

核苷及其类似物的三磷酸化方法研究进展

任丽霞^{1,2} 贺万丽¹ 赵佩佩^{1*} 蔡岩^{1*}

(¹天津国际生物医药联合研究院 天津 300457; ²南开大学药学院 天津 300071)

摘要 三磷酸核苷是一种具有三个磷酸基团的核苷酸,不仅在细胞的能量代谢中起着重要作用,也可用于心脑血管和神经系统等许多疾病的治疗和辅助治疗,随着分子生物学的发展,三磷酸核苷在许多生物检测技术中也应用广泛。新冠疫情爆发以来,抗病毒核苷类药物成为研究的热点,这类药物大多在体外不具有活性,而是在细胞内代谢为三磷酸形式发挥作用,在对这类化合物的抗病毒机理研究中,研究其抗病毒活性、抗病毒机制等都需要将核苷类药物进行三磷酸化,因此开发一种高效的核苷三磷酸化方法是十分必要的。本文根据三磷酸核苷的合成历史进程,综述了迄今为止三磷酸核苷的化学合成方案。旨在为核苷及其类似物的三磷酸化以及相关药物的研发提供参考。

关键词 三磷酸核苷 活性中间体 化学合成 抗病毒药物

Advances in Triphosphorylation of Nucleosides and Their Analogues

Ren Lixia^{1,2}, He Wanli¹, Zhao Peipei^{1*}, Cai Yan^{1*}

(¹ Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin, 300457;

² College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin, 300071)

Abstract Nucleoside triphosphate are nucleosides with three phosphate groups, which not only play an important role in energy metabolism of cells, but also can be used in the treatment and adjuvant treatment of many diseases, such as cardiovascular and cerebrovascular diseases, blood diseases and neurological diseases. With the development of molecular biology, they are also widely used in many biological detection technologies. Since the outbreak of COVID-19, the research of antiviral nucleoside drugs has become a hot spot. Most of these drugs have no activity in vitro, but are metabolized to their triphosphate form in cell to take effect. In the research of mechanism of these nucleoside antiviral drugs, triphosphorylated nucleosides are required to study the antiviral activity and mechanism of drugs. Therefore, it is necessary to develop an efficient method of nucleoside triphosphorylation. According to the synthetic history of nucleoside triphosphates, the chemical synthetic strategies of nucleoside triphosphates are reviewed in this paper. The aim is to provide useful references for the triphosphorylation of nucleosides and their analogues, and also to provide some useful idea to the development of novel antiviral drugs.

Keywords Nucleoside triphosphates, Active intermediates, Chemical synthesis, Antiviral drugs

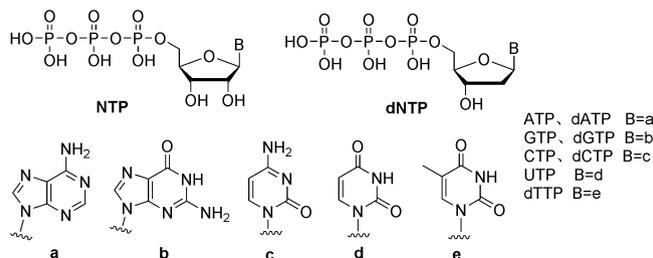
核酸是生命活动过程中重要的生物大分子物质,其基本结构单元为核苷酸,由戊糖、碱基和磷酸组成。其中带有三个磷酸基团的核苷酸就是三磷酸核苷,根据核苷中所含戊糖的不同可以分为三磷酸核糖核苷(NTPs)和三磷酸脱氧核糖核苷(dNTPs)。自然界中常见的三磷酸核苷类物质主要有三磷酸(脱氧)腺苷((d)ATP)、三磷酸(脱氧)鸟苷((d)GTP)、三磷酸(脱氧)胞苷((d)CTP)和三磷酸尿苷(UTP)、三磷酸脱氧胸腺苷

(dTTP)等,它们的分子结构如图式 1 所示。当然也存在少量的修饰三磷酸核苷,tRNA、mRNA 中就存在某些修饰和异构化的三磷酸核苷,如假尿嘧啶三磷酸核苷。

1 天然三磷酸核苷的生物学作用

天然存在的三磷酸核苷在生物体的生命活动中发挥着巨大作用。不仅仅是细胞生命活动的能量来源,而且参与细胞多种代谢途径。ATP 在神

* 联系人,赵佩佩 E-mail: zhaopp_89@163.com; 蔡岩 E-mail: caiyan_86@163.com



图式 1 几种三磷酸核苷的化学结构

Scheme 1 Structures of several NTPs

经传递、肌肉收缩、心功能、血小板功能、血管舒张和肝糖原代谢等多种生物过程中发挥显著作用^[1]。GTP 可以通过增加细胞内钙来促进神经生长因子诱导的神经突生长^[2],也可用于慢性肝炎、进行性肌萎缩、视力减退等疾病的辅助治疗。CTP 参与机体核酸及卵磷脂等重要脂类化合物的合成代谢^[3],其二钠盐是临床上常用的药物,可用来缓解血管硬化,营养神经,也可用于新生儿缺氧缺血性脑病^[4]和颅脑损伤的辅助治疗^[5]。UTP 参与乳糖、半乳糖、糖原的合成代谢,还可以刺激肿瘤细胞迁移和伤口修复^[6]。

除此之外,它们还广泛应用于生物检测中,是核酸探针的主要合成原料,也是 PCR 试剂盒的重要底物。核酸探针是具有特定碱基序列的核酸,通过与靶核酸的分子碱基序列互补杂交,并用同位素、荧光等标记被特异性检测的核酸分子,从而识别靶核酸分子的序列,在病原微生物和寄生虫的检测,疾病诊断等领域发挥重要作用。碱性磷酸酶(ALP)水平的异常与多种疾病的发生有密切关系,通过对 ALP 的检测可以诊断疾病, Song 等^[7]开发了卟啉-三磷酸腺苷的纳米级手性金属探针来测定 ALP 的活性,其原理为 ALP 将 ATP 水解成游离的磷酸基团,与金属骨架中的 Zr^{4+} 离子配位,抑制了卟啉桥配体与 Zr^{4+} 间的电荷转移,导致卟啉荧光恢复,同时圆二色性(CD)信号逐渐减弱。PCR 是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的技术,在疾病检测、商品检疫、法医鉴定等领域应用广泛。无论是制备核酸探针还是 PCR 技术,最重要的底物就是三磷酸核苷,未来随着分子生物学检测技术的不断的拓展,对这些三磷酸核苷的需求也将不断增加。

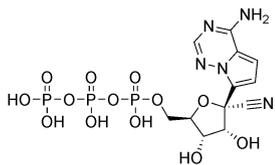
2 修饰三磷酸核苷的抗病毒作用

目前,经过修饰的核苷已被开发成为药物用来治疗疾病,尤其在抗病毒方面作用显著,病毒在

侵入人体之后需要利用 RNA 聚合酶(RNA 病毒)或 DNA 聚合酶(DNA 病毒)进行增殖。而核苷类药物的三磷酸酯因为与天然核苷酸结构相似,可与天然的核苷酸竞争,插入病毒核酸的合成位点,使病毒的复制中止。如目前用于慢性丙型肝炎治疗的利巴韦林,其本身并不具有活性,而是在体内被代谢成三磷酸形式发挥作用。体外研究证明,三磷酸利巴韦林是一种有效的丙肝病毒 RNA 聚合酶抑制剂。

当前新冠疫情仍未得到有效遏制,虽然通过注射疫苗可以增强机体的抵抗力,降低患病风险,但是新型冠状病毒(SARS-CoV-2)变异速度快,传染性强,截至到现在已经进行了多次变异,从德尔塔(Delta)毒株、奥密克戎毒株(Omicron)再到现在的 XE 毒株,病毒不断在进行突变,这使得疫苗的保护率逐渐下降,因此开发出有效的针对冠状病毒的小分子药物迫在眉睫。但是一种新药的研发需要数年时间,耗费大量成本,于是科学家们转向已经上市的药物,希望从中筛选出对新冠病毒有效的“老药”,并探究发现新的药物作用靶点。目前已经有几种药物在进行临床试验,瑞德西韦(GS-443902)就是其中之一,它在研发之初就用于抗击埃博拉病毒,新冠疫情爆发后被作为治疗新冠病毒的潜在药物进行临床试验。研究证明,三磷酸形式的瑞德西韦分子经由病毒聚合酶催化,可以进入产物 RNA 中,与上游产物退出通道中 861 位丝氨酸产生强烈的位阻效应,从而阻碍 RNA 合成的继续进行^[8]。相应的体外试验也验证了瑞德西韦三磷酸(图式 2)通过抑制病毒 RNA 聚合酶活性,干扰病毒的正常复制过程。除了瑞德西韦外,还有一些与它作用靶点类似的小分子药物正在临床试验阶段或已被批准上市,如 Molnupiravir (EIDD-2801/MK-4482)、VV116 都是转化为活性三磷酸形式抑制病毒的 RNA 聚合酶发挥作用。在这些药物进入临床试验之前需要进

