

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201806034



半富马酸替诺福韦艾拉酚胺的 合成工艺优化

周玥莹¹, 曾皓月¹, 裘京晓², 黄程勇³, 吴振⁴, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 北京第二外国语学院 校医院, 北京 100024;

3. 福建国脉生物科技有限公司, 福建 泉州 362006;

4. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 对最新抗乙肝药物半富马酸替诺福韦艾拉酚胺(TAF)的合成工艺进行优化研究.以腺嘌呤(1)为原料,与(*R*)-碳酸丙烯酯反应得到(*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤.然后,将产物经磷叶立德取代,水解反应得到(*R*)-9-((2-磷酸单苯酯基)甲氧基)丙基)-腺嘌呤.最后,将所得产物经取代、酰化、缩合、成盐反应得到目标产物TAF,并对各步反应条件进行优化.结果表明:总收率达32.1%(以腺嘌呤计),较原工艺提高23.1%,目标化合物及主要中间体经电子轰击质谱(EI-MS)、核磁共振氢谱(¹H-NMR)、核磁共振碳谱(¹³C-NMR)确证结构;与现有文献报道的TAF合成工艺相比,优化后的工艺总收率大幅提高,反应成本降低,反应时间缩短,可避免生产过程中的安全隐患,适合工业化生产.

关键词: 半富马酸替诺福韦艾拉酚胺;腺嘌呤;(*R*)-碳酸丙烯酯;工艺改进

中图分类号: R 914.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-5013(2019)04-0527-08

Improved Synthesis of Tenofovir Alafenamide Hemifumarate

ZHOU Yueying¹, ZENG Haoyue¹, QIU Jingxiao²,
HUANG Chengyong³, WU Zhen⁴, WANG Liqiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School Hospital, Beijing International Studies University, Beijing 100024, China;

3. Fujian Guomai Biological Technology Limited Company, Quanzhou 362006, China;

4. College of Pharmacy, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The synthesis process of a new anti-hepatitis B drug, tenofovir alafenamide (TAF) hemifumarate, was optimized. Adenine (1) was used as a raw material to react with (*R*)-propylene carbonate to give (*R*)-9-(2-hydroxypropyl)adenine, followed by phosphorus ylide substitution and hydrolysis to obtain (*R*)-9-((2-phenylphenyl) methoxy)propyl)-adenine. Finally, the product obtained in the previous step was substituted, acylated, condensed and salt-formed to obtain the target product TAF, and the reaction conditions of each step were optimized. The results shows that the total yield reached 32.1% (as calculated on adenine), which was 23.1% higher than the original process, and the product and main intermediates were confirmed by electron impact mass spectrometry (EI-MS), proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and carbon 13 nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR). Compared with the TAF synthesis technology reported in the existing literature, the

收稿日期: 2018-06-13

通信作者: 王立强(1970-),男,教授,博士,主要从事药剂学和创新药物研发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700)

total yield of the process after optimization improved significantly, the reaction cost reduced, and the reaction time shortened. In addition, the security threats in the production process were avoided, which indicates that the synthesis process is suitable for industrial production.

Keywords: tenofovir alafenamide hemifumarate; adenine; (*R*)-propylene carbonate; process improvement

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是由乙型肝炎病毒(HBV)持续感染引起的慢性肝脏炎症性疾病. 全球约有三分之一人口曾感染 HBV, 其中 2.4 亿人为慢性 HBV 感染者. 据世界卫生组织(WHO)报道, 全球 30% 的肝硬化患者和 50% 肝癌患者都由 HBV 感染所致, 2013 年, 全球约有 68 万人死于 HBV 感染, HBV 感染已经成为全球公认的重大健康问题^[1-3]. 半富马酸替诺福韦艾拉酚胺(tenofovir alafenamide humifumarate, TAF)是一种治疗乙肝的新型核苷逆转录酶抑制剂, 尚未在中国上市及进口^[4]. TAF 是富马酸替诺福韦酯(TDF)的新一代替诺福韦(PMAP)口服前药, TAF 的 III 期临床试验数据显示, 25 mg 的 TAF 与 300 mg 现有的抗乙肝一线药物 TDF 的抗乙肝病毒效果相当, 且 TAF 对肾和骨骼的毒性更小, 安全性更好^[5-6], 是目前疗效最好的核苷类乙肝药物. 文献中报道的 TAF 合成路线主要有 4 条^[7-15]. TAF 的合成路线需经过中间体 (*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤或 (*R*)-9-[2-(膦酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤, 并以此为二次原料, 经过数步反应制得 TAF. 但现有的合成方法存在目标产物收率低, 反应后处理程序繁多, 合成成本高, 工业生产效率低, 存在安全性问题等缺点, 不适合工业化放大生产. 因此, 本文选择对吉利德公司的原研路线^[9]进行优化, 以腺嘌呤为起始原料, 与 (*R*)-碳酸丙烯酯反应得到 (*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤; 然后, 经磷叶立德取代、水解反应得到 (*R*)-9-(((2-磷酸单苯酯基)甲氧基)丙基)-腺嘌呤, 再经取代、酰化、缩合、成盐反应制备得到 TAF.

