 u 8:3,
- (3) en la combinación 3 anterior, la relación molar es 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, o 10:1, y adicionalmente,
- (4) en la combinación 4 anterior, la relación molar es 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, o 10:1, y

25

también puede estar dentro del intervalo de cualquiera de los dos valores numéricos ejemplificados en este documento.

<Ión metálico>

30

El ion metálico usado en la presente invención se añade a una solución, en forma de una sal metálica que contiene un ion metálico objetivo, convirtiéndose de este modo en un ion metálico en agua o en un disolvente orgánico hidrofílico y se puede proporcionar al sistema de reacción. Como tipo de la sal metálica, se puede sugerir un haluro metálico, una sal inorgánica metálica, una sal orgánica metálica y similares. Como ejemplos específicos adicionales, se prefiere usar (i) cloruro ferroso, cloruro férrico, bromuro férrico, tricloruro de aluminio, tridloruro de cerio, tricloruro de lantano y similares como ejemplos del haluro metálico, (ii) sales inorgánicas tales como sulfato, nitrato, ácido perclórico y similares de un metal seleccionado entre el grupo que consiste en hierro (divalente), hierro (trivalente), aluminio, cerio y lantano como ejemplos de la sal inorgánica metálica y (iii) trifluorometanosulfonato, acetato, trifluoroacetato, citrato y similares de un metal seleccionado entre el grupo que consiste en hierro (divalente), hierro (trivalente), aluminio, cerio y lantano como ejemplos de la sal orgánica metálica, ya que se mejora el rendimiento de UP₄U. Entre ellas, es preferente una sal férrica y cloruro férrico es particularmente preferente, desde el punto de vista del rendimiento de síntesis y facilidad de manipulación. En este documento, la sal metálica a usar puede ser anhídrido o hidruro. Sin embargo, entre las combinaciones del compuesto activador de ácido fosfórico y del compuesto de ácido fosfórico, particularmente en el caso de la Combinación 4, es particularmente preferente usar ión de hierro (III), ión de aluminio trivalente o similares.

45

Con el fin de mejorar el rendimiento de UP₄U, la sal metálica que es una fuente de iones metálicos, se usa preferentemente en una cantidad molar de 0,001 a 10 veces el número molar total del compuesto de ácido fosfórico usado en la reacción y particularmente preferente usado en una cantidad molar de 0,001 a 1 veces. Por ejemplo, la cantidad de esta sal metálica es una cualquiera de las cantidades molares de 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1 veces el número molar total del compuesto de ácido fosfórico usado en la reacción y puede estar dentro de cualquiera de los dos valores numéricos ejemplificados en este documento.

50

<Condiciones de la reacción de condensación y purificación>

55

La reacción de condensación del compuesto activador de ácido fosfórico y del compuesto de ácido fosfórico en la presente invención se realiza usando agua o un disolvente orgánico hidrofílico como disolvente. Desde el punto de vista del rendimiento de síntesis y facilidad de manipulación, se pueden usar alcoholes que tienen seis o menos átomos de carbono tales como metanol o etanol, cetonas tales como acetona, éteres tales como dioxano, nitrilos tales como acetonitrilo y amidas tales como dimetilformamida como disolvente orgánico hidrofílico.

60

En esta reacción de condensación, el pH de reacción es preferentemente de 7 o menos y particularmente preferentemente de aproximadamente 1 a 4, con el fin de mejorar el rendimiento de UP₄U. Asimismo, en esta reacción de condensación, la temperatura de reacción es preferentemente de 0 °C a 60 °C, con el fin de mejorar el rendimiento de UP₄U. En la combinación de los compuestos de material de partida anteriores, es particularmente preferente una temperatura de reacción de 20 a 30 °C en el caso de la Combinación 1 a la Combinación 3 y una temperatura de reacción de 0 a 20 °C es particularmente preferente en el caso de la Combinación 4. El período de

65

tiempo de esta reacción de condensación es preferentemente de alrededor de 1 a 36 horas y particularmente preferentemente de 2 a 20 horas, con el fin de realizar la necesaria y suficiente reacción de condensación.

5 Después de la finalización de la reacción de condensación, se combinan apropiadamente los procedimientos usados para la purificación de aislamiento general del nucleótido (p.ej., procedimiento de cristalización, cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía en columna de adsorción, cromatografía en columna de carbono activado, etc.), a través de los cuales se puede separar y purificar el UP₄U producido y también se puede proporcionar en forma de sal según sea necesario.

10 Como resina de intercambio iónico usada en la cromatografía en columna de intercambio iónico, se puede usar una resina de intercambio aniónico fuertemente básica (p. ej., Amberlite IRA 402 [fabricada por Rohm & Haas], Diaion PA-312 o Diaion SA-11A [fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation], una resina de intercambio aniónico débilmente básica (p. ej., Amberlite IRA 67 [fabricada por Rohm & Haas] o Diaion WA-30 [fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation]), una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida (p. ej., Diaion PK-216 [fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation]), una resina de intercambio catiónico débilmente básica (p. ej., Diaion WK-30 [fabricada por Mitsubishi Chemical Corporation]) o similares.

20 El carbón activado usado puede ser carbón activado molido o granulado para cromatografía, por ejemplo, se puede usar carbón activado disponible en el mercado en Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Futamura Chemical Co., Ltd o similar.

25 Asimismo, se puede usar un procedimiento conocido para la cristalización y el cristal se obtiene añadiendo un disolvente orgánico hidrofílico a la UP₄U obtenida o una sal de la misma para la precipitación de cristales. Ejemplos del disolvente orgánico hidrofílico usado incluyen alcoholes que tienen seis o menos átomos de carbono tales como metanol y etanol, cetonas tales como acetona, éteres tales como dioxano, nitrilos tales como acetonitrilo, amidas tales como dimetilformamida y similares. Son preferentes los alcoholes y además, el etanol es particularmente preferente.

30 <Acción efecto de la presente invención>

30 Como se ha descrito anteriormente, en la presente invención, se usa un procedimiento de combinar (a) un compuesto activador de ácido fosfórico sintetizado por condensación de ácido uridina 5-difosfórico (UDP), UMP o un ácido pirofosfórico con un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, bencimidazol y 1,2,4-triazol que tiene opcionalmente un sustituyente y (b) un compuesto de ácido fosfórico seleccionado entre el grupo que consiste en UMP, UDP, UTP y un ácido pirofosfórico o una sal del mismo (excluyendo UTP libre) y hacer reaccionar los compuestos en agua o un disolvente orgánico hidrofílico, en presencia de un ión metálico seleccionado entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ión de hierro (III), un ión de aluminio trivalente, un ión de lantano trivalente y un ión de cerio trivalente, como un catalizador, a través del cuál la producción industrial en masa de UP₄U se puede llevar a cabo mediante un simple procedimiento como se muestra en los ejemplos expuestos a continuación.