行大量的体外研究工作,验证药物的抗病毒活性和机理研究时大多采用其三磷酸化形式,因此一种高效通用的三磷酸化方法尤为重要。



图式 2 瑞德西韦的三磷酸形式

Scheme 2 The triphosphate form of Remdesivir

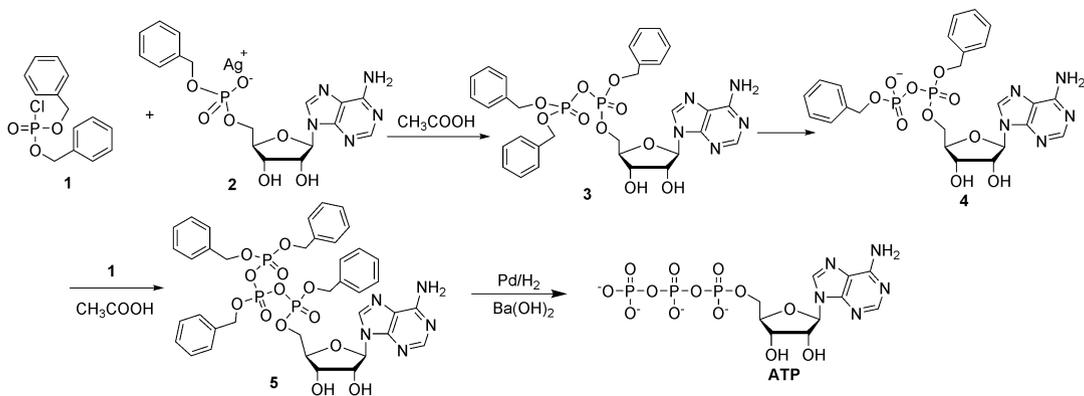
3 核苷三磷酸化的方法

目前核苷三磷酸化的方法主要分为化学合成法和生物合成法,其中生物合成法主要以酶促合成为主,但是酶合成法对底物的要求较高,价格昂贵,产物分离困难,制备规模小,产率也不理想;相较于生物合成法来说化学合成的应用更广泛。三磷酸核苷的化学合成工作最早可追溯到上个世纪,在已经报道的方法中,核苷的三磷酸化学合成方法主要分为以下几类:(1)单磷酸核苷被活化形成各种活性中间体后,与焦磷酸偶联实现三磷

酸化,这一思路发展最久,也更为成熟,适用于大多数核苷底物的三磷酸化,在一定程度上可以实现对核苷 5'位的选择性磷酸化,使得三磷酸核苷的合成步骤得以简化;(2)二磷酸核苷与磷酸盐试剂生成三磷酸核苷;(3)核苷直接与三磷酸试剂反应实现三磷酸化,这大大简化了三磷酸化的过程;(4)近些年来又出现了无需进行 HPLC 纯化的迭代偶联策略来实现核苷的三磷酸方法。本文将系统介绍三磷酸核苷的合成方法。

3.1 Baddiley 法合成三磷酸核苷

三磷酸核苷的合成工作在 1940 年以前就有少量报道,但产率极低,没有应用价值。直到 1949 年 Baddiley 等^[9]报道了一种产率较高的方法,该方法使用醋酸作为溶剂,使 5'-单磷酸腺苷苄基酯的银盐(2)与二苄基磷酰氯(1)反应得到 5'-二磷酸腺苷苄基酯(3)。之后脱除第二个磷酸上的一个苄基保护基,得到 5'-二苄基焦磷酸腺苷(4),再与一分子二苄基磷酰氯反应生成四苄基三磷酸腺苷(5),最后氢化脱除所有苄基保护基得到了 5'-三磷酸腺苷(图式 3)。



图式 3 Baddiley 法合成三磷酸核苷

Scheme 3 Synthesis of ATP through Baddiley method

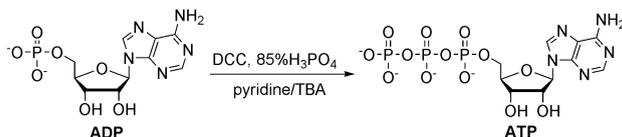
这种合成方法要进行多次脱除苄基保护基的操作,最终的产品以粗钡盐的形式分离出来,然后制成了三吡啶腺苷-5'三磷酸吡啶盐。银离子的存在使得反应过程中会生成大量的氯化银沉淀,而钡离子也需要以硫酸钡沉淀形式除去,操作十分费时费力,不具有实用价值。

3.2 DCC 活化单磷酸核苷合成三磷酸核苷

在 Baddiley 合成三磷酸核苷后,在单磷酸核苷的磷酸盐部分引入一个活性离去基团,以此促进其与焦磷酸盐进行亲核取代成为了研究核苷三

磷酸化方法的主要方向。

1954 年, Khorana 等^[10,11]用二环己基碳二亚胺(DCC)作为缩合剂使单磷酸腺苷在吡啶水溶液中与 85%的磷酸反应合成了三磷酸腺苷。但是这种方法需要加入过量的 DCC,产物是三磷酸腺苷和焦磷酸腺苷的混合物。后来通过在吡啶中加入了一定比例的三正丁胺,使得反应体系形成了均一体系,从而使得收率和选择性得到了提升^[12]。此外他们还研究了 DCC 的用量对三磷酸核苷产率的影响,结果表明,适当提高 DCC 的用量,相应的三磷酸核苷的产率也提高。这个方法



图式 4 DCC 活化单磷酸腺苷合成三磷酸核苷

Scheme 4 Synthesis of ATP through DCC activated ADP method

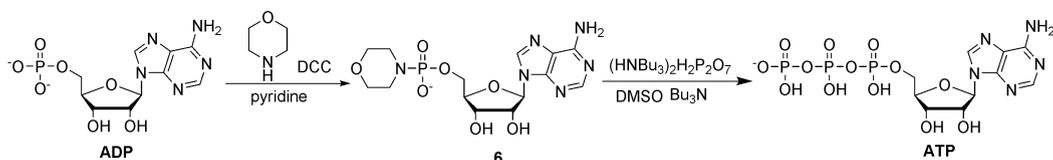
也可以扩展到鸟苷和脱氧鸟苷 5'-三磷酸的合成。但是反应中依旧有许多副产物产生,后续的分纯化工艺复杂。

3.3 构建中间体合成三磷酸核苷

3.3.1 构建磷酰胺中间体合成三磷酸核苷

在 DCC 活化单磷酸核苷研究的基础上, Moffat 等^[13]用 DCC 作为缩合剂,使单磷酸腺苷与吗啉偶联形成活性磷酰胺中间体 **6**,最大限度地保证反应进行,但是随着反应时间的延长,形成的三磷酸腺苷盐会逐渐分解形成二磷酸盐,产率降

低。为了解决这个问题,他们在后续研究中用二甲亚砜代替吡啶作为溶剂,与三正丁基焦磷酸胺反应,减少了二磷酸腺苷、四磷酸腺苷等副产物的产生,最终分离得到的三磷酸腺苷的产率达到了 70%~80% (图式 5)^[14]。通过这种方法还合成了其他的三磷酸核苷。但是这种方法反应速度慢,需要两到三天才可完成。Wittmann 等^[15]的研究表明在反应中加入 1*H*-四唑可以加快反应速率,因为它可以促进吗啉基团的质子化,激活磷酰胺中间体从而加速偶联反应的发生。

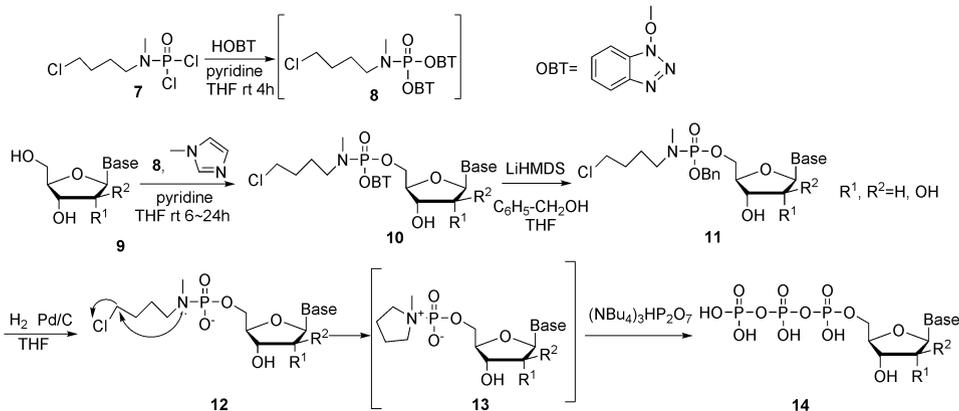


图式 5 使用吗啉构建磷酰胺中间体合成三磷酸腺苷

Scheme 5 Synthesis of ATP through formation of phosphoramidate intermediates by the use of morpholine

