

TLR7 激动剂 A-01 的合成工艺改进

房子鑫^{1,2}, 刘丹^{2*}, 钟武^{1*}

(1. 国家应急防控药物工程技术研究中心, 北京 海淀 100080; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 优化 TLR7 小分子激动剂 5-[2-甲氧基-4-(哌嗪-1-基甲基)苄基]-*N*⁴-戊基-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2,4-二胺的合成工艺, 解决现有路线成本高、反应条件苛刻、收率低及大规模纯化难度大等问题。**方法** 首次设计了以 4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-胺为起始原料的全新合成路线; 通过优化反应缚酸剂、反应溶剂、反应温度、后处理方法等策略提升合成效率。**结果与结论** 经工艺优化, 目标化合物的收率由 17.3% 提升至 42.2% (以 4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-胺), 新路线总收率为 7.6% (以异噻唑计)。目标化合物结构经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 ESI-MS 谱确证, 优化后的合成工艺为 TLR7 激动剂的工业化生产提供了可行的解决方案。

关键词:TLR7 激动剂; 免疫刺激性药物; 合成; 工艺优化

中图分类号:R914

文献标志码:A

5-[2-甲氧基-4-(哌嗪-1-基甲基)苄基]-*N*⁴-戊基-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2,4-二胺 (**A-01**, 图 1) 是诺华公司开发的一种新型 Toll 样受体 7 (TLR7) 激动剂, 具有独特的免疫调节机制和高效活性, 能特异性激活 TLR7, 触发 MyD88 依赖的信号通路, 显著诱导干扰素 (IFN- α/β) 及促炎细胞因子 (如 IL-6、TNF- α) 的分泌^[1]。在体外实验中 **A-01** 对人胚肾 293 (HEK293) 细胞的 EC₅₀ 值低于 5 nmol·L⁻¹^[2]。**A-01** 的强效 TLR7 激动特性使其能够以更剂量激活树突状细胞、巨噬细胞等先天免疫细胞, 同时通过增强 CD8⁺ T 细胞的肿瘤浸润与杀伤能力, 在黑色素瘤、头颈鳞癌等免疫“热肿瘤”模型中显示出很好的抗肿瘤潜力^[3]。TLR7 激动剂既可单独开发为抗肿瘤免疫治疗小分子药物, 也可作为配体构建大分子药物, 突破病毒、肿瘤等疾病的治疗瓶颈^[4]。

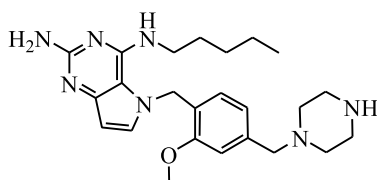


Figure 1 The structure of A-01

本文作者针对文献报道中 **A-01** 合成工艺存

在的问题, 对其路线和工艺进行了设计优化, 为规模化制备提供了经济可行的方案。

1 合成路线设计

目前文献报道的 **A-01** 合成路线主要有两条。路线 1^[5]: 如图 2 所示, 中间体 **3** 经四氢铝锂还原后生成胶状物难以分离; 中间体 **5** 含有两个氯取代位点, 在进行 Boc-哌嗪取代反应时, 这两个位点发生竞争反应, 导致副产物生成, 该步收率仅有 35.2%。副产物较多且极性与目标产物相近, 使得纯化过程困难, 增加了生产成本; 由中间体 **7** 到 **8** 的过程反应温度较高 (120 °C, 24 h), 反应体系呈深棕色, 生成胶状物, 难以分离纯化, 且该步收率只有 48.6%。该路线总收率仅有 8.6%。

路线 2^[6]: 如图 3 所示, 通过反应顺序的优化显著改进了合成工艺。将路线 1 中间体 **3** 与四氢铝锂进行的还原反应替换为中间体 **3** 与戊胺的芳香亲核取代反应得到中间体 **10**, 再进行还原、氯代等反应, 杜绝了中间体 **5** 两个氯取代位点竞争反应的问题。该步改良使副产物生成量明显减少, 有效解决了杂质分离的难题。该路线相较于路线 1 更加合理, 总收率由 8.6% 提升至 17.3%。因此, 本文作者选择在路线 2 基础上进行优化。