45 Por otra parte, como ya se ha explicado, el procedimiento convencionalmente conocido del Documento de Patente 1 puede sintetizar UP₄U con un alto rendimiento de 80 % o más a nivel de laboratorio, pero plantea problemas en la producción en masa a escala industrial por el procedimiento. Específicamente, en el procedimiento del Documento de Patente 1, es necesario usar un material de partida UTP en una forma de sal de una amina terciaria tal como tri-n-butilamina, con el fin de llevar a cabo una reacción para formar 5'-trifosfato cíclico de uridina. Por lo tanto, es necesario un procedimiento para preparar previamente una sal trisódica de UTP en una UTP libre (libre de UTP) mediante cromatografía en columna de intercambio iónico y, entonces formar una sal con una amina terciaria. Sin embargo, como se verifica en los ejemplos de ensayo expuestos a continuación, el material libre de UTP es muy inestable, por tanto, es muy difícil usar UTP libre como material de partida en la producción en masa a escala industrial. Asimismo, con el fin de sintetizar eficientemente una reacción para formar 5'-trifosfato cíclico de uridina, es necesario mantener la sal de tri-n-butilamina de UTP en un estado deshidratado inmediatamente antes de la reacción. Sin embargo, como se muestra en el ensayo comparativo expuesto a continuación, en la producción en masa a escala industrial, cuando la sal de tri-n-butilamina de UTP se deshidrata azeotrópicamente, se produce una reacción de descomposición térmica de UTP y por tanto la pureza de UTP se reduce y, por consiguiente, se reduce la eficiencia sintética.

60 Asimismo, en el procedimiento del Documento de Patente 2 y Documento de No Patente 2, fue posible sintetizar UP₄U sin usar la etapa que usa UTP libre, pero el rendimiento relativo a UMP se redujo notablemente, como también se muestra en los ejemplos comparativos expuestos a continuación. Además, se generaron muchos subproductos y no se podría poner como procedimiento de producción adecuado para la producción industrial a gran escala.

65 Por otra parte, en el procedimiento de la presente invención, ya que el material de partida es UDP o UMP, no es necesario usar UTP libre, y además, la operación de deshidratación de la sal de UTP para sintetizar uridina 5'-trifosfato cíclico también se puede evitar, por tanto, se puede evitar la reducción de la eficiencia sintética debido a la descomposición de los materiales de partida, como se muestra en los ejemplos expuestos a continuación. Asimismo,

no es necesario deshidratar azeotrópicamente una sal de tri-n-butilamina de UTP, no se produce una reacción de descomposición térmica de UTP y así mismo, la pureza de UTP no se reduce por la generación de subproductos innecesarios, como se muestra en los ejemplos expuestos a continuación. Por lo tanto, el procedimiento de producción de la presente invención es un procedimiento muy adecuado para la síntesis industrial en masa de UP₄U.

En la presente invención, es preferente que el compuesto activador de ácido fosfórico sea UDP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico sea UDP o una sal de UDP. Es porque, en este caso, se verifica en los ejemplos expuestos a continuación que la síntesis de UP₄U se puede realizar con un alto rendimiento, evitando al mismo tiempo el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP que no son adecuadas para la producción industrial en masa.

Además, en la presente invención, es preferente que el compuesto activador de ácido fosfórico sea UMP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico sea UTP o una sal de UTP. Es porque, también en este caso, se verifica en los ejemplos expuestos a continuación que la síntesis de UP₄U se puede realizar con un alto rendimiento, evitando al mismo tiempo el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP que no son adecuadas para la producción industrial en masa.

Además, en la presente invención, es preferente que el compuesto activador de ácido fosfórico sea UMP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico sea un ácido pirofosfórico o una sal de ácido pirofosfórico. Es porque, también en este caso, se verifica en los ejemplos expuestos a continuación que la síntesis de UP₄U se puede realizar con un alto rendimiento, evitando al mismo tiempo el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP que no son adecuadas para la producción industrial en masa.

Además, en la presente invención, es preferente que el compuesto activador de ácido fosfórico sea pirofosfato de diimidazolilo y el compuesto de ácido fosfórico sea UMP o una sal de UMP. Es porque, también en este caso, se verifica en los ejemplos expuestos a continuación que la síntesis de UP₄U se puede realizar eficientemente, evitando al mismo tiempo el uso de UTP libre y la operación de deshidratación de la sal de UTP que no son adecuadas para la producción industrial en masa.

Además, en la presente invención, es preferente que el ión metálico se seleccione entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ion de hierro (III) y un ion de aluminio. En concreto, cuando el compuesto activador de ácido fosfórico es pirofosfato de diimidazolilo y el compuesto de ácido fosfórico es UMP libre o es una sal de UMP, es preferente que el ión metálico se seleccione entre el grupo que consiste en un ión de hierro (III) y un ión de aluminio. Es porque, también en este caso, se verifica en los ejemplos comparativos expuestos a continuación que la síntesis de UP₄U se puede realizar eficientemente, en comparación con el caso de usar otro ion metálico.

Además, en la presente invención, es preferente que el ión metálico se suministre en una forma de sal seleccionada entre el grupo que consiste en cloruro, bromuro, nitrato, sulfato y acetato del metal. Es porque, también en este caso, se verifica que la síntesis de UP₄U se puede realizar eficientemente.

Aunque las realizaciones de la presente invención se describen como antes, éstas son ilustraciones de la presente invención y también se pueden adoptar diversas constituciones distintas de las anteriores.

Ejemplos

Más adelante en el presente documento, la presente invención se describirá adicionalmente en detalle a modo de ejemplos, que no se deben interpretar como limitativos de la presente invención a este caso.

(Ejemplo 1) Combinación 1 (parte 1): Reacción de UDP-imidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

Se añadió dimetilacetamida (6,0 ml) a una solución acuosa de 0,32 M de sal de UDP-tributilamina (1,26 ml, 4,0 mmol) y la mezcla se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces. El residuo resultante se disolvió en dimetilacetamida (6,0 ml) y se añadió a esto carbonildiimidazol (1,95 g, 12,0 mmol), entonces la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla de reacción bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota una solución acuosa de 0,5 M de ácido clorhídrico (12,0 ml) (pH 7,0). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para preparar una solución de UDP-imidazolida.

Se añadió una solución acuosa de sodio UDP (2,0 mmol, 2,1 ml) a la solución de UDP-imidazolida bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió a esto una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico para preparar una solución mixta con pH 4,9. Se añadió a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (1,5 mmol, 1,5 ml) bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió a esto una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico para preparar una solución mixta con pH 1,6 y la solución mixta se agitó a 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se ajustó a pH 12 mediante la adición de una solución acuosa 6 M de hidróxido de sodio y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se ajustó a pH 7,6 mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M. La mezcla de reacción resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de

síntesis de UP₄U se calculó como 87 %.

La mezcla se concentró hasta 10 ml y se disolvió añadiendo hidrógeno fosfato de sodio (4,2 mmol) para depositar fosfato de hierro. La suspensión se dejó reposar a 4 °C durante una noche, entonces el precipitado se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se ajustó a pH 2,5 y entonces se ajustó a una solución de 30 ml para preparar una solución adsorbente en columna.

La desalinización de la solución adsorbente en columna se realizó mediante cromatografía en columna de carbono activado (cantidad de resina de 20 ml), y la solución de recuperación resultante se ajustó a pH 7 y se concentró, entonces se sometió a filtración por membrana. El residuo se concentró adicionalmente y se añadió etanol gota a gota al residuo, entonces se cristalizó a temperatura ambiente durante una noche. El cristal se filtró y se secó al vacío a 50 °C durante 3 horas para obtener 2,12 g (rendimiento de 75 % como tetrahidrato) de UP₄U.