2004 年 Borch 等^[16]基于其课题组对抗癌和抗病毒核苷磷酸酯前药的激活机制研究,提出了一种三磷酸核苷合成的新策略:含有氧苄基的磷酰胺酯 **11** 经过 Pd/C 催化氢解,在室温下定量地生成了吡咯磷酰胺两性离子中间体 **13**,它更容易与三(四正丁基铵)焦磷酸盐进行偶联,可以快速地生成三磷酸核苷(图式 6),这个方法成功应用于三磷酸尿苷、三磷酸 2'-脱氧胞

苷和三磷酸利巴韦林的合成,但是应用于不同的底物时存在磷酰胺中间体溶解性差及产物钯炭吸附的问题,需要适当改变溶剂增加底物溶解度并用钯-氧化铝作为催化剂减少产物吸附。这个方法产率较高,在 50%~70%之间,但是在反应之前需要将核苷制备成相应的含有氧苄基的磷酰胺酯中间体,工艺路线复杂,应用价值低。

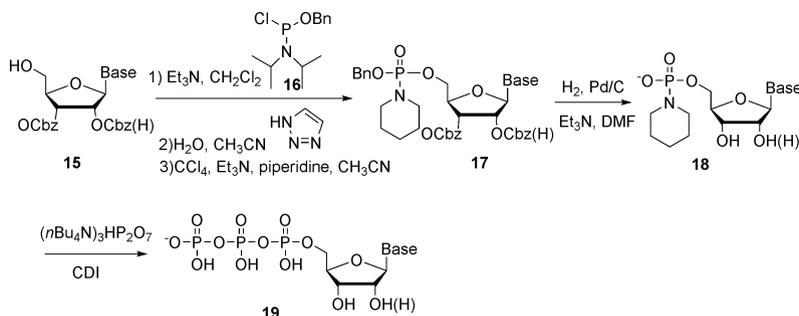


图式 6 构建吡咯磷酰胺两性离子中间体合成三磷酸核苷

Scheme 6 Synthesis of NTP through construction of pyrrole phosphoramidate zwitterionic intermediates

2013 年 Sun 等^[17]提出了一种 P(V)-N 激活策略,通过一系列试验筛选出了 4,5-双氧咪唑(DCI)为最优的活化剂,可以很大程度提高反应速率。在反应之前先对核苷的羟基进行保护,合成 Cbz/Bn 保护的核苷磷酸哌啶前体 **17**,然后经

过催化加氢去除所有保护基,再在 CDI 的活化下与焦磷酸盐偶联生成相应的三磷酸核苷 **19**(图式 7)。加入活化剂能够使反应时间大大减少,仅需 6h 即可完成,反应条件温和,分离产率在 68%~81% 之间,可用于三磷酸核苷的克级合成。



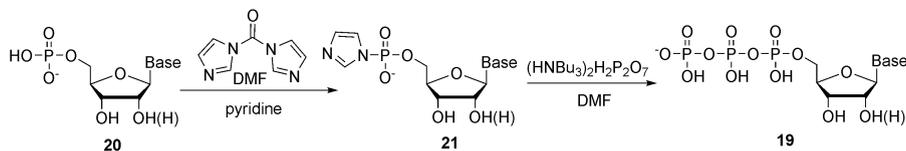
图式 7 DCI 活化的三磷酸核苷合成

Scheme 7 Synthesis of NTP through DCI activation method

3.3.2 构建磷酸咪唑中间体合成三磷酸核苷

1961 年, Cramer 等^[18]用 1,1'-羰基二咪唑(CDI)与单磷酸核苷反应生成磷酸咪唑化合物,在此基础上 Hoard 等^[19]将 CDI 应用于三磷酸核苷的合成中,利用 CDI 活化核苷单磷酸可得到磷酸咪唑中间体 **21** 然后与焦磷酸胺反应得到了三磷酸化产物。此外,他们还用这种方法合成了 dNTPs 和带有 dNTP 残基的低聚物。产率为 20%

~70%(图式 8)。但是反应中会形成对称的焦磷酸盐副产物,需要用离子交换色谱法进行进一步的分离纯化。此外在三磷酸核糖核苷的合成过程中,因为其 2' 和 3' 位都有羟基,还会产生 2',3'-环碳酸酯衍生物,为了解决这个问题 Maeda 等^[20]通过在室温下加入 0.5% 的三乙胺溶液处理反应体系,使得 2',3'-环碳酸酯水解,能够定量转化为三磷酸核苷。

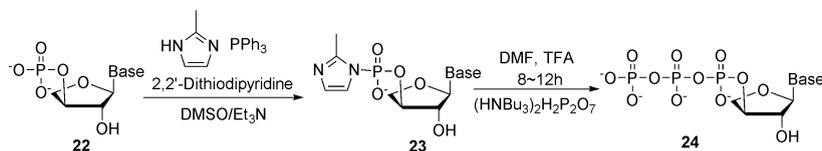


图式 8 使用 1,1'-羰基二咪唑构建磷酸酰胺中间体合成三磷酸核苷

Scheme 8 Synthesis of NTP through construction of phosphoramidate intermediates by the use of CDI

这种构建磷酸咪唑中间体再进行三磷酸化的方法也适用于修饰核苷的三磷酸化。2017 年, Bala 等^[21]通过构建磷酸酰胺中间体实现了对人工修饰的核苷 α -L-苏阿糖呋喃酮基核酸(TNA) 3' 位羟基的三磷酸化。用 2,2'-二吡啶二硫和三苯基磷作为偶

联剂,单磷酸核苷 **22** 与过量的 2-甲基咪唑发生反应,生成对应磷酸酰胺中间体 **23**, 中间体 **23** 再在 DMF 中与焦磷酸胺反应,得到三磷酸 TNA (**24**, 图式 9)。这种方法反应耗时短,路线成熟,产率较高,克服了呋喃糖环上 3' 位羟基反应性差的问题。



图式 9 使用 2-甲基咪唑构建磷酸酰胺中间体合成三磷酸核苷

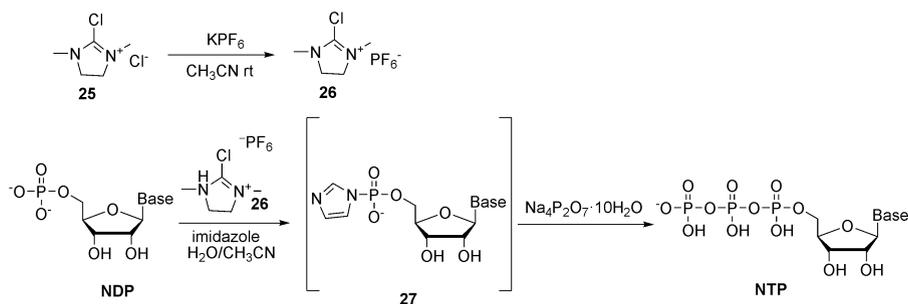
Scheme 9 Synthesis of NTP through construction of phosphoramidate intermediates by the use of 2-methylimidazole

上述构建磷酸酰胺或者磷酸咪唑中间体来实现核苷三磷酸化的方法都需要在无水有机溶剂中完

成,而且为了增加反应底物的溶解度,在磷酸化的过程中需要使用价格昂贵的三烷基或四烷基铵盐

的焦磷酸试剂。2012年 Tanaka 等^[22]首次用重水作溶剂,成功合成了糖核苷二磷酸,实现了水溶剂中的磷酸化反应,这是通过引入 2-咪唑-1,3-二甲基咪唑氯化铵实现的,它可以在水中激活单磷酸核苷生成磷酰咪唑中间体。受此启发,Depaix 等^[23]在水和乙腈中实现了核苷的三磷酸化,2-氯-1,3-二甲基咪唑六氟磷酸盐(26)在水和乙腈中将

未保护的 5'-单磷酸核苷转化为相应的磷酰咪唑中间体 27,后续利用焦磷酸四钠十水合物处理即得到 5'-三磷酸核苷。这个方法无需对核苷进行保护,所用的试剂方便易得,虽然得到的产品产率适中,但是所需的成本大大降低,具有一定的实用价值,可能适用于三磷酸核苷的大规模合成(图式 10)。



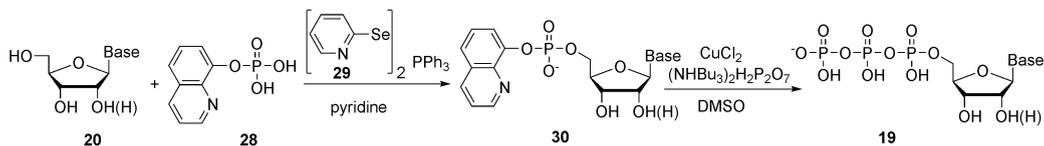
图式 10 以水和乙腈为溶剂构建磷酰咪唑中间体合成三磷酸核苷

Scheme 10 Synthesis of NTP through construction of phosphorylimidazole intermediates using water and acetonitrile as solvents