1 实验材料

1.1 仪器与试剂

DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, X-5 型显微熔点测定仪(河南省巩义市予华仪器有限责任公司); 1200 型高效液相色谱仪(DAD 检测器, 美国安捷伦公司); Q Exactive 型高分辨质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司).

腺嘌呤、(*R*)-碳酸丙烯酯、对甲苯磺酰氧基甲基膦酸二乙酯(优级纯, 上海邦成化工有限公司); 其余试剂为市售分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 TAF 的合成方法 文中研究的 TAF 合成路线, 如图 1 所示.

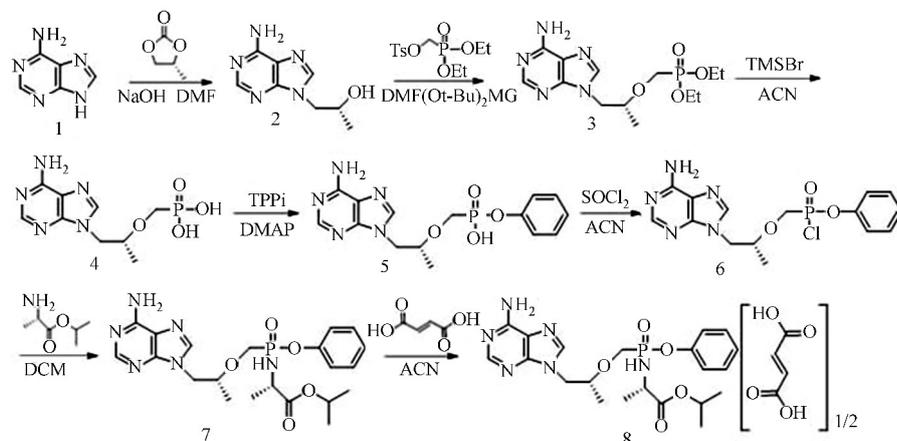


图 1 TAF 合成路线

Fig. 1 Synthetic route of TAF

1.2.2 (*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤(化合物 2)的制备 将腺嘌呤(4.1 g, 0.030 mol), (*R*)-碳酸丙烯酯(3.98 g, 0.039 mol)和氢氧化钠(0.08 g, 0.002 mol)置于 12 mL 二甲基甲酰胺(DMF)中, 130 °C 加热

<http://www.hdxh.hqu.edu.cn>

搅拌过夜.待薄层色谱(TLC)监控反应完全.将反应冷却至 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入甲苯(25.2 mL)并于室温搅拌 2 h ,抽滤,滤饼用丙酮($5\text{ mL}\times 2$)冲洗,于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥得到类白色粉末,即化合物 $2(5.37\text{ g})$,其收率为 91.6% (文献[9]为 75%),熔点为 $188.6\sim 189.7\text{ }^{\circ}\text{C}$,样品质量分数为 96.8% (高效液相色谱(HPLC)面积归一化法,检测条件:色谱柱为Sinocrom ODS-BP $\text{C}_{18}(4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m})$;流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=25:75$, V 为体积;流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长为 260 nm ;进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$;柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

$^1\text{H-NMR}(400\text{ MHz}, \text{Deuterium Oxide})$,化学位移(δ): $7.88(\text{s}, 2\text{H}), 4.16\sim 4.00(\text{m}, 2\text{H}), 3.94(\text{d}, J=8.6\text{ Hz}, 1\text{H}), 1.15(\text{s}, 3\text{H})$.化合物 2 的核磁共振氢谱,如图2所示.

1.2.3 (R) -9-[2-(二乙酰氧基磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤(化合物 3)的制备 将称取化合物 $2(5.02\text{ g}, 0.026\text{ mol})$ 置于DMF(25 mL)中,加热至 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,在 1 h 内加入叔丁醇镁($3.58\text{ g}, 0.021\text{ mol}$);当反应升温至 $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,在 2 h 内加入对甲苯磺酰氧基甲基磷酸二乙酯($16.43\text{ g}, 0.051\text{ mol}$),于 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 4 h .冷却反应至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后,加入冰醋酸调节反应液的pH值至 6 ,蒸出溶剂,加入二氯甲烷(50 mL)和质量分数为 20% 的NaCl水溶液(30 mL),搅拌 30 min ,滤除不溶物;分层取有机层,水层用二氯甲烷($20\text{ mL}\times 2$)萃取.加入无水硫酸钠干燥,过滤后将溶剂旋蒸干,得到黄色油状物,即化合物 $3(7.42\text{ g})$,其收率为 83.2% ,样品质量分数为 98.5% (HPLC面积归一化法,检测条件:色谱柱为Sinocrom ODS-BP $\text{C}_{18}(4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m})$;流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=20:80$;流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长为 254 nm ;进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$;柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