收稿日期: 2025-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2303304)

作者简介: 房子鑫 (1999-), 男 (汉族), 河南南阳人, 硕士研究生, E-mail: fzx0127@outlook.com; * 通信作者: 刘丹 (1978-), 女 (汉族), 黑龙江牡丹江人, 教授, 博士生导师, 主要从事基于表观遗传通路靶向抗肿瘤药物的设计与研究, Tel: (024) 43520219, E-mail: sammyld@163.com; 钟武 (1972-), 男 (汉族), 湖南衡阳人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事药物分子设计与合成研究, E-mail: zhongwu@bmi.ac.cn。

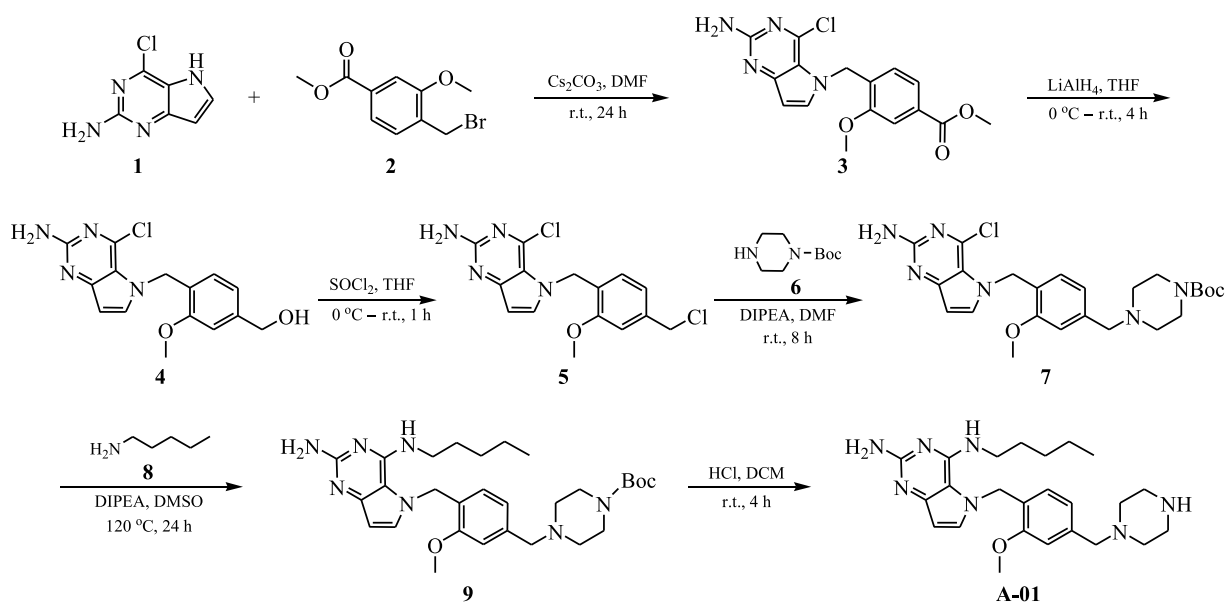


Figure 2 Synthetic route 1 to compound A-01

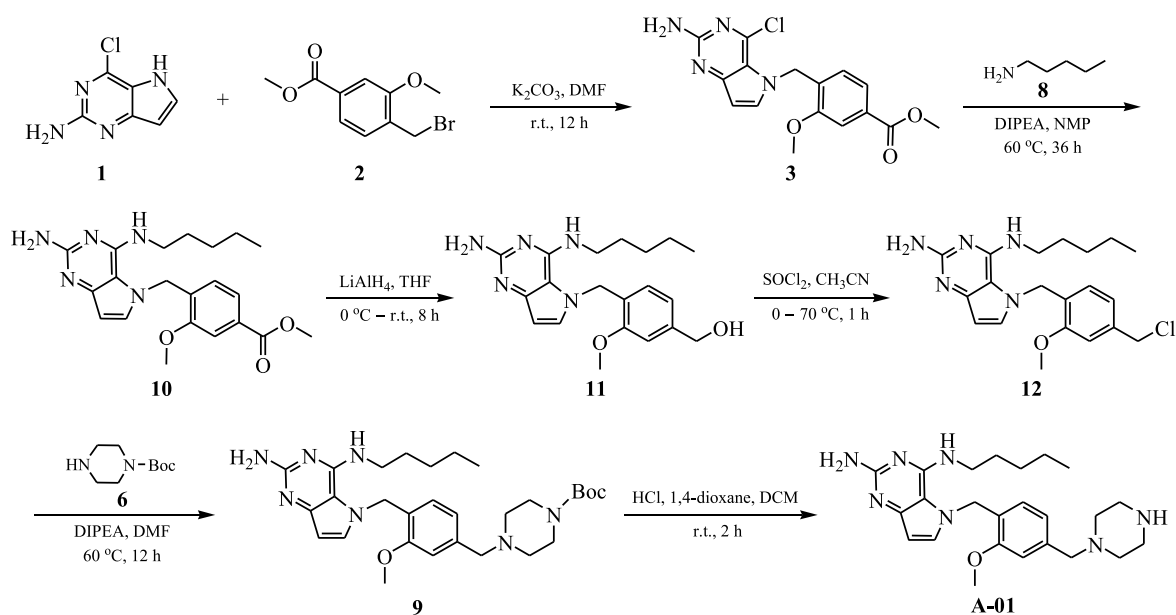


Figure 3 Synthetic route 2 to compound A-01

由于起始原料 4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-胺(**1**)的合成未见文献报道,且商业化购买成本过高,故本文作者设计了原料**1**的全新合成路线,如图4所示。原料**1**的合成路线为首次公开报道,该路线反应条件温和,成本较低,显著降低了原料**1**的合成门槛,为相关研究提供了经济可行的原料获取方案^[7-8]。