3.3.3 构建磷酸酯中间体合成三磷酸核苷

除了构建核苷磷酰胺中间体以外,还可以通过构建磷酸酯活性中间体,再与焦磷酸反应实现核苷的三磷酸化。Takaku 等^[24]以三苯基膦和 2,2'-二吡啶二硒醚作为偶联剂使 8-喹啉磷酸酯与核苷反应,生成 8-喹啉双酯中间体 30,纯化的中

间体在 Cu^{2+} 的催化下与焦磷酸盐反应,得到三磷酸核苷产物,产率可达 73%~83%(图式 11)。这种方法操作简便,无需对核苷上的羟基、氨基等进行保护就可以高产率地合成三磷酸核苷,且全程室温反应,反应条件温和,可防止核苷上一些不稳定的基团被加热破坏。



图式 11 构建 8-喹啉双酯中间体合成三磷酸核苷

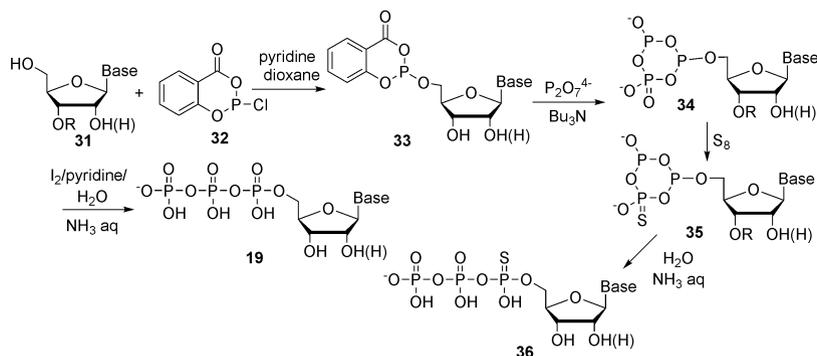
Scheme 11 Synthesis of NTP through construction of 8-quinoline diester intermediates

3.3.4 构建亚磷酸酯中间体合成三磷酸核苷

水杨酸亚磷酰氯(32)是一类三价磷试剂,早期被用于核苷氢亚磷酸盐的合成。1989年 Ludwig 等^[25]将它用于核苷的三磷酸化。在 DMF 中,用水杨酸亚磷酰氯(32)对 3'位保护的核苷 31 进行单磷酸化^[26],所得的 5'-亚磷酸酯中间体 33 与焦磷酸盐反应生成环状中间体 34,然后被碘氧化、氨脱保护成三磷酸核苷(24)(图式 12)。该方法成为目前应用最广泛的核苷三磷酸化途径,无需保护碱基,副产物少,降低了后续分离纯化的难度,也可以应用于核苷 5'-O-1-硫代三磷酸盐 36 的合成。但对 5'-OH 不具有选择性,需要在反应之前对糖基上的 2'位和 3'位羟基进行保护。

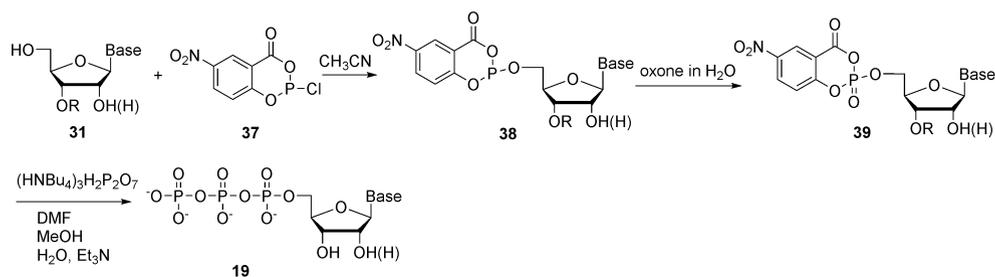
2009年 Warnecke 等^[27]对该方法进行了补充,水杨酸亚磷酰氯苯环的 5 位被硝基取代成为 5-硝基环盐亚磷酰氯(37),硝基的吸电子作用使磷原子具有足够的亲电性,可以与相应的亲核试剂快速反应,所以用 5-硝基环盐亚磷酰氯(37)与核苷反应生成中间体 38,在二氧六环存在下被氧化形成环盐三酯 39,然后与焦磷酸盐反应,乙酰基去保护,也可以生成相应的三磷酸盐(图式 13)。与 Ludwig-Eckstein 法相比,收率明显增加,可达 40%~80%。

水杨酸亚磷酰氯还可以用于三磷酸核苷的固相合成,1992年 Gaur 等^[28]以可控孔玻璃(CPG)或者聚苯乙烯基为载体合成了 2'-O-甲基-核糖核苷 5'-三磷酸盐,反应在 24h 内即可完成,收率在



图式 12 Ludwig-Eckstein 法合成三磷酸核苷

Scheme 12 Synthesis of NTP through Ludwig-Eckstein method

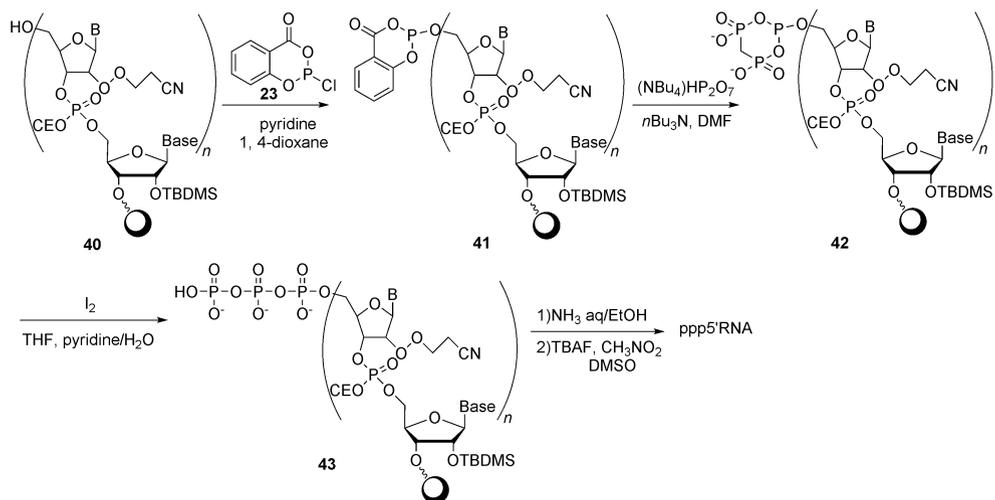


图式 13 5-硝基环盐亚磷酸酐合成三磷酸核苷

Scheme 13 Synthesis of NTP through the use of 5-nitrobenzophosphoryl chloride

60%以上,适用于商业上三磷酸核苷的大规模合成。2009年,Schmidt等也对 Ludwig-Eckstein 法进行了固相改良,并成功合成了 5'-三磷酸核糖寡核苷酸(5'-TPs)。但是后续 Nagata 等在重复该方法的过程中发现生成的 5'-TPs 非常少,大部分生成了 H-磷酸盐,于是通过进一步探究,当

用反应性更强的三(四丁基铵)焦磷酸氢盐代替原方案中的三正丁基铵焦磷酸盐时,从基质辅助激光解析电离飞行时间质谱图中可以看出主要产物变成了 5'-TPs(图式 14)。这可能是由于三(四丁基铵)焦磷酸氢盐溶解性和亲核性更高的缘故^[29]。



图式 14 5'-TPs 的固相合成

Scheme 14 Solid-phase synthesis of 5'-TPs

3.3.5 构建氢亚磷酸单酯中间体合成三磷酸核苷

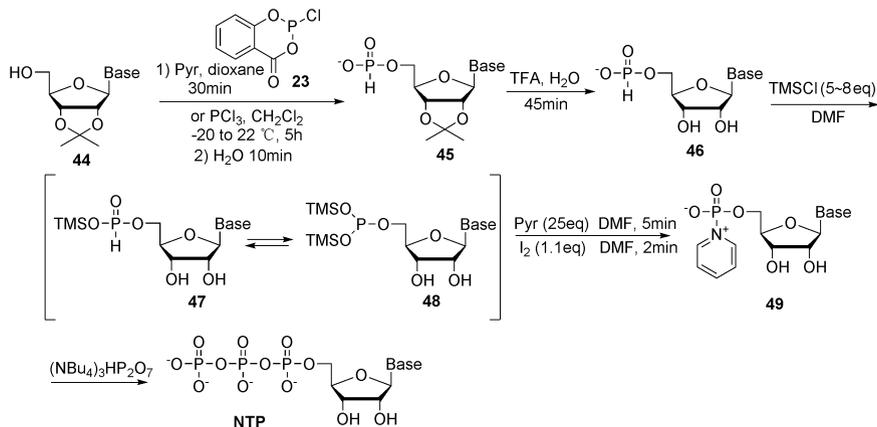
核苷氢亚磷酸酯中磷原子的价态为+3 氧化

态,容易被不同的氧化试剂氧化为五价磷衍生物,同时由于磷中心缺少电子对,相较于三价磷衍生物来说更加不易发生自发氧化,并且在酸

性条件下也很稳定,所以非常适合作为磷酸化的前体。

2008年 Sun 等^[30]报道了一种以核苷 5'-*H*-亚磷酸单酯 **46** 为前体制备 NTPs 的方法。2',3'-*O*-异丙基保护的核苷 **44** 被水杨酸亚磷酸酐 (**23**) 或三氯化磷磷酸化,经三氟乙酸处理得 5'-*H*-亚磷酸单酯 **46**,随后加入过量的 TMSCl 和吡啶,使 5'-*H*-亚磷酸单酯转化为硅酰氢亚磷酸酯 **47** 或活性