1.2.4 (R) -9-[2-(磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤(化合物 4)的制备 将化合物 $3(5.83\text{ g}, 0.017\text{ mol})$ 和三甲基溴硅烷($7.81\text{ g}, 0.051\text{ mol}$)加入乙腈(30 mL)中,于 $77\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 h ,减压蒸馏;将残余物溶解在蒸馏水(30 mL)中,用乙酸乙酯(25 mL)进行萃取,分层取水层;用NaOH调节水层pH值至 1.1 ,放入晶种,再用NaOH调节pH值至 2.1 ,室温搅拌过夜,冷却至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后过滤的灰色固体,用少量水洗涤,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥得到粗产物.将粗产物放入水(50 mL)中,加热回流 4 h ;冷却至室温后,将混合物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷却 3 h ,过滤固体,用少量水和丙酮洗涤,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,得到白色粉末,即化合物 $4(3.42\text{ g})$.其收率为 70.2% (文献[9]的收率为 50.4% ,以化合物 2 计).

$^1\text{H-NMR}(400\text{ MHz}, \text{Deuterium Oxide})$,化学位移(δ): $8.43\sim 8.23(\text{m}, 2\text{H}), 4.44(\text{dd}, J=14.8, 3.2\text{ Hz}, 1\text{H}), 4.25(\text{dd}, J=14.7, 7.0\text{ Hz}, 1\text{H}), 4.00\sim 3.88(\text{m}, 1\text{H}), 3.65(\text{dd}, J=13.2, 9.3\text{ Hz}, 1\text{H}), 3.55\sim 3.37(\text{m}, 1\text{H}), 1.13(\text{d}, J=6.4\text{ Hz}, 3\text{H})$.化合物 4 的核磁共振氢谱,如图3所示.

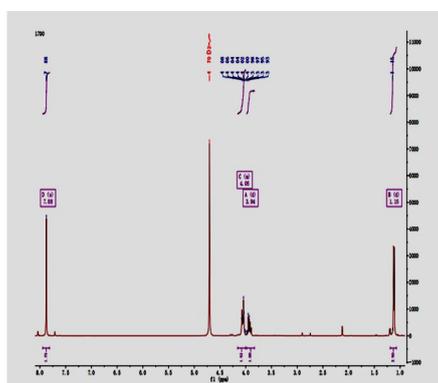


图2 化合物 2 的核磁共振氢谱

Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2

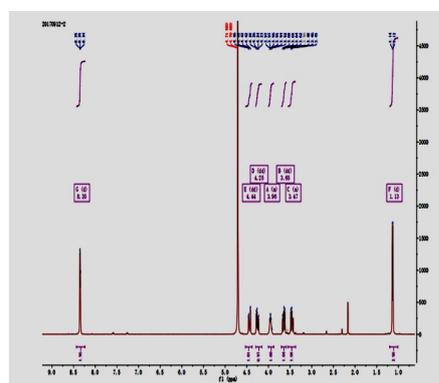


图3 化合物 4 的核磁共振氢谱

Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4

1.2.5 (R) -9-((2-磷酸单苯酯基)甲氧基)丙基-腺嘌呤(化合物 5)的制备 将称取化合物 $4(2.87\text{ g}, 0.010\text{ mol})$,亚磷酸三苯酯($6.52\text{ g}, 0.021\text{ mol}$), 4 -二甲氨基吡啶(DMAP)($0.122\text{ g}, 0.001\text{ mol}$),三乙胺($0.20\text{ g}, 0.002\text{ mol}$)于 40 mL 无水吡啶中,氮气保护条件下,将反应升温至 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$,反应 72 h ;TLC监控至反应完成后,减压蒸馏将反应液的溶剂蒸干,得到橙黄色油状物.加入水(15 mL)和乙酸乙酯(25 mL),分层取水层,水层再用乙酸乙酯(15 mL)萃取一次,取水层.用浓盐酸将水层的pH值调至 3 ,搅拌 2 h 至晶体析出,过滤,滤饼用少量乙醇洗涤,得到白色固体粗产物,于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,得到白色粉末,

即化合物 5(2.56 g). 其收率为 70.6%(文献[9]的收率为 50.7%), 样品的质量分数为 99.2%(HPLC 面积归一化法, 检测条件: 色谱柱为 Sinochrom ODS-BP C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为 V(甲醇): V(水)=35:65; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 30 °C).