(Ejemplo 2) Combinación1 (parte 2): Reacción de UDP-imidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

Se añadió una solución 5,64 M de imidazol-dimetilacetamida (0,5 ml) a una solución acuosa 0,94 M de sodio UDP (1,0 ml), y se añadió N,N-diisopropilcarbodiimida (0,73 ml, 4,7 mmol) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas a 50 °C durante 2 horas para preparar una mezcla de UDP y un UDP-imidazolida.

Se añadió a esto una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico bajo enfriamiento con hielo para preparar una solución mixta con pH 5,3. Posteriormente, se añadió a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (0,24 mmol, 0,24 ml) y se añadió adicionalmente a esto una solución acuosa 2 M de ácido dorrhídrico para preparar una solución mixta con pH 1,9 y la solución mixta se agitó a 25 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 63 %.

(Ejemplo 3) Combinación1 (parte 3): Reacción de UDP-imidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

Se añadió propionitrilo (3,0 ml) a una solución acuosa de 0,17 M de sal de UDP-tributilamina (11,8 ml, 2,0 mmol) y la mezcla se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces. El residuo resultante se disolvió en propionitrilo (3,0 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una suspensión de propionitrilo (2,0 ml) de 1,1'-carbonildiimidazol (0,97 g, 6,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y entonces se concentró a presión reducida para preparar una solución de UDP-imidazolida.

Se añadió sal UDP-disódica (0,53 g, 1,0 mmol) a la solución de UDP-imidazolida bajo enfriamiento con hielo y la solución mixta se ajustó a pH 3,9 mediante una solución acuosa 6 M de ácido dorrhídrico. Se añadió adicionalmente a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (15 µl, 0,02 mmol) y la solución mixta se agitó a 10 °C durante 27 horas. La mezcla de reacción se ajustó a pH 10 mediante la adición de una solución acuosa 7,5 M de hidróxido de sodio y entonces se agitó durante 1 hora bajo enfriamiento con hielo. Se añadió 10 ml de etanol a la mezcla de reacción bajo enfriamiento con hielo y la mezcla se dejó reposar a 4 °C durante una noche. El precipitado se recogió y se preparó a una solución acuosa de 20 ml con pH 7,5, entonces, la solución acuosa se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 94 %. Más específicamente, se ha puesto de manifiesto que incluso cuando la cantidad de catalizador de cloruro férrico usado se reduce enormemente, la reacción avanza correctamente.

(Ejemplo 4) Combinación1 (parte 4): Reacción de UDP-bencimidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = bencimidazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

Se disolvió sal UDP-disódica (0,5 g, 0,94 mmol) en 2,7 ml de agua y se añadió una solución de dimetilacetamida (1,8 ml) de bencimidazol (0,33 g, 2,82 mmol) y N,N-diisopropilcarbodiimida (0,44 ml, 2,82 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se destiló a presión reducida para preparar una mezcla de UDP y UDP-bencimidazolida.

Se añadió a esto 1 ml de agua y entonces se añadió a esto una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico bajo enfriamiento con hielo para ajustar el pH a 4,6. Se añadió a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (94 µl, 0,09 mmol) bajo enfriamiento con hielo y se añadió a esto adicionalmente una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico para preparar una solución mixta con pH 3,0 y la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas. La mezcla de reacción se ajustó a pH 12 mediante la adición de una solución acuosa 6 M de hidróxido de sodio y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se ajustó a pH 7,3 mediante la adición de ácido dorrhídrico 2 M. La mezcla resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 83 %.

(Ejemplo 5) Combinación1 (parte 5): Reacción de UDP-triazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = 1,2,4-triazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

Se añadió dimetilacetamida (2,0 ml) a una solución acuosa de 0,37 M de sal de UDP-tributilamina (1,6 ml, 0,6 mmol) y la mezcla se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces. El residuo resultante se disolvió en dimetilacetamida (2,0 ml) y se añadió a esto 1,1'-carbonildi-(1,2,4-triazol) (0,25 g, 1,5 mmol), entonces la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la solución de reacción bajo enfriamiento con hielo, y adicionalmente, se añadió una solución acuosa 0,5 M de ácido clorhídrico para tener un pH 7,4. La mezcla se concentró a presión reducida para preparar una solución de UDP-triazolida.

Se añadió una solución acuosa de sal de sodio UDP (0,25 mmol, 0,9 ml) a la solución de UDP-triazolida bajo enfriamiento con hielo y se añadió una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (0,19 mmol, 0,19 ml) (pH 6,3) y la mezcla se agitó a 25 °C durante 5 horas. La mezcla se ajustó a pH 12 mediante la adición de una solución acuosa 6 M de hidróxido de sodio y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se ajustó a pH 7,0 mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M. La mezcla resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 48 %.

(Ejemplo 6) Combinación 2: Reacción de UMP-imidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 1) y sal de sodio UTP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 3)

Se añadió tributilamina (0,25 ml, 1,1 mmol) a una solución acuosa 2,05 M de UMP libre (0,49 ml, 1,0 mmol) y la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Entonces, se añadió adicionalmente dimetilacetamida (1,5 ml) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente tres veces. La solución de sal de UMP-tributilamina resultante se disolvió en dimetilacetamida (1,5 ml), y se añadió a esto carbonildiimidazol (486 mg, 3,0 mmol), entonces la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota una solución acuosa 0,5 M de ácido clorhídrico (4,0 ml) (pH 7,2). La mezcla se concentró a presión reducida para preparar una solución de UMP-imidazolida.

La solución de UMP-imidazolida y una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico se añadieron a una solución acuosa 165 Mm de sal de sodio UTP (8,0 ml, 1,3 mmol) bajo enfriamiento con hielo para preparar una solución mixta con pH 5,1. Se añadió a esto una solución acuosa de cloruro férrico (0,5 mmol, 0,2 ml) bajo enfriamiento con hielo y la solución mixta se agitó a 25 °C durante 4 horas. La mezcla se sometió a filtración por membrana, entonces se ajustó a pH 10,4 mediante la adición de una solución acuosa 1 M de hidróxido de sodio (11 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Posteriormente, la mezcla se ajustó a pH 6,9 mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M (3,5 ml). La mezcla resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 67 %.

Posteriormente, como resultado de la purificación del mismo modo que en el Ejemplo 1, se obtuvieron 471 mg (50 % como tetrahidrato) del UP₄U objeto.

(Ejemplo 7) Combinación 3: Reacción de UMP-imidazolida (donde en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 1) y sal trietilamina de ácido fosfórico (donde, en la fórmula IV, R² = átomo de hidrógeno, m = 2)

Se añadió tributilamina (0,25 ml, 1,1 mmol) a una solución acuosa 2,05 M de UMP libre (0,49 ml, 1,0 mmol) y la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, se añadió adicionalmente dimetilacetamida (1,5 ml) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente tres veces. La sal de UMP-tributilamina resultante se disolvió en dimetilacetamida (1,5 ml), se añadió a esto carbonildiimidazol (486 mg, 3,0 mmol) y la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota una solución acuosa 0,5 M de ácido clorhídrico (4,0 ml) (pH 7,2). La mezcla se concentró a presión reducida para preparar una solución de UMP-imidazolida (esta operación se realizó dos veces).