更高的双硅酰亚磷酸酯 **48**,接着加入碘单质氧化亚磷酸根,生成反应性磷酸酰胺吡啶 **49**,最后与三正丁基焦磷酸铵盐反应得到相应的三磷酸核苷。采用这种方法可以合成多种三磷酸核苷(图式 15),最终得到的高纯度三磷酸核苷的产率适中,在 26%~41%之间。这种氧化偶联方法不需要核糖或碱基的保护,可以应用于各种核苷和类似物的三磷酸化反应。



图式 15 构建氢亚磷酸单酯中间体合成三磷酸核苷

Scheme 15 Synthesis of NTP through construction of hydrogen phosphite monoester intermediate

3.3.6 构建核苷二氯磷酸中间体合成三磷酸核苷

早期三磷酸核苷的合成往往采用从天然产物中得到的单磷酸核苷作为底物,这严重限制了对产物的化学修饰方式,降低了产物的多样性。出于开发更多种三磷酸核苷类似物用于生化实验的目的,人们开发了对核苷进行单磷酸化的方法。

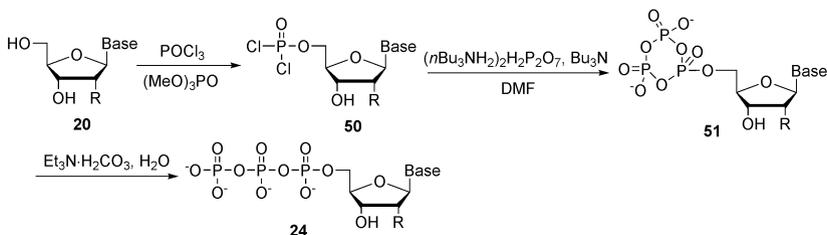
对核苷的磷酸化一般用含有 P-Cl 键的化合物(一般是三氯氧磷)实现,由于核苷上往往有多个羟基作为反应位点,这种磷酸化的选择性很低。所以反应之前一般要把其他位置的羟基保护起来。但是保护和脱保护的步骤随之会产生许多副产物,增加了工作量。因此人们开始研究更具有选择性的单磷酸核苷合成方法,并试图使用最少保护或完全未保护的核苷作为底物,直接利用“一锅法”反应对核苷进行三磷酸化。Yoshikawa 等^[31,32]研究发现,采用磷酸三甲酯或其他三烷基磷酸盐作为溶剂,可以大幅提高核苷 5'位羟基磷酸化反应的速率,从而实现磷酸化试剂对核苷 5'位羟基的选择性磷酸化。还可以制备常规磷酸法不易获得的 5'-磷酸黄嘌呤。

基于 Yoshikawa 等的研究,Ludwig 等^[33]报道了直接以未保护的核苷为底物合成三磷酸核苷的

方法。用三氯氧磷对核苷进行单磷酸化生成核苷二氯磷酸酯中间体 **50**,随后与双-(三正丁基铵)焦磷酸盐反应,最后水解生成的环状中间体得到三磷酸核苷(图式 16)。由于反应生成的中间体极易水解,所以这三步操作均在“一锅”中进行。但是这种方法的选择性并不理想,可能产生的单磷酸化产物和二磷酸化产物,给后续的分纯化带来困难,并不适用于所有的核苷衍生物。而且反应时间取决于所使用的核苷的类型^[34],产率也不及引入单磷酸核苷中间体的方法高,但是对后续的研究具有重要意义。许多核苷和核苷类似物三磷酸化的方法都是在此基础上改进的。

Shanmugasundaram 等^[35]在 Ludwig 的三磷酸核苷合成基础上进行条件的优化,在乙腈中,用水杨酸亚磷酸酐对核苷进行单磷酸化,合成了一系列修饰核苷三磷酸:5-甲基胞苷-5'-三磷酸(5-MeCTP)、假尿(嘧啶核)苷-5'-三磷酸,*N*'-甲基假尿(嘧啶核)苷-5'-三磷酸,避免了用 DMF 作溶剂时与未反应的 POCl_3 形成 Vilsmeier-Haack 络合物,收率中等,纯化过程简单,最终的产品纯度大于 99.5%。

Kore 等^[36]也对“一锅法”进行了改进,他们发现单磷酸化步骤时加入合适的碱,可以提高反



图式 16 构建核苷二氯磷酸中间体合成三磷酸核苷

Scheme 16 Synthesis of NTP through construction of nucleoside dichlorophosphate intermediates

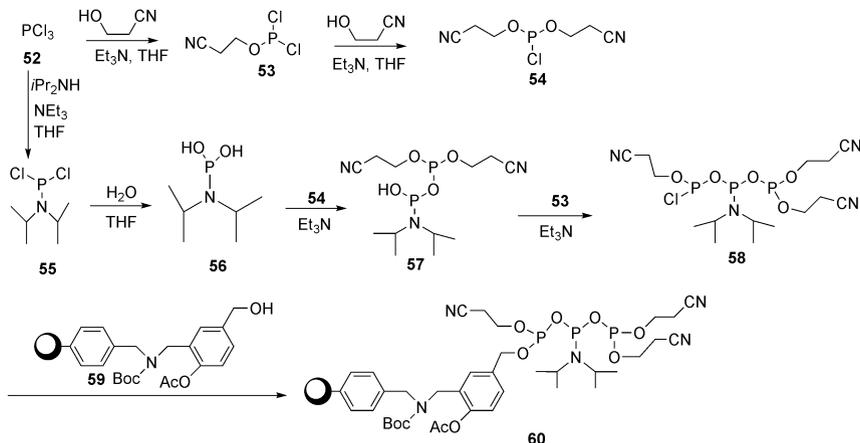
应的区域选择性,更有利于后续三磷酸核苷的合成,在制备嘌呤类核苷酸(如 dGTP 和 dATP)时可以加入三丁胺,制备嘧啶类核苷酸(如 TTP 和 dUTP)时加入质子海绵。此外他们还在三磷酸化步骤中改用乙腈作溶剂,避免了未反应的三氯氧磷与 DMF 生成络合物,而且焦磷酸盐的使用也大大减少。改进后的方法产率高,杂质少,易于纯化,已经成功应用于嘌呤和嘧啶脱氧核苷酸三磷酸的克级合成。Mishra 等^[37]在二甲基甲酰胺存在下用三丁基磷酸盐(而不是焦磷酸盐)处理磷酸酰氯活化的核苷单磷酸,也得到了核苷三磷酸。反应也是在一锅中完成,经 HPLC 检测粗品中含有 85% 的三磷酸核苷,并且无需保护对磷酸敏感的基团(如氨基和羟基)。

3.4 应用高选择性三磷酸化试剂合成三磷酸核苷

上述的三磷酸核苷合成过程中,需要对核苷上的官能团进行保护和脱保护步骤,以减少副产物的产生,而这些副产物通常很难去

除。选择性磷酸化试剂的应用不仅使原本复杂的三磷酸化过程可以一步完成,还可以把核苷 5' 位的三磷酸化反应与核苷本身糖和碱基的修饰完全分开,大幅降低了两个反应过程的互相影响,而且反应条件温和,产率高,适合三磷酸核苷的大量生产。

Ahmadibeni 等^[38]首次发表了关于固相多聚三磷酸化试剂的研究成果。其原理是固相三磷酸化试剂只有一个与羟基反应的位点,且空间位阻很大,只允许核苷中反应活性最强的羟基参与反应。使用 3-羟基丙腈取代三氯化磷依次得到 2-氰乙氧基亚磷酰氯 **53**、二(2-氰乙氧基)亚磷酰胺 **54**,同时三氯化磷和二异丙胺反应得到中间体 **55**,然后水解得到化合物 **56**,化合物 **56** 在三乙胺存在下与 **54** 作用,得到中间体 **57**,**57** 和 **53** 反应得到三磷酸化试剂 **58**。之后,三磷酸化试剂 **58** 与固定相氨基甲基聚苯乙烯树脂 **59** 结合得到固相三磷酸化试剂 **60**(图式 17)。