¹H-NMR(400 MHz, Deuterium Oxide), 化学位移(δ): 8.27(s, 1H), 8.18(s, 1H), 7.18(t, *J*=7.7 Hz, 2H), 7.04(t, *J*=7.4 Hz, 1H), 6.68(d, *J*=7.9 Hz, 2H), 4.38(dd, *J*=15.0, 2.9 Hz, 1H), 4.22(dd, *J*=14.7, 8.7 Hz, 1H), 4.04(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 3.79(dd, *J*=13.7, 7.9 Hz, 1H), 3.53(dd, *J*=13.7, 9.0 Hz, 1H), 1.24(d, *J*=6.1 Hz, 3H). 化合物 5 的核磁共振氢谱, 如图 4 所示.

1.2.6 (*R*)-9-((2-磷酸氨基单苯酯基)甲氧基)丙基)-腺嘌呤(化合物 6)的制备 将化合物 5(2.50 g, 0.007 mol)、亚硫酸氯(SOCl₂, 1.90 g, 0.016 mol)溶于乙腈(40 mL)中, 在 75 °C 下搅拌至反应物完全溶解, 蒸除溶剂, 得到褐色油状物, 即化合物 6(2.45 g), 其收率为 93.4%.

1.2.7 替诺福韦艾拉酚胺(化合物 7)的制备 在氮气保护下, 将上一步反应所得的化合物 6(2.40 g, 0.006 mol)冷却至室温后加入二氯甲烷(35 mL)并冷却至 -29 °C, 在 -18 °C 条件下, 于 1 h 内加入含有 (*L*)-丙氨酸异丙酯(1.84 g, 0.014 mol)的二氯甲烷溶液(30 mL); 然后, 在 -18~-11 °C 的条件下缓慢加入三乙胺(1.92 g, 0.019 mol), 室温反应, TLC 监控反应完全. 将反应完毕的反应液用质量分数为 10% 的磷酸二氢钠水溶液(5 mL×5)洗涤, 无水硫酸钠除去有机反应液中的水分, 过滤. 用二氯甲烷(30 mL)冲洗, 减压蒸馏得粗产物. 将粗产物加入至质量分数为 20% 的氯化钠溶液(10 mL)洗涤, 洗涤数次后, TLC 监控直到原料点除去, 分离得浅褐色油状产物, 即化合物 7(2.17 g), 其收率 72.3%(文献[9]的收率为 46.8%, 以化合物 5 计).

¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆), 化学位移(δ): 8.13(d, *J*=13.8 Hz, 2H), 8.11(s, 1H), 7.34~7.11(m, 5H), 7.05(d, *J*=7.9 Hz, 2H), 5.65(m, *J*=11.2 Hz, 1H), 4.85(m, *J*=6.2 Hz, 1H), 4.28(dd, *J*=14.5, 3.7 Hz, 1H), 4.15(dd, *J*=14.4, 6.5 Hz, 1H), 3.96~3.70(m, 4H), 1.18~1.05(m, 12H). 化合物 7 的核磁共振氢谱, 如图 5 所示.

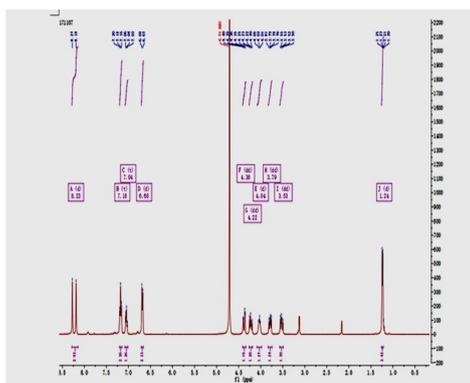


图 4 化合物 5 的核磁共振氢谱

Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of compound 5

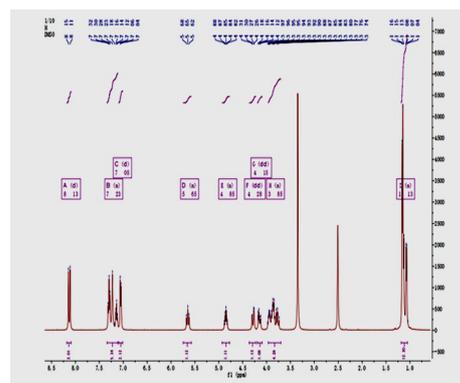


图 5 化合物 7 的核磁共振氢谱

Fig. 5 ¹H-NMR spectrum of compound 7

1.2.8 半富马酸替诺福韦艾拉酚胺(化合物 8)的制备 将化合物 7(2.00 g, 0.004 mol), 富马酸(0.14 g, 0.002 mol)加入至乙腈(50 mL)中, 加热回流直至化合物溶解, 趁热过滤, 将滤液缓慢冷却至 0~5 °C 并静置过夜, 过滤, 滤饼用冷乙腈(5 mL×2)洗涤, 真空干燥得到白色粉末状产物, 即化合物 8(1.99 g), 其收率为 88.9%, 样品的质量分数为 99.9%, 光学异构体质量分数为 0.14%(HPLC 面积归一化法, 检测条件: 色谱柱为 Sinochrom ODS-BP C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为 V(乙腈): V(醋酸铵)(10 mmol·L⁻¹, pH=6.2)=30:70; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 260 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 30 °C. HPLC 光学异构体检测条件: 色谱柱为 CHIRALPAK AD-H(250 mm×4.6 mm, 5 μm); V(正己烷): V(异丙醇)=80:20(流动相加质量分数为 0.1% 的乙二胺调节 pH 值); 检测波长为 260 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 30 °C; 进样体积为 10 μL).