在此基础上,本文作者设计了全新的目标化合物**A-01**的合成路线并对其进行工艺优化(图4)。相较于原研路线,新路线在成本控制、反应

条件调控及后处理操作等方面均展现出显著技术优势,具体优化策略及成效如下:1)由原料**1**制备中间体**3**时,将原研工艺的高成本缚酸剂碳酸铯替换为廉价易得的碳酸钾,大幅削减反应物料成本;同时对后处理操作进行革新,采用乙酸乙酯浆洗纯化替代传统柱色谱分离,显著简化了操作步骤并缩短了生产周期;2)由中间体**3**制备中间体**10**时,通过优化溶剂体系,以*N*-甲基吡咯烷酮替代原研工艺中的*N,N*-二甲基甲酰胺,同步将反应温度由 120 °C 降至 60 °C。优化后不仅可以有

效抑制副产物的生成,更将反应收率从 46.7% 提高至 88.9%;3)由中间体 **12** 制备中间体 **9** 的过程中,经系统性条件优化,收率由 69.1% 提高至 79.3%,后处理工艺改良为乙酸乙酯溶解后滴加石油醚诱导结晶析出,规避了复杂的分离纯化操作,进一步降低生产成本的同时,更契合工业化放大生产的技术要求。

综上,本文作者开发的新工艺路线通过筛选

低成本缚酸剂、精准调控反应条件、设计适用于规模化生产的后处理操作等策略,实现了目标化合物合成效率与经济性的双重提升,具有良好的工业化应用潜力。经全流程工艺优化,以起始原料 **1** 计的总收率由原研路线的 17.3% 提升至 42.2%,工艺的操作安全性与可放大性亦得到显著改善。