Se añadió una solución acuosa 0,95 M de sal trietilamina de ácido pirofosfórico (1,1 ml, 1,0 mmol) a la solución de UMP-imidazolida bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (0,5 mmol, 0,5 ml). La mezcla se ajustó a pH 5,1 mediante la adición de una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico y entonces se agitó a 25 °C durante 5 horas. Después de agitar, la solución de UMP-imidazolida (1,0 mmol) preparada por separado se añadió a esto bajo enfriamiento con hielo y la solución mixta se ajustó además a pH 2,1 mediante una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico y se agitó a 25 °C durante 6 horas. Se añadió a esto una solución acuosa 6 M de hidróxido de sodio a esto para tener un pH 11 y la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, la solución mixta se ajustó a pH 7,6 mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M y se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 45 %.

(Ejemplo 8) Combinación 4: Reacción de pirofosfato de diimidazolilo (donde en la Fórmula III, X = imidazolilo) y UMP (donde, en la Fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 1)

Se añadió tributilamina (0,95 ml, 4,0 mmol) y formamida (2,0 ml) a una solución acuosa de 1,09 M de ácido pirofosfórico-sal de trietilamina (1,86 ml, 2,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente con dimetilformamida cuatro veces. El residuo resultante se disolvió en dimetilformamida (8 ml), se añadió a esto carbonildiimidazol (0,97 g, 6,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua

(0,2 ml) a la mezcla bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota una solución acuosa 2,0 M de ácido clorhídrico (1,5 ml) (pH 7). La mezcla se concentró a presión reducida para preparar una solución de pirofosfato de diimidazolilo.

- 5 Se añadió una solución acuosa libre de UMP (2,03 M, 2,47 ml, 5,0 mmol) a la solución de pirofosfato de diimidazolilo bajo enfriamiento con hielo. Además, se añadió a esto una solución acuosa 1 M de cloruro férrico (2 ml, 2,0 mmol) y la mezcla se ajustó a pH 2,4 mediante la adición de una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico y se agitó a 0 °C durante 5 horas. Se añadió a la mezcla una solución acuosa 6 M de hidróxido de sodio para tener un pH 6,3. Se añadió a esto agua para preparar una solución acuosa de 50 ml y la solución de reacción resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 51 %.

(Ejemplo de ensayo 1) Determinación de la estabilidad de UTP y un compuesto relacionado

- 15 Con el fin de evaluar la estabilidad de UTP libre, se examinaron la estabilidad de soluciones acuosas de UTP libre y de sal de sodio UTP (UTP-Na) y de una solución de dimetilacetamida de sal de UTP-tributilamina (UTP-TBA). Asimismo, también se determinó la estabilidad de soluciones acuosas libres de UDP y UDP-Na como control de comparación. La solución de cada sustancia se dejó reposar durante un determinado período a -20 °C, 25 °C o 50 °C y la concentración de cada sustancia se determinó por HPLC para calcular una velocidad de descomposición. En este documento, la velocidad de descomposición se definió como sigue [Ecuación 1].

[Ecuación 1]

Velocidad de descomposición (%) de cada sustancia = {100-(% de HPLC de cada sustancia en la determinación/% de HPLC de cada sustancia al comienzo del ensayo) x 100}

- 25 Como resultado, se puso de manifiesto que, como se muestra en la siguiente [Tabla 1] y [Tabla 2], UTP libre y UTP-TBA claramente tienen baja estabilidad durante el almacenamiento de la solución, en comparación con otros compuestos tales como sal de sodio UTP, UDP libre y sal de sodio UDP.

30

[Tabla 1]

	-20 °C, 18 h	25 °C, 8 h	25 °C, 24 h
16 mM de UTP libre	4 %	4 %	12 %
10 mM de UDP libre	-	0 %	0 %

(Los valores numéricos de la tabla indican una velocidad de descomposición en cada condición)

[Tabla 2]

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

35

(Los valores numéricos de la tabla indican una velocidad de descomposición en cada condición)

(Ensayo comparativo 1) Efecto catalizador del metal en la reacción de UDP-imidazolida (donde, en la Fórmula II, R¹ = 5'-uridilo, X = imidazolilo, n = 2) y sal de sodio UDP (donde, en la fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m = 2)

40

Se añadieron diversos catalizadores de metal (0,06 M) a una solución acuosa mixta de UDP-imidazolida y sal de sodio UDP en una relación molar de 1:1 (cada uno 0,15 M) y la mezcla se ajustó a pH 2 ± 0,3 mediante una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico. La cantidad producida de UP₄U después de 6 horas se determinó cuantitativamente a 25 °C por HPLC. El resultado se muestra en la Tabla 3.

45

[Tabla 3]

Catalizador	pH de reacción	Rendimiento de UP ₄ U
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 %

Catalizador	pH de reacción	Rendimiento de UP ₄ U
ZnCl ₂	2,2	7,0 %
Sin adición	2,1	2,8 %

Como resultado, se puso de manifiesto que se puede obtener UP₄U con un rendimiento particularmente alto cuando se usa cloruro ferroso, cloruro férrico, nitrato férrico, cloruro de aluminio, cloruro de lantano o cloruro de cerio como la sal metálica como catalizador.

5 (Ensayo comparativo 2) Efecto catalizador del metal en la reacción de pirofosfato de imidazolilo (donde, en la Formula III, X= imidazolilo) y UMP libre (donde, en la Fórmula IV, R² = 5'-uridilo, m= 1)

10 Se añadieron diversos catalizadores de metal (0,4 mmol) a una solución acuosa mixta de pirofosfato de diimidazolilo y UMP libre en una relación molar de 2:5 (0,4 mmol como pirofosfato de diimidazolilo) preparado en el procedimiento del Ejemplo 8 y la mezcla se ajustó a pH 2,5 ± 0,5 mediante una solución acuosa 2 M de ácido clorhídrico. La cantidad producida de UP₄U después de 5 horas se determinó cuantitativamente a 0 °C por HPLC. El resultado se muestra en la [Tabla 4].

15 [Tabla 4]

Catalizador	pH de reacción	Rendimiento de UP ₄ U
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 %
Sin adición	2,3	0 %

Como resultado, se puso de manifiesto que se puede obtener UP₄U con un rendimiento particularmente alto cuando se usa cloruro férrico o cloruro de aluminio como la sal metálica como catalizador cuando se usa la combinación de un compuesto activador de ácido pirofosfórico y UMP.

20 (Ensayo comparativo 3) Comparación del rendimiento de UP₄U y el nivel de producción de impurezas cuando se usa el procedimiento de síntesis en un solo recipiente y el procedimiento de la presente invención

25 El rendimiento del producto final de cada uno se comparó cuando se sintetizó UP₄U de cada uno usando el procedimiento de síntesis en un solo recipiente que es un procedimiento de síntesis que mejora el procedimiento habitual y evita una etapa usando UTP libre y el procedimiento del presente ejemplo. El procedimiento del presente ejemplo estaba de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1 anterior. La síntesis mediante el procedimiento de síntesis en un solo recipiente que cambia el procedimiento habitual se realizó mediante la siguiente etapa.

30 (1) Preparación de la solución de síntesis 1

35 Se añadió tri-n-butilamina (2,2 ml, 9,2 mmol) a una solución acuosa 2,05 M de UMP libre (2,1 ml, 4,3 mmol) y la solución mixta se agitó durante 20 minutos, entonces se deshidrató azeotrópicamente con N,N-dimetilacetamida (DMAC) cuatro veces. El residuo se disolvió en DMAC (5,5 ml) y se añadió a esto clorofosfato de difenilo (DPC) (1,1 ml, 5,2 mmol) a esto a 10 °C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió a esto tri-n-butilamina (4,1 ml, 17,2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos para preparar la solución de síntesis 1.