ESI-MS(*m/z*): 477.3; [M+H]⁺. ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆), 化学位移(δ): 8.13(d, 2H), 7.31~7.12(m, 5H), 7.05(dt, *J*=7.3, 1.2 Hz, 2H), 6.64(s, 1H), 5.65(dd, *J*=12.0, 10.4 Hz, 1H),

4.85(hept, $J=6.3$ Hz, 1H), 4.28(dd, $J=14.4, 3.7$ Hz, 1H), 4.16(s, 1H), 3.94~3.75(m, 4H), 1.14(dd, $J=8.4, 6.6$ Hz, 9H), 1.07(d, $J=6.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6), 化学位移(δ): 173.36, 173.32, 166.45, 156.40, 152.86, 150.70, 150.62, 150.23, 141.87, 134.45, 129.94, 124.81, 121.01, 118.83, 75.88, 68.36, 65.34, 63.80, 49.52, 47.30, 21.85, 20.78, 17.09. IR(KBr) $\sigma(\text{cm}^{-1})$: 3360.4, 3176.7, 2982.9, 2890.3, 1748.2, 1663.8, 1606.9, 1420.8, 1301.2, 1206.3, 1152.3, 1104.1, 924.2. 化合物8的核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、高效液相色谱、质谱和红外光谱图,分别如图6~10所示.图10中: η 为透过率.

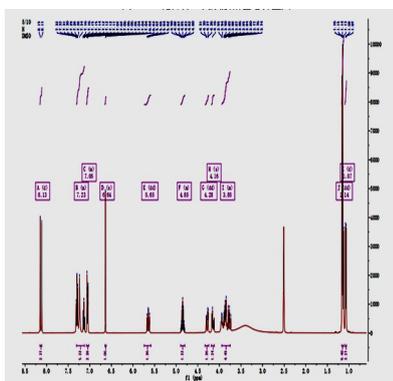


图6 化合物8的核磁共振氢谱

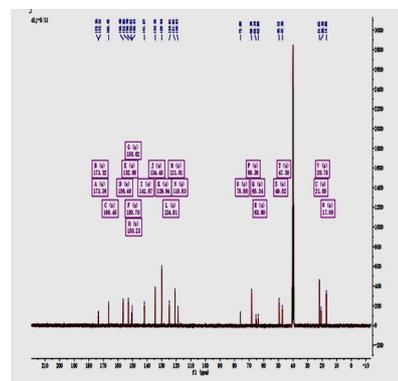
Fig. 6 ^1H -NMR spectrum of compound 8

图7 化合物8的核磁共振碳谱

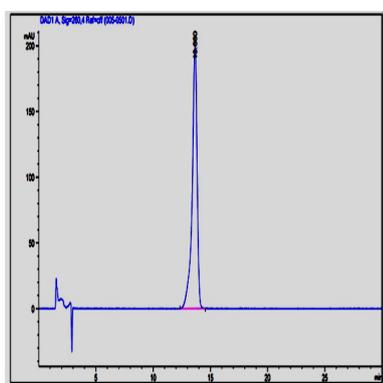
Fig. 7 ^{13}C -NMR spectrum of compound 8

图8 化合物8的高效液相色谱图

Fig. 8 High performance liquid chromatogram of compound 8

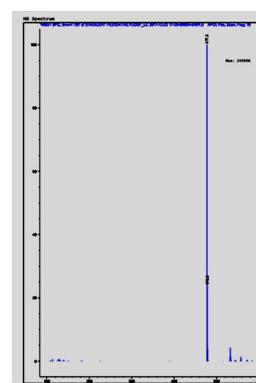


图9 化合物8的质谱图

Fig. 9 Mass spectrum of compound 8

2 合成工艺的优化

2.1 (*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤

反应的合成机理是腺嘌呤在碱性条件下形成氮负离子,从而进攻(*R*)-碳酸丙烯酯上正电荷密集的碳原子,促使其脱去一分子二氧化碳;接着,腺嘌呤上的氮负离子和碳原子链接后形成带有氧负离子的(*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤;最后,该氧负离子与一分子腺嘌呤反应生成一分子(*R*)-9-(2-羟丙基)腺嘌呤和一分子腺嘌呤氮负离子.其中,氢氧化钠在该反应中起催化作用,有利于腺嘌呤脱去氢离子从而进攻(*R*)-碳酸丙烯酯上的碳原子促使反应发生.