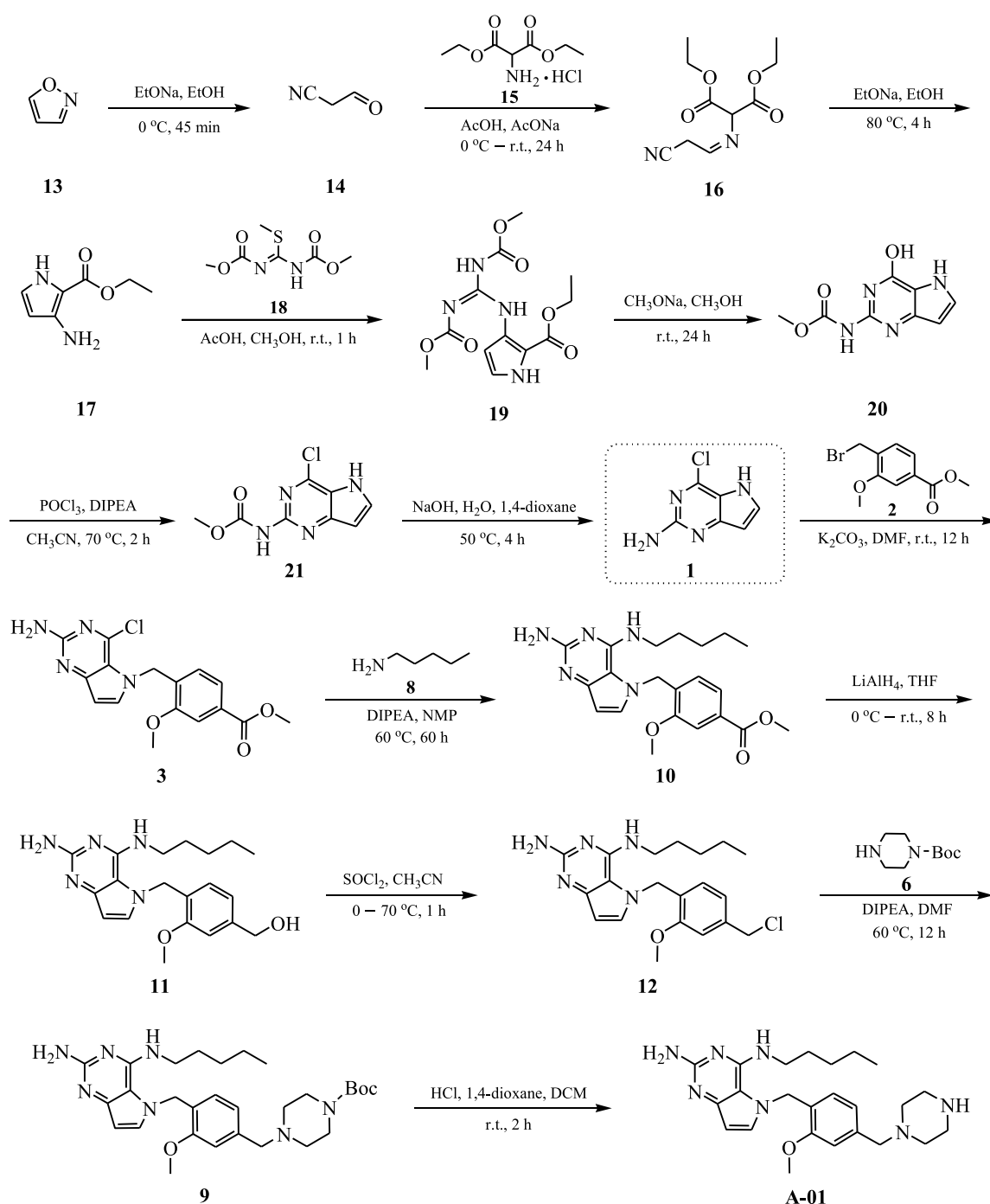


Figure 4 Optimized synthetic route to compound A-01

2 实验部分

监测反应终点采用薄层色谱法(TLC),所用TLC小板由默克 Silica gel 60G 25 Glassplates (20 cm × 20 cm) 裁剪得到。¹H-NMR、¹³C-NMR 采用 Bruker AV-600 MHz 核磁共振波谱仪测定(德国布鲁克公司),TMS 为内标;LC/MS 采用配备 ESI 源的 Agilent TOF G6230A 质谱仪测定(美国安捷伦公司);熔点采用 M-565 熔点仪测定(瑞士步琦公司);HPLC 采用 Agilent 1260 型液相色谱仪测定(美国安捷伦公司),流动相乙腈来自赛默飞公司,分析纯,超纯水为实验室自制。