40 (2) Preparación de la solución de síntesis 2

45 Se añadió tri-n-butilamina (2,2 ml, 9,2 mmol) y DMAC (3,0 ml) a una solución acuosa 0,95 M de ácido pirofosfórico-sal de trietilamina (9,0 ml, 8,5 mmol), entonces la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente con piridina tres veces. Se añadió tri-n-butilamina (0,4 ml, 2,8 mmol) y piridina (4 ml) al residuo para preparar la solución de síntesis 2.

(3) Preparación de la solución de UMP-TBA

Se añadió tri-n-butilamina (1,7 ml, 6,9 mmol) a una solución acuosa 2,05 M de UMP libre (3,1 ml, 6,4 mmol) y la solución mixta se agitó durante 20 minutos, entonces se deshidrató azeotrópicamente con N,N-dimetilacetamida (DMAC) cuatro veces. El residuo se disolvió en DMAC (3,5 ml) para preparar la solución de UMP-TBA.

5 (4) Preparación de la solución de síntesis de UP₄U

La solución de síntesis 1 se añadió gota a gota a la solución de síntesis 2 a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora (se confirmó mediante análisis por HPLC que se produjo UTP aproximadamente un 60 %). Se añadió a esto N,N-diisopropilcarbodiimida (2,3 ml, 17,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, se añadió a esto la solución de UMP-TBA y el cloruro de magnesio-hexahidratado (1,7 g, 8,4 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 19 horas. Se añadió a esto agua (20 ml) a 0 °C, entonces la solución mixta se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentró a presión reducida, entonces se añadió a esto agua (50 ml) y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. El precipitado se eliminó por filtración para preparar una solución de UP₄U. UP₄U se determinó cuantitativamente por HPLC y el rendimiento de UMP se calculó como 42 %.

(Tratamiento de resultados- rendimiento)

Como resultado, mientras que el rendimiento de UDP fue de 87 % cuando se sintetizó UP₄U mediante el procedimiento de los presentes ejemplos, como se muestra en el Ejemplo 1 descrito anteriormente, el rendimiento de UMP fue solo de 42 % en el procedimiento de síntesis en un solo recipiente. Por tanto, se puso de manifiesto que el procedimiento de la presente invención consigue un rendimiento notablemente alto, en comparación con el procedimiento de síntesis en un solo recipiente.

25 (Tratamiento de resultados- subproductos)

Además, con el fin de comparar la diferencia de los niveles de producción de impurezas en el procedimiento del presente ejemplo y en el procedimiento de síntesis en un solo recipiente, el producto de la solución de reacción, después de sintetizar UP₄U para cada procedimiento, se analizó por HPLC. Los gráficos de HPLC se muestran en la [Fig. 1] y [Fig. 2]. Como se desprende de las Figs. 1 y 2, en el procedimiento de síntesis en un solo recipiente, subproductos distintos de UP₄U que es un producto o UMP que es un material de partida se generaron aproximadamente 48 % en la relación del área del gráfico de HPLC y también el número del tipo de subproductos es alto. Por otra parte, en el procedimiento de la presente invención, la relación de subproductos distintos de UP₄U o UDP que es un material de partida se redujo claramente 4,8 % y también el número del tipo de subproductos es muy bajo. Por tanto, en el procedimiento de la presente invención, la generación de subproductos se puede reducir notablemente, por tanto, el producto se puede sintetizar eficientemente y el aislamiento y la purificación son fáciles también.

Basándose en la comparación como se ha descrito anteriormente, se mostró que el procedimiento de la presente invención produce menos impurezas, en comparación con el procedimiento de síntesis en un solo recipiente y da un rendimiento notablemente mejorado, por tanto es muy adecuado como procedimiento de producción industrial en masa de UP₄U.

(Ensayo comparativo 4) Comparación del rendimiento de UP₄U y el nivel de producción de impurezas cuando se usa el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo y el procedimiento de la presente invención

El rendimiento del producto final de cada uno se comparó cuando se sintetizó UP₄U de cada uno usando el antiguo procedimiento de imidazolida y el procedimiento del presente ejemplo. El procedimiento del presente ejemplo estaba de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 8 anterior. La síntesis mediante el antiguo procedimiento de imidazolida se realizó mediante la siguiente etapa. Asimismo, respecto al catalizador usado en la reacción, se ha estudiado (1) el caso de no añadir catalizador en la reacción y (2) el caso de usar cloruro de cinc o (3) el caso de usar tetrazol como un catalizador, en referencia a procedimientos conocidos (se refiere al Documento de Patente 2 y Documento de No Patente 2).

55 (1) Caso sin catalizador

Se añadió tributilamina (0,95 ml, 4,0 mmol) y formamida (2,0 ml) a una solución acuosa de 1,09 M de ácido pirofosfórico-sal de trietilamina (1,86 ml, 2,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida. El residuo resultante se disolvió en dimetilformamida (8,0 ml) y se añadió a esto carbonildiimidazol (0,97 g, 6,0 mmol), entonces la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota a esto una solución acuosa 2,0 M de ácido clorhídrico (1,5 ml) (pH 7). La mezcla se concentró a presión reducida y adicionalmente se deshidrató azeotrópicamente dos veces con dimetilformamida para preparar una solución de pirofosfato de diimidazolilo anhidro.

Se añadió tributilamina (3,56 ml, 15,0 mmol) a una solución acuosa libre de UMP (2,03 M, 2,47 ml, 5,0 mmol) y la

solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida, entonces se añadió a esto dimetilformamida (2,0 ml) para preparar una solución de UMP-tributilamina anhidro. Esta solución se añadió a la solución de pirofosfato de diimidazolilo anhidro y la solución mixta se concentró a presión reducida y se agitó a 25 °C durante 48 horas. Se añadió agua a la mezcla para preparar una solución acuosa de 50 ml y la solución acuosa resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 10 %.

(2) Caso de usar cloruro de cinc como catalizador

Se añadió tributilamina (0,95 ml, 4,0 mmol) y formamida (2,0 ml) a una solución acuosa de 1,09 M de ácido pirofosfórico-sal de trietilamina (1,86 ml, 2,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida. El residuo resultante se disolvió en dimetilformamida (8,0 ml) y se añadió a esto carbonildiimidazol (0,97 g, 6,0 mmol), entonces la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota a esto una solución acuosa 2,0 M de ácido clorhídrico (1,5 ml) (pH 7). La mezcla se concentró a presión reducida y adicionalmente se deshidrató azeotrópicamente dos veces para preparar una solución de pirofosfato de diimidazolilo anhidro.

Se añadió tributilamina (3,56 ml, 15,0 mmol) a una solución acuosa libre de UMP (2,03 M, 2,47 ml, 5,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida, entonces se añadió a esto dimetilformamida (2,0 ml) para preparar una solución de UMP-tributilamina anhidro. Esta solución se añadió a la solución de pirofosfato de diimidazolilo anhidro y se añadió adicionalmente cloruro de cinc (1,34 g, 9,8 mmol), entonces la solución mixta se concentró a presión reducida y se agitó a 25 °C durante 5 horas. Se añadió agua a la mezcla para preparar una solución acuosa de 50 ml y la solución acuosa resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de UP₄U se calculó como 17 %.