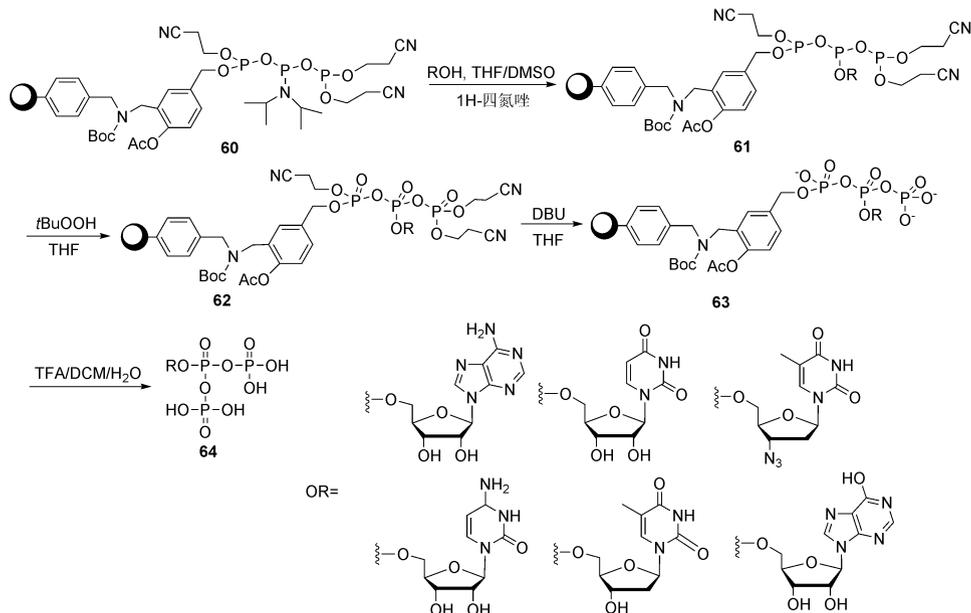


图式 17 固相选择性三磷酸化试剂的合成

Scheme 17 Synthesis of solid phase selective triphosphorylation reagents

60 可以与核苷直接反应得到 **62**, 化合物 **62** 被过氧化叔丁醇氧化得到 **63**, 再用 DBU 和 TFA 脱除保护基和固相, 就得到了相应的三磷酸核苷

(图式 18), 总产率可达 65%~87%。这种固相三磷酸化试剂有方便分离产物和可重复利用的优点, 但是试剂本身制作步骤繁琐, 大大降低了该方



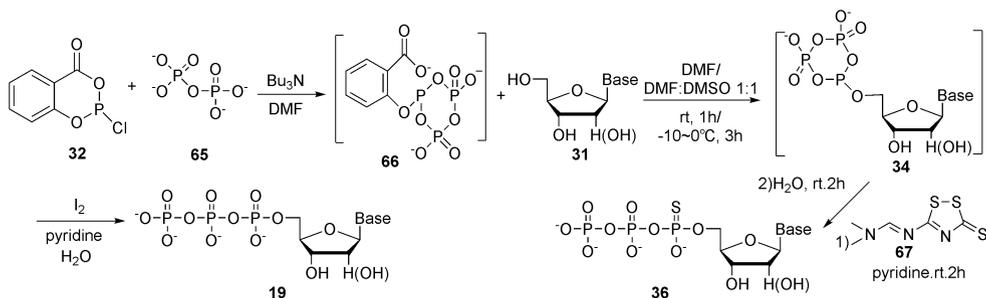
图式 18 应用固相选择性三磷酸化试剂对腺苷进行三磷酸化

Scheme 18 Triphosphorylation of adenosine using solid phase selective triphosphorylation reagents

法的应用价值。

2011年,在Caton-Williams等^[39]合成三磷酸核苷的报道中,用水杨酸磷酰氯(32)和焦磷酸盐65反应合成了一种选择性磷酸化试剂66,这种三磷酸化试剂反应活性弱,只能与核苷分子的5'位

羟基发生反应。生成核苷5'-环三磷酸盐中间体34再经碘单质氧化和水解,直接获得核苷的三磷酸化产物。该方法操作简单,反应条件温和,可以用于5'-(α -P-硫代)三磷酸核苷36以及修饰三磷酸核苷的合成(图式19)。



图式 19 Caton-Williams 报道的选择性三磷酸化试剂

Scheme 19 The selective phosphitylating reagent reported by Caton-Williams

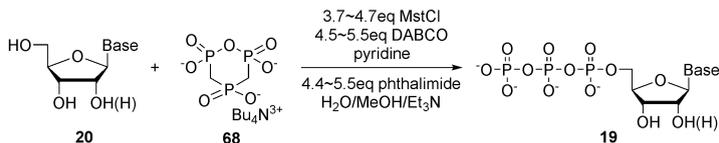
3.5 利用三偏磷酸盐从 2',3'-保护核苷合成三磷酸核苷

Mohamady等^[40]首次报道了以三偏磷酸盐(TriMP)为关键试剂合成核苷三磷酸的方法,通过三偏磷酸盐对4-联苯甲醇(BPM)和香豆素三磷酸化反应开发了合适的三磷酸化条件,并成功将该方法用于核苷的三磷酸化。三偏磷酸的四丁基铵盐68与均三甲苯磺酰氯在三乙烯胺(DABCO)存在下在吡啶中反应,然后加入适当保护的核苷和邻苯二甲酰亚胺,反应完成后用含水缓冲液淬灭反应,然后水解羟基保护基团,得到高

产率的NTPs(图式20)。三偏磷酸盐价格低廉,它的三钠盐在市场上容易买到,该方法还成功应用于BPM和香豆素的三磷酸化,产率很高,也适用于伯醇和酚类的三磷酸化反应。

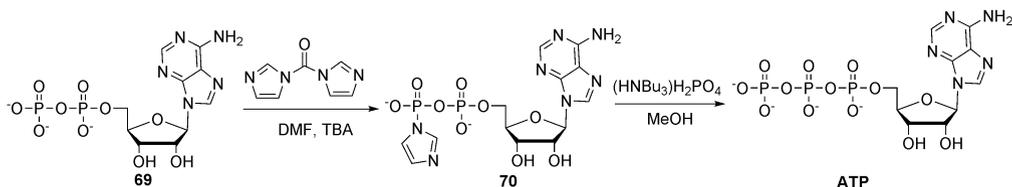
3.6 二磷酸核苷合成三磷酸核苷

1973年Hecht等^[41]提出了一条路线从二磷酸腺苷合成三磷酸腺苷,在CDI的作用下二磷酸腺苷形成咪唑活性中间体然后与三丁基磷酸盐反应生成三磷酸腺苷(图式21),最后得到的ATP产率为60%,可用于酶法无法制备的三磷酸核苷的合成。



图式 20 三偏磷酸盐合成三磷酸核苷

Scheme 20 Synthesis of NTP through trimetaphosphates

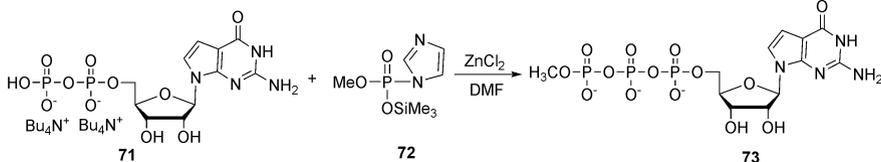


图式 21 二磷酸核苷生成三磷酸核苷

Scheme 21 Synthesis of NTP through nucleoside triphosphate

1992 年, Kadokura 等^[42]利用硅基化的甲基磷酰咪唑化合物 **72** 与鸟苷二磷酸铵盐合成了 γ -甲基三磷酸鸟苷 **73**, 在反应中加入氯化锌可以加快反应速率。同时还优化了反应条件使得

最终的产率大大提高, 可达 80% 以上 (图式 22)。解决了以往 GMP 或 GDP 类似物在有机溶剂中固有的溶解度较差、三磷酸核苷产物的收率较低的问题。

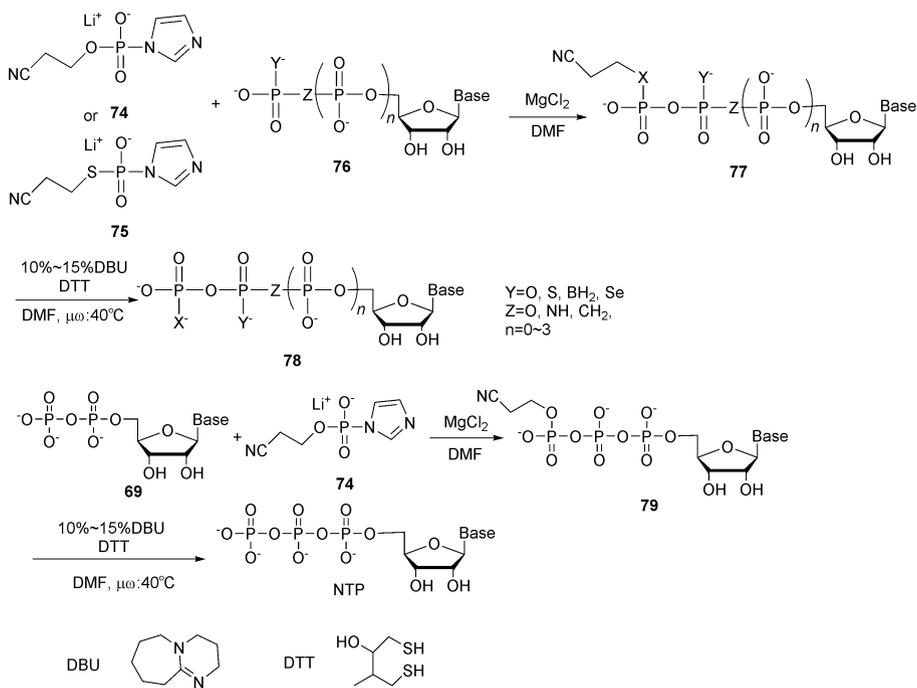
图式 22 γ -甲基三磷酸鸟苷的合成Scheme 22 Synthesis of γ -methylguanosine triphosphate