通过分析反应机理和前期实验得知, $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 和 $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 对实验收率有较大影响, n 为物质的量.因此,通过单因素考察实验分别考察 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸$

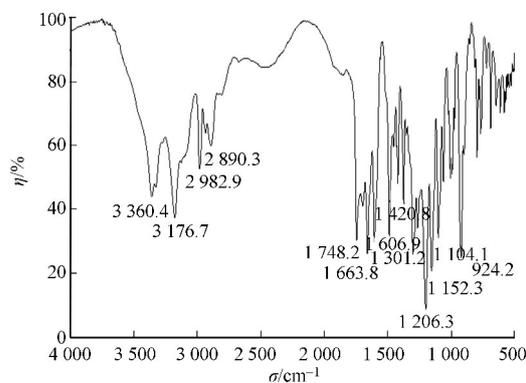


图10 化合物8的红外光谱图

Fig. 10 Infrared spectrum of compound 8

丙烯酸酯)和 $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 对 (R) -9-(2-羟丙基)腺嘌呤收率的影响,结果如图 11,12 所示.

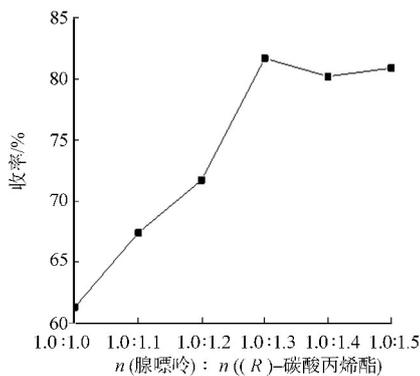


图 11 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 对化合物 2 收率的影响

Fig. 11 Effect of molar ratio of $n(\text{adenine}) : n((R)\text{-propylene carbonate})$ on yield of compound 2

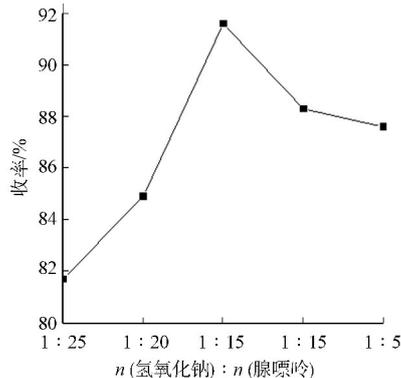


图 12 $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 对化合物 2 收率的影响

Fig. 12 Effect of molar ratio of $n(\text{NaOH}) : n(\text{adenine})$ on yield of compound 2

由图 11 可知:腺嘌呤与 (R) -碳酸丙烯酯的物质的量的比对化合物 2 的收率有较为突出的影响;当 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 为 1.0 : 1.0~1.0 : 1.3 时,收率随着比值的增大而增加;当 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 为 1.0 : 1.3 时,收率达最大值 81.7%,而后趋于平稳.

由图 12 可知: $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 对中间体 7 收率影响较大,当 $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 为 1 : 25~1 : 15 时,收率随着比值的减小而增加;当 $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 为 1 : 15 时,收率达到最大值 91.6%,而后逐渐减小.

由实验可知,当 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 为 1.0 : 1.3, $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 为 1 : 15 时,反应收率达最大值 91.6%.

2.2 (R) -9-[2-(磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤

该反应机理为三甲基溴硅烷(TMBS)与 (R) -9-[2-(二乙酰氧基磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤上发生亲电取代反应后,水解生成三甲基硅醇和 (R) -9-[2-(磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤.由反应机理可知,反应溶剂和脱烷基化试剂三甲基溴硅烷在反应中起重要作用,因此,单因素考察 $n(\text{化合物 3}) : n(\text{三甲基溴硅烷})$ 对化合物 4 收率的影响,如图 13 所示.

由图 13 可知: $n(\text{化合物 3}) : n(\text{三甲基溴硅烷})$ 对反应收率的影响较大;当比值为 1 : 3 时,反应收率达最大值 59.4%.推测可能是因为溶剂中含有较多水,使部分三甲基溴硅烷水解失去脱烷基化作用.因此,增加三甲基溴硅烷的用量可提高反应收率,故选择 $n(\text{化合物 3}) : n(\text{三甲基溴硅烷})$ 为 1 : 3 为该步实验的反应条件.

通过单因素考察反应溶剂对化合物 4 收率的影响,结果表明:以乙腈作为反应溶剂时,化合物 4 的收率为 70.2%,远高于以二甲基甲酰胺和二氯甲烷作溶剂时的收率,二者分别为 59.4%和 61.2%.究其原因,可能是乙腈和二氯甲烷溶剂中含水分较少,可以减少脱烷基化试剂的水解,从而使反应收率提高,而原料在乙腈中的溶解效果比在二氯甲烷中要好,反应在乙腈溶剂中更易形成均相体系.因此,在后续研究中将采用乙腈作为该步反应的溶剂.