(3) Caso de usar tetrazol como catalizador

Se añadió tributilamina (0,95 ml, 4,0 mmol) y formamida (2,0 ml) a una solución acuosa de 1,09 M de ácido pirofosfórico-sal de trietilamina (1,86 ml, 2,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida. El residuo resultante se disolvió en dimetilformamida (8,0 ml) y se añadió a esto carbonildiimidazol (0,97 g, 6,0 mmol), entonces la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla de reacción bajo enfriamiento con hielo y adicionalmente, se añadió gota a gota a esto una solución acuosa 2,0 M de ácido clorhídrico (1,5 ml) (pH 7). La mezcla se concentró a presión reducida y adicionalmente se deshidrató azeotrópicamente dos veces para preparar una solución de ácido pirofosfórico-diimidazolida anhidro.

Se añadió tributilamina (3,56 ml, 15,0 mmol) a una solución acuosa libre de UMP (2,03 M, 2,47 ml, 5,0 mmol) y la solución mixta se deshidrató azeotrópicamente cuatro veces con dimetilformamida, entonces se añadió a esto dimetilformamida (2,0 ml) para preparar una solución de UMP-tributilamina anhidro. Esta solución se añadió a la solución de ácido pirofosfórico-diimidazolida anhidro y se añadió adicionalmente 1 H-tetrazol (0,5 g, 7,2 mmol), entonces la solución mixta se concentró a presión reducida y se agitó a 25 °C durante 19 horas. Se añadió agua al líquido de reacción para preparar una solución acuosa de 50 ml y la solución acuosa resultante se determinó cuantitativamente mediante análisis por HPLC y el rendimiento de síntesis de UP₄U se calculó como 9%.

(4) Tratamiento de resultados-rendimiento

Para resumir el rendimiento de síntesis de UP₄U en el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida y el procedimiento de la presente invención, se da como se muestra en la [Tabla 5] como se describe a continuación. Más específicamente, se puso de manifiesto que el procedimiento de la presente invención consigue un rendimiento notablemente alto, en comparación con el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida que un procedimiento conocido.

[Tabla 5]

Procedimiento	Rendimiento de UP ₄ U
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida (sin catalizador)	10 %
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida (catalizador: cloruro de cinc)	17 %
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida (catalizador: tetrazol)	9 %
Procedimiento de la presente invención (Ejemplo 8)	51 %

(5) Tratamiento de resultados-subproductos

Además, con el fin de comparar la diferencia de los niveles de producción de impurezas en el procedimiento de la presente invención y en el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida, el producto del líquido de reacción, después de sintetizar UP₄U para cada procedimiento, se analizó por HPLC. Los gráficos de HPLC se muestran en la

[Fig. 3] a [Fig. 6]. Asimismo, en el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolida y en el procedimiento del presente ejemplo, la relación de los subproductos distintos de UP₄U que es un producto o UMP que es un material de partida en el área del gráfico de HPLC es como se muestra en la [Fig. 6] descrita anteriormente.

5 Como se desprende de las Figs. 3 a 6 y de la Tabla 6, en el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo, subproductos distintos de UP₄U que es un producto o UMP que es un material de partida se generaron tanto como aproximadamente 40 % en la relación del área del gráfico de HPLC y también el número del tipo de subproductos es alto. Por otra parte, en el procedimiento de la presente invención, la relación de subproductos distintos de UP₄U o la UMP que es un material de partida se redujo drámente como 16 % y también el número del tipo de subproductos es muy bajo. Por tanto, en el procedimiento de la presente invención, la generación de subproductos se puede reducir notablemente, por tanto, el producto se puede sintetizar eficientemente y el aislamiento y la purificación son fáciles también.

[Tabla 6]

Procedimiento	Relación de área del subproducto
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (sin catalizador)	40 %
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (catalizador: cloruro de cinc)	39 %
Antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo (catalizador: tetrazol)	41 %
Procedimiento de la presente invención (Ejemplo 8)	16 %

15 Basándose en la comparación como se ha descrito anteriormente, se mostró que el procedimiento de la presente invención produce menos impurezas, en comparación con el antiguo procedimiento de pirofosfato de diimidazolilo y da un rendimiento notablemente mejorado, por tanto es muy adecuado como procedimiento de producción industrial en masa de UP₄U.

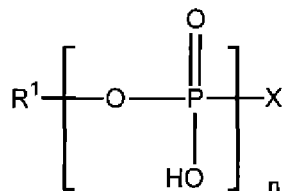
20 La presente invención se ha descrito anteriormente, basándose en los ejemplos. Los ejemplos son simplemente ejemplos y se entiende por una persona experta en la técnica que son posibles diversas modificaciones y las modificaciones están también en el alcance de la presente invención.

25 Por ejemplo, en los ejemplos anteriores, se usó una solución acuosa de cloruro férrico como la solución acuosa que contiene el ión metálico que se usó, pero no es la intención de limitar en concreto y se puede usar adecuadamente una solución acuosa que disuelve (i) cloruro ferroso, cloruro férrico, bromuro férrico, tricloruro de aluminio, tricloruro de cerio, tricloruro de lantano y similares como ejemplos del haluro metálico, (ii) sales inorgánicas de sulfato, nitrato, ácido perclórico y similares de un metal seleccionado entre el grupo que consiste en hierro (divalente), hierro (trivalente), aluminio, cerio y lantano como ejemplos de la sal inorgánica metálica o (iii) trifluorometanosulfonato, acetato, trifluoroacetato, citrato y similares de un metal seleccionado entre el grupo que consiste en hierro (divalente), hierro (trivalente), aluminio, cerio y lantano como ejemplos de la sal orgánica metálica. Una persona experta en la técnica puede entender fácilmente que el rendimiento de UP₄U se mejora así como los ejemplos anteriores también, cuando se usa la solución acuosa que contiene estos iones metálicos.

35

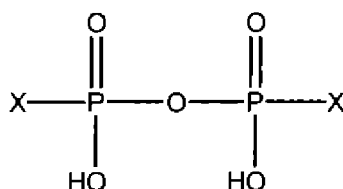
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir P¹,P⁴-di(uridina 5'-)tetrafosfato, que comprende hacer reaccionar un compuesto activador de ácido fosfórico representado por la siguiente fórmula [II] o [III] con un compuesto de ácido fosfórico seleccionado entre el grupo que consiste en UMP, UDP, UTP y un ácido pirofosfórico o una sal del mismo, excluyendo UTP libre, en agua o un disolvente orgánico hidrofílico, en presencia de un ión metálico seleccionado entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ión de hierro (III), un ión de aluminio trivalente, un ión de lantano trivalente y un ión de cerio trivalente.