2012 年, Strenkowska 等^[43]报道了一种氰乙基保护下的磷酸核苷化合物延伸核苷低聚磷酸盐链的方法, 二磷酸核苷 **76** 与磷酸或硫代磷酸氰乙基的咪唑啉衍生物 (**74**, **75**) 在氯化镁的作用下快速偶联, 然后在碱性条件下消除氰乙基保护基团生成相应的三磷酸核苷 (图式 23)。需要注意的是, 一般的碱性条件 (50℃、0.1 mol/L NaOH 溶液) 只能消除磷酸链上全部为氧原子取代的情况, 对于杂原子取代的消除则需要更加温和的条件, 其课题组筛选出了另一种合适的碱 1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯 (DBU) 并加入二硫苏糖醇 (DTT) 提高了脱除效率, 而且在反应过程中首次用微波辅助极大地缩短了反应时间, 在一锅中即可完成, 可用于磷酸链上不同杂原子取代的核苷类似物的三磷酸化以及非链杂原子取代的核苷酸的合成, 但是由于反应是多步偶联, 相较于直接合成来说效率较低。

3.7 迭代偶联策略合成三磷酸核苷

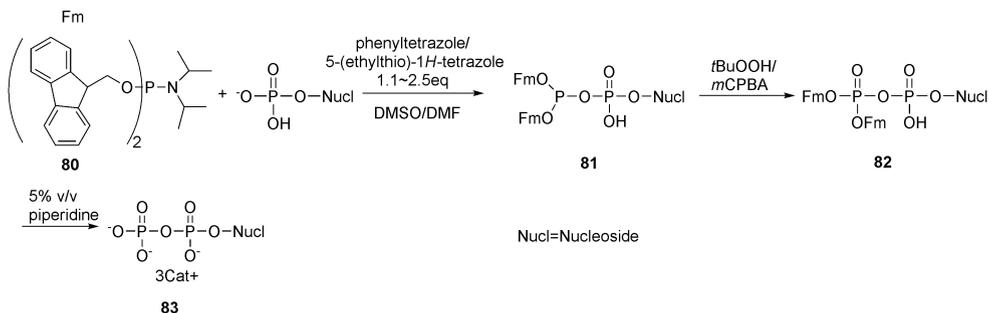
许多合成的三磷酸核苷化合物需要用 HPLC 进行纯化, 不仅操作繁琐, 耗时长, 而且分离出的

产品数量少, 只有毫克级。2014 年 Jessen 等^[44]首次提出了用迭代偶联法合成三磷酸核苷的方法: 一种双苄甲基保护的磷酰胺试剂 **80**, 在 1H-苯基四唑和 5-(乙基硫基)-1H-四唑的活化下与单磷酸核苷偶联, 经过 *t*-BuOOH 或 *m*-CPBA 氧化, 选择性生成了双-苄甲基保护的酸酐 **81**, 然后用 5% 的哌啶脱保护, 沉淀生成相应的焦磷酸核苷 **83** (图式 24)。焦磷酸核苷再与迭代磷酰胺试剂反应, 经相同的步骤氧化、脱保护, 生成对应的三磷酸核苷 (图式 25)。最终的产品以沉淀形式分离出来, 反应迅速, 每次偶联的产率很高在 70% ~ 90% 之间, 整个反应在室温下进行, 无需对核苷进行保护, 且无需进行 HPLC 纯化, 除了在溶液中进行外还可以在固相载体, 如控制孔玻璃 (CP-glass) 上进行。但是这种双苄甲基保护的磷酰胺试剂使用并不普遍。2017 年 Sujay 等^[45]用更方便易得的二苄基保护的磷酸酐试剂作为偶联剂, 同样通过氧化和脱苄基的迭代循环方法合成了三磷酸 TNA。但是这种方法步骤繁琐, 需要进行多步的偶联、保护和脱保护操作。



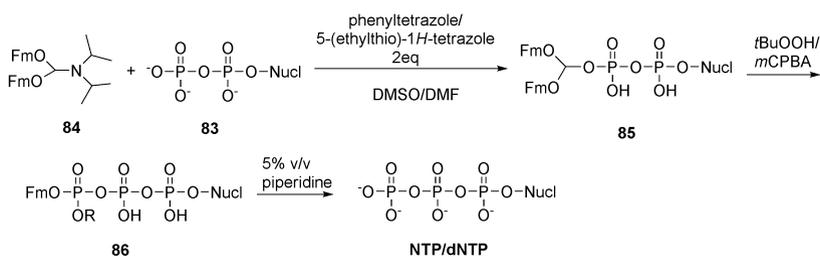
图式 23 氰乙基 (CE) 磷酰咪唑与二磷酸核苷合成三磷酸核苷

Scheme 23 Synthesis of NTP through cyanoethyl (CE) phosphorylimidazole and nucleoside diphosphate



图式 24 迭代偶联合成焦磷酸核苷

Scheme 24 Synthesis of nucleoside pyrophosphates through iterative coupling



图式 25 迭代偶联合成三磷酸核苷

Scheme 25 Synthesis of NTP through iterative coupling

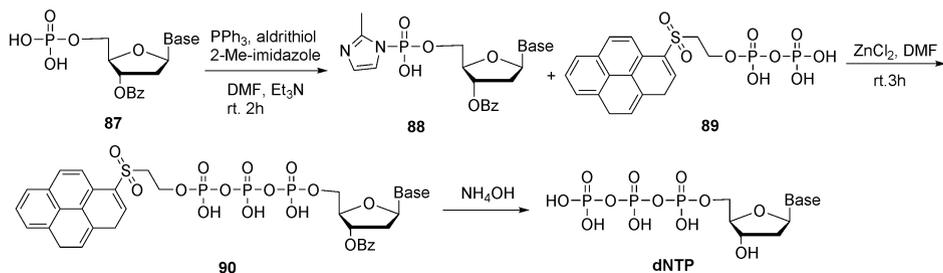
3.8 活性焦磷酸试剂与单磷酸核苷反应合成三磷酸核苷

用迭代偶联策略制备的核苷三磷酸虽然无需 HPLC 纯化,但是需要定量的官能团转换。路线长,步骤复杂。为了解决这些问题,Liao 等^[46]

发展了一种新的焦磷酸盐试剂 **89**,它具有大的疏水基团苄基,在 $ZnCl_2$ 的作用下可以与核苷单磷酸咪唑中间体 **88** 偶联生成中间体 **90**,用硅胶层析除去副产物,然后用 33% 的浓缩氢氧化铵溶液脱保护,待反应结束后将体系加入由丙酮和饱和

高氯酸钠丙酮混合的溶液中,经过离心操作三磷酸核苷产物就以钠盐的形式沉淀出来,而且纯度与商业合成的纯度一致。由于苊基焦磷酸盐常温

下是固体,所以非常稳定容易储存,可用于三磷酸核苷的大规模合成。



图式 26 活性焦磷酸试剂与单磷酸核苷合成三磷酸核苷

Scheme 26 Synthesis of NTP with active pyrophosphate reagent and nucleoside monophosphate

4 总结

在三磷酸核苷的合成过程中一直存在以下几个困难:(1)反应底物存在多个反应位点,反应过程中产生的副产物很多;(2)参与反应的物质溶解性差异大,影响反应效率;(3)三磷酸核苷产物不稳定,不易于后续的分和纯化。这些问题一直阻碍着三磷酸核苷的大规模合成。近一个世纪以来,经过化学家的不断探索,许多问题逐步得到解决,无论是在反应过程中加入激活剂从而加快反应速率减少副反应,还是在固相载体上反应从而避免溶解度的问题,又或是寻求高选择性三磷酸化试剂减少反应步骤,这些都代表着三磷酸核苷合成的途径一直被不断优化。从研究现状来看,目前存在的各种合成方法都各有其优缺点,还没有一种方法可以高效合成全部三磷酸核苷。未来围绕三磷酸核苷高效合成方法研究应主要开展以下工作:(1)探索出选择性更高更经济的合成路线;(2)解决由于三磷酸核苷不稳定带来的分离纯化的问题,实现简便快速的大批量分离和纯化;(3)对糖环及磷酸链上的修饰核苷进行三磷酸化。总之,三磷酸核苷的化学合成是一项非常复杂的工作,相信在众多化学工作者的共同努力下,所有困扰我们的问题终会被解决。