2.3 (R) -9-(((2-磷酸单苯酯基)甲氧基)丙基)-腺嘌呤

原合成工艺路线采用二环己基碳二亚胺(DCC)作催化剂, (R) -9-[2-(磷酰基甲氧基)丙基]腺嘌呤与苯酚反应制得 (R) -9-(((2-磷酸单苯酯基)甲氧基)丙基)-腺嘌呤.其中,苯酚为高毒性试剂,且用 DCC

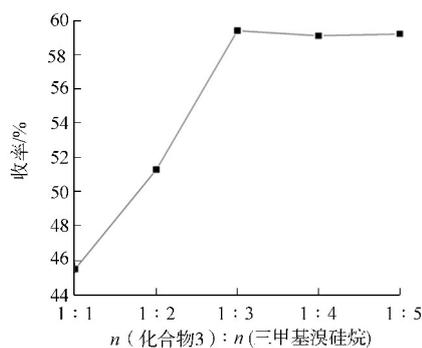


图 13 $n(\text{化合物 3}) : n(\text{三甲基溴硅烷})$ 的物质的量比对化合物 4 收率的影响

Fig. 13 Effect of molar ratio of $n(\text{compound 3}) : n(\text{TMBS})$ on yield of compound 4

做催化剂的催化效率不高,DCC反应后生成的1,3-二环己基脲(DCU)难以除净,需要经过繁琐的后处理步骤.

根据预实验结果发现,以另一工业化试剂亚磷酸三苯酯代替高毒性试剂苯酚、高效催化剂 DMAP 代替 DCC 进行反应,省去了原合成路线多次过滤,先碱调再酸调 pH 值的众多繁琐步骤,化合物 5 的收率由 50.7% 提高至 70.6%.

2.4 替诺福韦艾拉酚胺

在制备替诺福韦艾拉酚胺的过程中,原工艺采用柱层析的方法对产物进行纯化,在工业化生产中.该方法需消耗大量的人力和时间,增加药物的生产成本.经实验分析发现化合物 6 与副产物均易溶于 NaCl 溶液,而产物难溶于该溶液.因此,选择用 NaCl 溶液洗涤法代替柱层析对产物进行提纯.选择以 NaCl 溶液洗涤法代替柱层析来优化步骤,化合物 7 的收率由原来的 46.8% 提高至 72.3%,两种方法的产物纯度相近(柱层析法产物纯度为 99.3%,NaCl 溶液洗涤法产物纯度为 98.6%),且大大缩短了纯化时间,适合工业化生产.

3 讨论

以腺嘌呤为原料,与(R)-碳酸丙烯酯反应得到化合物 2,再经过取代、水解、取代、酰化、缩合、成盐共 7 步反应得到目标产物 TAF,合成的 TAF 及重要中间体经 EI-MS,¹H-NMR,¹³C-NMR 进行结构验证.通过单因素实验考察得知,在合成化合物 2 时,当 $n(\text{腺嘌呤}) : n((R)\text{-碳酸丙烯酯})$ 为 1.0 : 1.3, $n(\text{氢氧化钠}) : n(\text{腺嘌呤})$ 为 1 : 15 时,反应收率最优,为 91.6%;在合成化合物 4 时,当 $n(\text{化合物 3}) : n(\text{三甲基溴硅烷})$ 为 1 : 3,以乙腈作为反应溶剂时,反应收率最优,为 70.2%;在合成化合物 5 时,以高效催化剂 DMAP 代替 DCC 反应,以亚磷酸三苯酯代替高毒性试剂苯酚,省去了多次过滤,先碱调再酸调 pH 值等众多繁琐步骤,收率由 50.5% 提高到 70.6%,避免了反应中有毒试剂的使用,简化了操作步骤,使反应更适合工业化大生产;在合成化合物 7 时,以 NaCl 溶液洗涤法重结晶代替柱层析的纯化方式,在保证纯度的基础上,提高了产品收率,节省了生产时间,直接提高了工业生产效率.

综上所述,文中在参考大量生产路线的基础上,选择了一条最适宜工业化生产半富马酸替诺福韦艾拉酚胺合成路线进行试验,并对合成工艺进行了优化.改进后的工艺反应以腺嘌呤和(R)-碳酸丙烯酯温和反应代替金属钨催化反应,降低了生产成本;以三甲基溴硅烷取代后水解代替文献路线中的氢氧化锂水解反应,降低了工业化生产中易燃易爆的安全隐患;以 NaCl 溶液洗涤法代替柱层析进行产品纯化方式,简化了后处理步骤和时间,优化后的反应路线条件温和、步骤简便、经济安全、后处理简单、收率更高、有较高的实用性和参考价值,适合工业化生产,具有较好的应用前景.