[II]

donde R¹ representa un grupo uridilo que se une a la posición 5'; X representa un grupo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo; y n representa un número entero de 1 o 2,

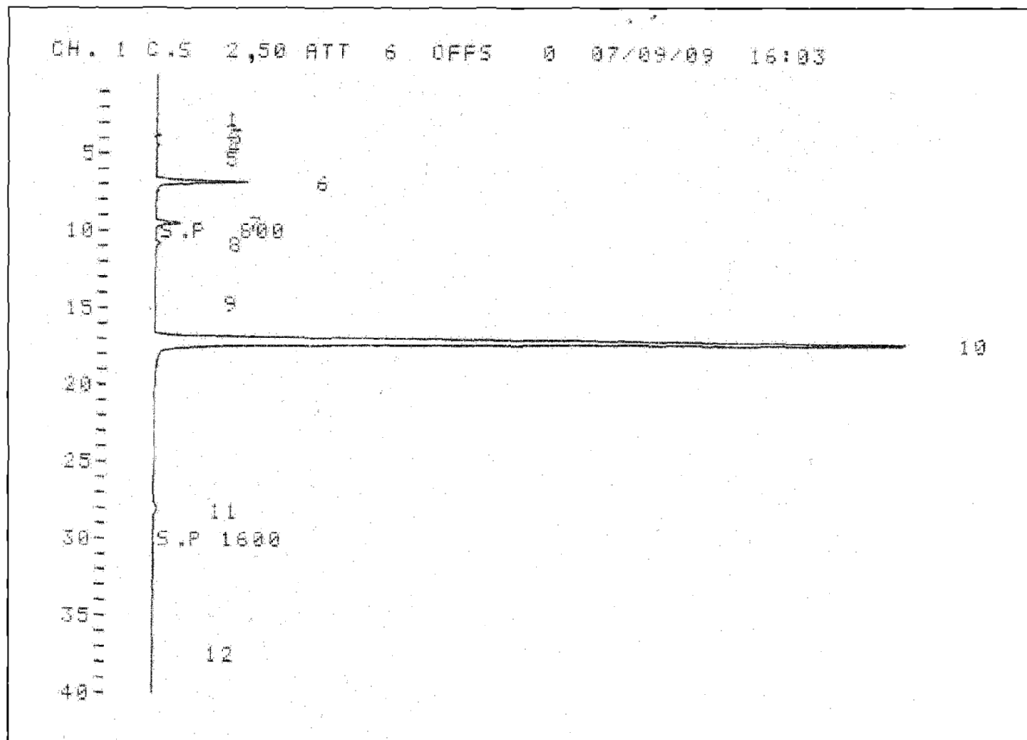


[III]

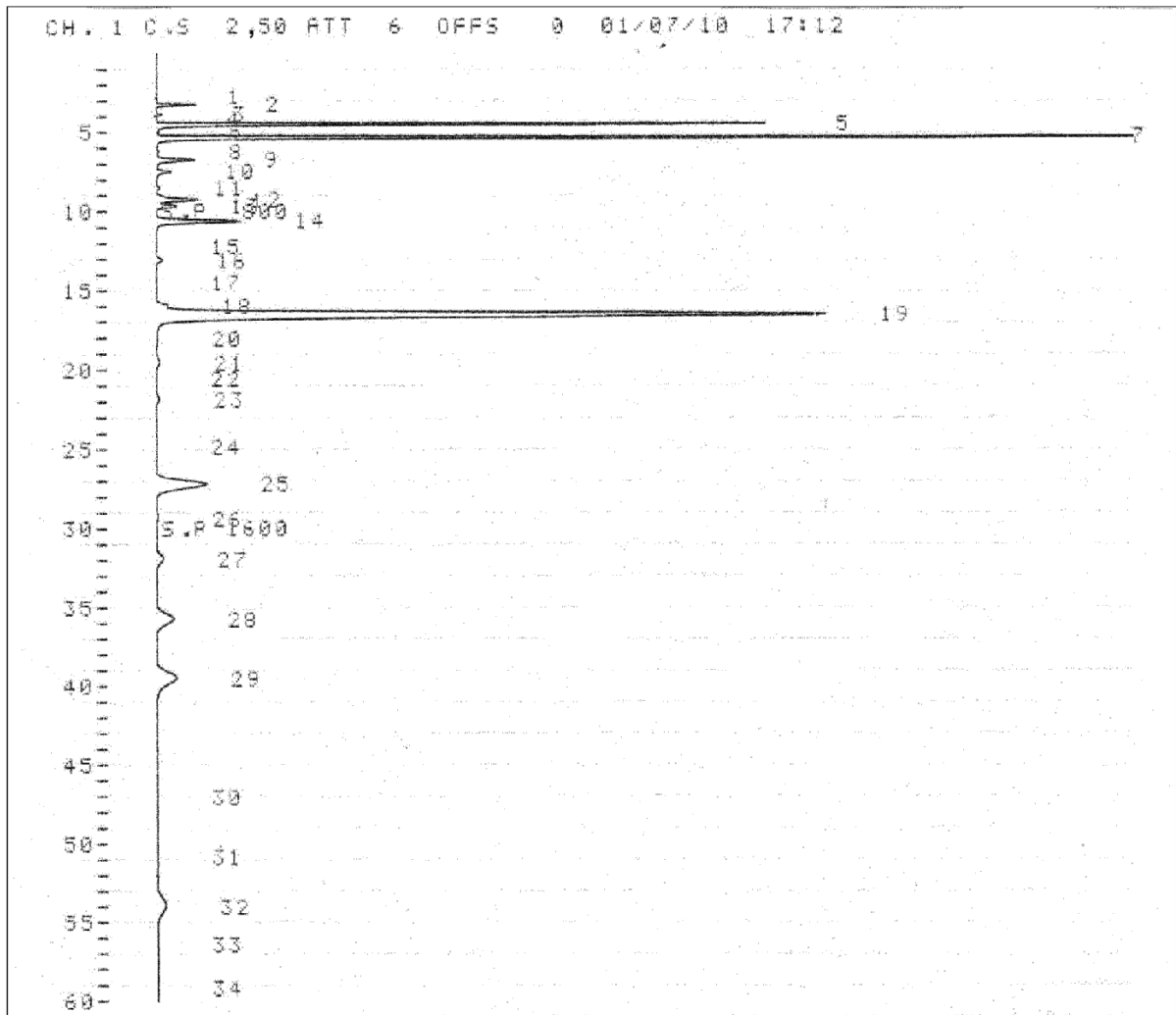
donde X representa un grupo heterocíclico seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo imidazolilo, un grupo bencimidazolilo y un grupo 1,2,4-triazolilo.

2. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto activador de ácido fosfórico es UDP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico es UDP o una sal de UDP.
3. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto activador de ácido fosfórico es UMP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico es una sal de UTP.
4. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto activador de ácido fosfórico es UMP-imidazolida y el compuesto de ácido fosfórico es un ácido pirofosfórico o pirofosfato.
5. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto activador de ácido fosfórico es pirofosfato de diimidazolilo y el compuesto de ácido fosfórico es UMP o una sal de UMP.
6. El procedimiento de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el ión metálico se seleccione entre el grupo que consiste en un ión de hierro (II), un ion de hierro (III) y un ion de aluminio.
7. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 6, donde el ión metálico es un ión de hierro (III) o un ión de aluminio.
8. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1, donde el ión metálico se proporciona en forma de cloruro, bromuro, nitrato, sulfato o acetato del metal.