参 考 文 献

- [1] Agteresch H J, Dagnelie P C, van den Berg J W O. *Drugs*, 1999, 58: 211~232.
- [2] Gysbers J W, Guarnieri S, Mariggio M A, et al. *Neuroscience*, 2000, 96: 817~824.
- [3] 应国清, 石陆娥, 单剑峰. *中国医药工业杂志*, 2004, 35 (8): 466~468.
- [4] 丁玉红, 闫俊梅, 闫静. *现代药物与临床*, 2015, 30(10): 1268~1271.
- [5] 朱军, 刘清军, 付爱军, 等. *中国综合临床*, 2004(11): 68~69.
- [6] Lamarca A, Gella A, Martiane T, et al. *PLoS One*, 2014, 9: e98998.
- [7] Song Y X., Lu S Y, Sun S H, et al. *Sens. Actuat. B.*, 2021, 342: 130017.
- [8] 高海龙, 王镐锋, 赵耀, 等. *自然杂志*, 2021, 43(05): 343~348.
- [9] Baddiley J, Michelson A M, Todd A R. et al. *J. Chem. Soc. London*, 1949, 582~586.
- [10] Hall R H, Khorana H G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76: 5056~5060.
- [11] Khorana H G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76: 3517~3522.
- [12] Smith M, Khorana H G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80: 1141~1145.
- [13] Moffatt J G, Khorana H G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83: 649~658.
- [14] Moffatt J G. *Can. J. Chem.*, 1964, 42: 599~604.
- [15] Wittmann V, Wong C H. *J. Org. Chem.*, 1997, 62: 2144~2147.
- [16] Wu W D, Li C, Meyers F, et al. *Org. Lett.*, 2004, 6: 2257~2260.
- [17] Sun Q, Gong S S, Sun J, et al. *J. Org. Chem.*, 2013, 78: 8417~8426.
- [18] Cramer F, Schaller H, Staab H A, et al. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1961, 94: 1612~1621.
- [19] Hoard D E, Ott D G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87: 1785~1788.
- [20] Maeda M, Patel A D, Hampton A. *Nucleic Acids Res.*, 1977, 4: 2843~2853.
- [21] Bala S, Liao J Y, Mei H, et al. *J. Org. Chem.*, 2017, 82: 5910~5916.
- [22] Tanaka H, Yoshimura Y, Jørgensen M R, et al. *Angew. Chem.*, 2012, 124: 11699~11702.

- Res. , 2020, 38(3) : 232~244.
- [58] Rawlings D E. *Annu. Rev. Microbiol.* , 2002, 56(1) : 65~91.
- [59] Liang G, Li P, Liu W P, et al. *J. Mater. Cycles. Waste*, 2016, 18(4) : 742~751.
- [60] Bahaloo~Horeh N, Mousavi S M. *Waste Manage.* , 2017, 60: 666~679.
- [61] Boxall N J, Cheng K Y, Bruckard W, et al. *J. Hazard. Mater.* , 2018, 360: 504~511.
- [62] Heydari A, Mousavi S M, Vakilchah F, et al. *J. Power Sources*, 2018, 378: 19~30.
- [63] Kwon O S, Sohn I. *Resour. Conserv. Recy.* , 2020, 158: 104809.
- [64] Mao J K, Li J, Xu Z. *J. Clean. Prod.* , 2018, 205: 923~929.
- [65] Cong X, Cheng H W, Li G S, et al. *Int. J. Min. Met. Mater.* , 2017, (04) : 377~385.
- [66] Dang H, Li N, Chang Z, et al. *Sep. Purif. Technol.* , 2019, 233: 116025.
- [67] Yang J, Zhang Z, Zhang G, et al. *Hydrometallurgy*, 2021, 203(6) : 105638.
- [68] Fan E, Li L, Lin J, et al. *ACS Sustain. Chem. Eng.* , 2019, 7(19) : 16144~16150.
- [69] Lin J, Li L, Fan E, et al. *ACS Appl. Mater. Interf.* , 2020, 12(16) : 18482~18489.
- [70] Shi J, Peng C, Chen M, et al. *JOM*, 2019, 71(12) : 4473~4482.
- [71] Lin J, Liu C, Cao H, et al. *Green Chem.* , 2019, 21: 5904~5913.
- [72] Zhang J, Hu J, Zhang W, et al. *J. Clean. Prod.* , 2018, 204: 437~446.
- [73] Fu Y, He Y, Yang Y, et al. *J. Alloy. Compd.* , 2020, 832: 154920.
- [74] Zhao Y, Liu B, Zhang L, et al. *J. Hazard. Mater.* , 2020, 384: 121487.
- [75] Zhao Y, Liu B, Zhang L, et al. *J. Hazard. Mater.* , 2020, 396: 122740.
- [76] Jiang G, Zhang Y, Meng Q, et al. *ACS Sustain. Chem. Eng.* , 2020, 8(49) : 18138~18147.
- [77] Shi Y, Zhang M, Meng Y S, et al. *Adv. Energy Mater.* , 2019, 9(20) : 1900454.
- [78] Li X, Zhang J, Song D, et al. *J. Power Sources*, 2017, 345: 78~84.
- [79] Gao H, Tran D, Chen Z. *Curr. Opin. Electroche.* , 2022, 31: 100875.
- [80] Refly S, Floweri O, Mayangsari T R, et al. *ACS Sustain. Chem. Eng.* , 2020, 8(43) : 16104~16114.
- [81] Liu D, Su Z, Wang L. *Ceram. Int.* , 2021, 47(1) : 42~47.
- [82] Xu P, Yang Z, Yu X, et al. *ACS Sustain. Chem. Eng.* , 2021, 9(12) : 4543~4553.
- [83] Sethurajan M, Van Hullebusch E D, Fontana D, et al. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* , 2019, 49(3) : 212~275.
- [84] Huang M H, Ouyang L Z, Ye J S, et al. *J. Mater. Chem. A*, 2017, 5: 8566~8575.
- [85] Fujita T, Chen H, Wang K T, et al. *Int. J. Min. Met. Mater.* , 2021, 28(2) : 179~192.

(上接第54页)

- [23] Depaix A, Peyrottes S, Roy B. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* , 2017, DOI: 10.1002/cpnc.30 .
- [24] Takaku H, Konishi T, Hata T. *Chem. Lett.* , 1977, 6(6) : 655~658.
- [25] Ludwig J, Eckstein F. *J. Org. Chem.* , 1989, 54: 631~635.
- [26] Ti G S, Gaffney B L, Jones R. A. *J. Am. Chem. Soc.* , 1982, 104: 1316~1319.
- [27] Warnecke S, Meier C. *J. Org. Chem.* , 2009, 74: 3024~3030.
- [28] Gaur R K, Sproat B S, Krupp G. *Tetrahedron Lett.* , 1992, 33: 3301~3304.
- [29] (a) Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, et al. *PNAS*, 2009, 106(29) : 12067~12072; (b) Nagata S, Takagaki K, Wada T. *Chem. Pharm. Bull.* , 2012, 60: 1212~1215.
- [30] Sun Q, Edathil J P, Wu R Z, et al. *Org. Lett.* , 2008, 10: 1703~1706.
- [31] Yoshikawa M, Kato T, Takenishi T. *Tetrahedron Lett.* , 1967, 8: 5065~5068.
- [32] Yoshikawa M, Kato T, Takenishi T. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 1969, 42: 3505~3508.
- [33] Ludwig J. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* , 1981, 16: 131~133.
- [34] Burgess K, Cook D. *Chem. Rev.* 2000, 100: 2047~2060.
- [35] Shanmugasundaram M, Senthilvelan A, Xiao Z J, et al. *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2016, 35: 356~362.
- [36] Kore A R, Shanmugasundaram M, Senthilvelan A, et al. *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2012, 31: 423~431.
- [37] Mishra N C, Broom A D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* , 1991, 1276~1277.
- [38] Ahmadibeni Y, Parang K. *J. Org. Chem.* , 2006, 71: 5837~5839.
- [39] Caton-Williams J, Lin L, Smith M, et al. *Chem. Commun.* , 2011, 47: 8142~8144.
- [40] Mohamady S, Taylor S D. *Org. Lett.* , 2016, 18: 580~583.
- [41] Hecht S M, Kozarich J W. *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.* 1973, 331: 307~309.
- [42] Kadokura M, Wada T, Urashima C, et al. *Tetrahedron Lett.* , 1997, 38: 8359~8362.
- [43] Strenkowska M, Wanat P, Ziemniak M, et al. *J. Org. Lett.* , 2012, 14: 4782~4785.
- [44] Cremosnik G S, Hofer A, Jessen H. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* , 2014, 53: 286~289.
- [45] Sau S P, Chaput J C. *Org. Lett.* , 2017, 19: 4379~4382.
- [46] Liao J Y, Bala S, Ngor A K, et al. *J. Am. Chem. Soc.* , 2019, 141: 13286~13289.