但是,该合成研究仍有不足之处,还有以下 3 个问题有待进行更深入的研究探索.1) 中间体 2 的反应时间需要 24 h,反应时间过长将使工业生产成本直接提高.因此,需要通过进一步单因素试验考察,以期获得收率更高、反应时间更短、纯度更高的中间体 2 的生产工艺.2) 可尝试中间体 7(游离碱)与不同酸成盐(如枸橼酸、柠檬酸、酒石酸等),以期获得稳定性更好的候选药物.3) 受 TAF 和前一代药物 TDF 启发,可尝试在中间体 4 上连接多种氨基酸,进行化合物抗病毒活性与稳定性及相关药代动力学实验,尝试开发新一代抗病毒效果更好,毒副作用更小的替诺福韦前药.

参考文献:

- [1] HAMPEL A, SOLBACH P, CORNBERG M, *et al.* Current seroprevalence, vaccination and predictive value of liver enzymes for hepatitis B among refugees in Germany[J]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2016, 59(5): 578-583. DOI: 10.1007/s00103-016-2333-8.
- [2] IQBAL K, KLEVENS R M, KAINER M A, *et al.* Epidemiology of acute hepatitis B in the United States from population-based surveillance, 2006 - 2011[J]. Clinical Infectious Diseases, 2015, 61(4): 584-592. DOI: 10.1093/cid/civ332.
- [3] OTT J J, HORN J, KRAUSE G, *et al.* Time trends of chronic HBV infection over prior decades: A global analysis[J]. Journal of Hepatology, 2016, 66(1): 48-54. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.08.013.

<http://www.hdxh.hqu.edu.cn>

- [4] MARKOWITZ M,ZOLOPA A,SQUIRES K,*et al.* Phase I / II study of the pharmacokinetics, safety and antiretroviral activity of tenofovir alafenamide, a new prodrug of the HIV reverse transcriptase inhibitor tenofovir, in HIV-infected adults[J]. *J Antimicrob Chemother*,2014,69(5):1362-1369. DOI:10.1093/jac/dkt532.
- [5] AGARWAL K,FUNG S K,NGUYEN T T,*et al.* Twenty-eight day safety, antiviral activity, and pharmacokinetics of tenofovir alafenamide for treatment of chronic hepatitis B infection[J]. *Journal of Hepatology*,2015,62(3):533-540. DOI:10.1016/j.jhep.2014.10.035.
- [6] SAX P E,ZOLOPA A,BRAR I,*et al.* Tenofovir alafenamide vs tenofovir disoproxil fumarate in single tablet regimens for initial HIV-1 therapy: A randomized phase 2 study[J]. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*,2014,67(1):52-58. DOI:10.1097/QAI.0000000000000225.
- [7] ZHANG Qian,MA Baiwei,WANG Qianqian,*et al.* The synthesis of tenofovir and its analogues via asymmetric transfer hydrogenation[J]. *Organic Letters*,2014,16(7):2014-2017. DOI:10.1021/ol500583d.
- [8] 郑庆泉,黄世福,曹徐涛. 半富马酸替诺福韦艾拉酚胺关键中间体的合成工艺: 中国 104817593B[P]. 2016-11-16.
- [9] BECKER M W,CHAPMAN H H,CIHLAR T,*et al.* Prodrugs of phosphonate nucleotide analogues and methods for selecting and making same: US 20000220021[P]. 2000-07-21.
- [10] OCAMPO C E, LEE D, JAMISON T F. Selective Lewis acid catalyzed assembly of phosphonomethyl ethers: Three-step synthesis of tenofovir[J]. *Organic Letters*,2015,17(4):820-823. DOI:10.1021/ol503612h.
- [11] ROUX L,PRIET S,PAYROT N,*et al.* Ester prodrugs of acyclic nucleoside thiophosphonates compared to phosphonates: Synthesis, antiviral activity and decomposition study[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013,63(4/5/6):869-881. DOI:10.1016/j.ejmech.2013.02.039.
- [12] LARROW J F,AND S E S,JACOBSEN E N. Kinetic resolution of terminal epoxides via highly regioselective and enantioselective ring opening with TMSN₃: An efficient, catalytic route to 1,2-amino alcohols[J]. *Journal of the American Chemical Society*,1996,118(31):7420-7421. DOI:10.1002/jin.199647029.
- [13] HOLV A,MASOJÍDKOVÁ M. Synthesis of enantiomeric N-(2-phosphonomethoxypropyl) derivatives of purine and pyrimidine bases (I): The stepwise approach[J]. *Cheminform*, 1995, 27 (1): 1196-1212. DOI: 10.1135/cccc19951196.
- [14] LIU Dazhan,SHI Bing,WANG Fang,*et al.* Tenofovir alafenamide hemifumarate: US 8754065 B2[P]. 2014-06-01.
- [15] JANSÁ P,BASZCZYŃSKI O,PROCHÁZKOVÁ E,*et al.* Microwave-assisted hydrolysis of phosphonate diesters: An efficient protocol for the preparation of phosphonic acids[J]. *Green Chemistry*,2012,43(51):2282-2288. DOI: 10.1002/chin.201251161.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)