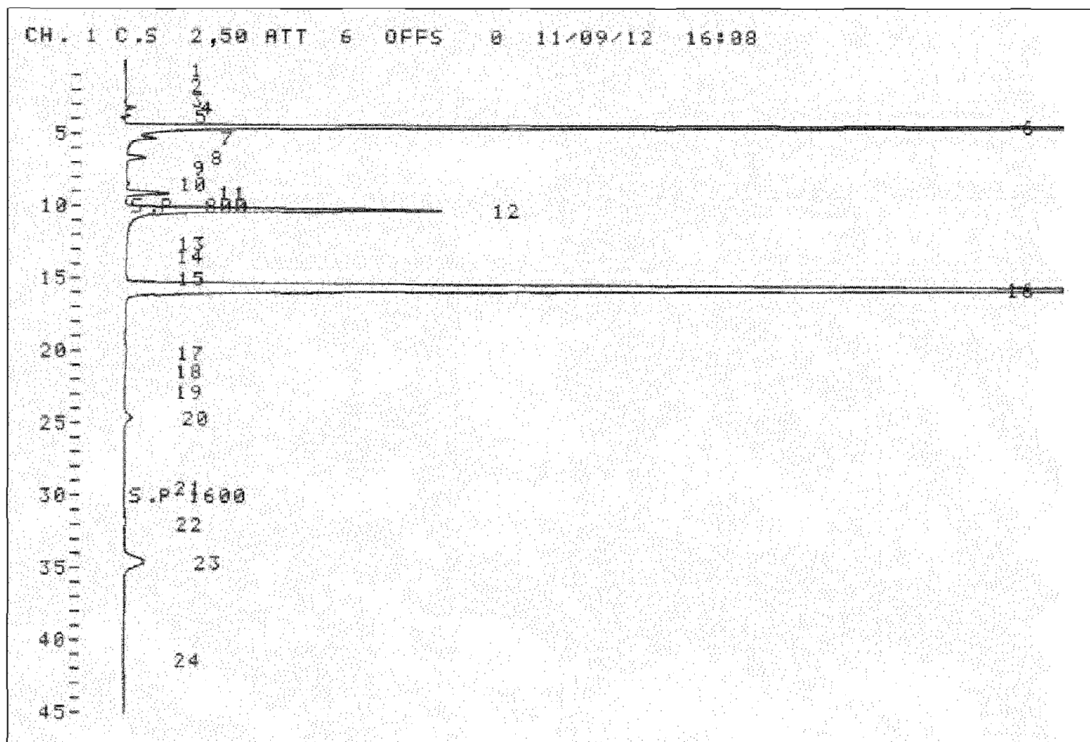
[Figura 1]



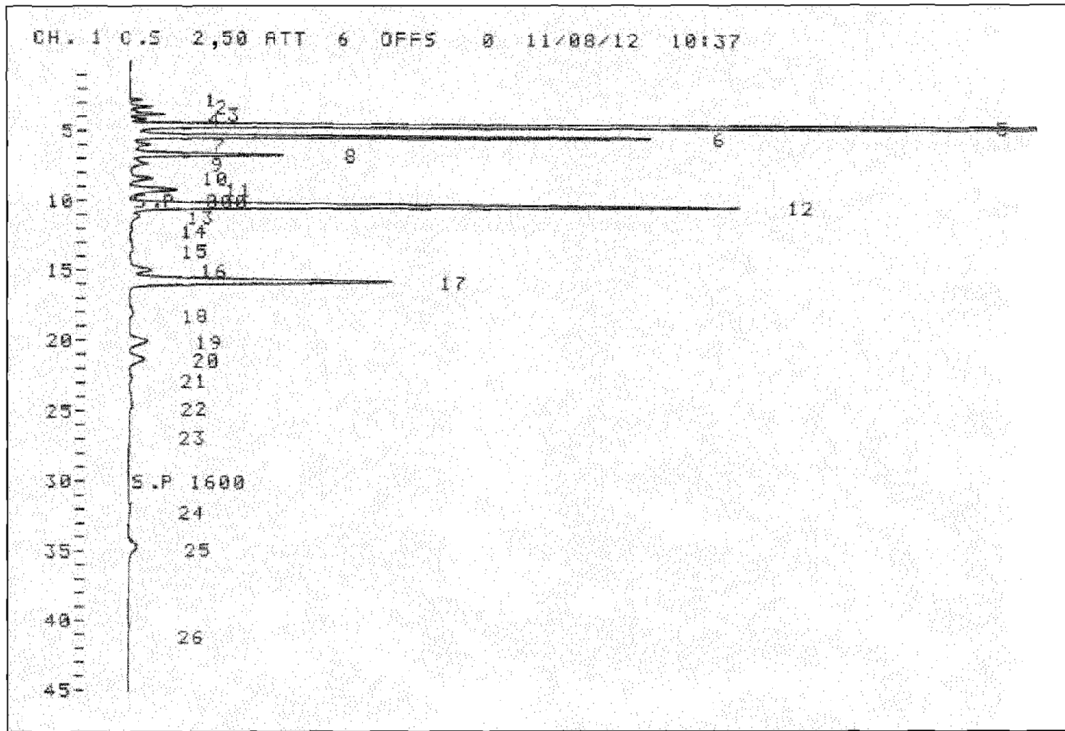
[Figura 2]



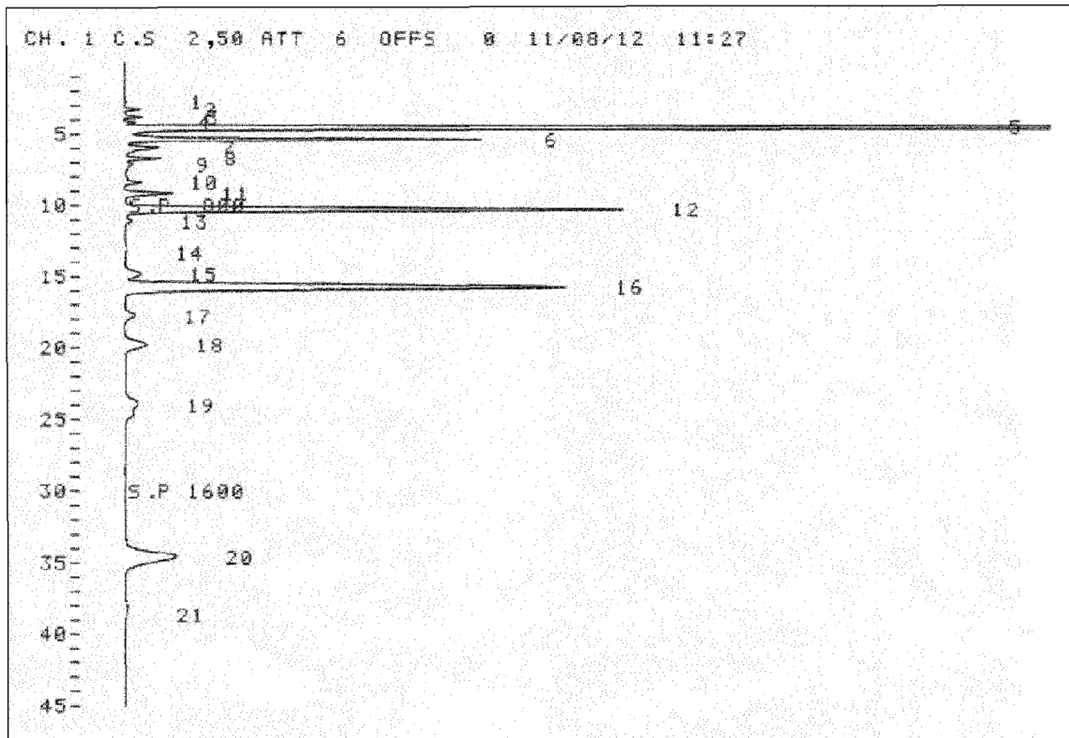
[Figura 3]



[Figura 4]



[Figura 5]



[Figura 6]