异噁唑(99%)购于湖北科沃德化工有限公司;氨基丙二酸二乙酯盐酸盐(98%)、1,3-双(甲氧羰基)-*S*-甲基-2-硫脲(98%)、3-甲氧基-4-溴甲基苯甲酸甲酯(98%)购于安耐吉化学;其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

2.1 3-氨基-1*H*-吡咯-2-羧酸乙酯(17)的制备

将 100.0 g (1.45 mol) 异噁唑(13)和 500 mL 乙醇加入至 2 L 单口圆底烧瓶中,0 °C 缓慢滴加 119.2 g (1 738.6 mmol) 质量分数为 21% 的乙醇钠的乙醇溶液,维持 0 °C 反应 45 min,溶液由橘黄色转为浑浊。依次加入 28 mL 乙酸、214.4 g (1.01 mol) 氨基丙二酸二乙酯盐酸盐(15)及 83.1 g (1.01 mol) 乙酸钠,加毕,升至室温反应 24 h。反应结束,减压蒸除溶剂,残渣用 2 L 二氯甲烷溶解,经 200 mL 水洗、无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩,得到 213.9 g (946.9 mmol) 橘黄色液体(16)。

将 213.9 g (0.95 mol) 中间体 16 和 1 L 乙醇加入至 2 L 烧瓶中,滴加 77.2 g (1.14 mol) 质量分数 21% 的乙醇钠的乙醇溶液,回流反应 4 h, TLC 监测反应结束。冷却至室温,加入 30 mL 乙酸调节溶液 pH 值至 5.0,减压浓缩至干,残渣用 1 L 水溶解,经二氯甲烷(1 L × 2)萃取,合并有机相,依次用 100 mL 饱和碳酸氢钠、100 mL 水及 100 mL 饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗品。粗产物经快速硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯-石油醚,体积比 1:5 → 1:3),得到 98.1 g (636.4 mmol) 白色固体(17),收率 44.95%, mp 71.1 ~ 71.6 °C。ESI-MS m/z : 155.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.52 (s, 1H), 6.66 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.26

(t, J = 7.1 Hz, 3H)。

2.2 (4-羟基-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-基)氨基甲酸甲酯(20)的制备

将 98.1 g (636.4 mmol) 中间体 17 与 131.2 g (636.4 mmol) 1,3-双(甲氧羰基)-*S*-甲基-2-硫脲(18)溶于 500 mL 甲醇并转移至 2 L 茄形瓶中,加入 163.7 mL (2 863.8 mmol) 乙酸,室温搅拌反应 1 h。析出沉淀后,加入 343.8 g (6 364.0 mmol) 质量分数 21% 的甲醇钠的甲醇溶液,溶液变澄清,继续搅拌过夜至产物析出。滴加乙酸调节溶液 pH 值至 5.0,过滤,依次用 200 mL 水、200 mL 乙腈及 100 mL 乙醚洗涤滤饼,得到 90.6 g (435.6 mmol) 白色固体(20),收率 68.5%, mp 253.4 ~ 254.6 °C。ESI-MS m/z : 209.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.99 (s, 1H), 11.21 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 7.34 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.21 (dd, J = 2.8, 2.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H)。

2.3 (4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-基)氨基甲酸甲酯(21)的制备

将 50.0 g (240.2 mmol) 中间体 20 溶于 500 mL 乙腈并加入至 1 L 三颈烧瓶中,加热至 70 °C,加入 44.2 mL (476.4 mmol) 三氯氧磷,2 h 内缓慢滴加 82.8 mL (480.4 mmol) *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA),反应液由浑浊转为澄清。反应结束后冷却至室温,将混合物倾入含 157.6 g (1 922.0 mmol) 醋酸钠的 800 mL 水溶液中,搅拌 10 min,完全淬灭三氯氧磷,减压蒸除溶剂,析出产物经布氏漏斗抽滤,纯水淋洗,60 °C 真空干燥 24 h,得到 35.1 g (154.8 mmol) 淡黄色固体(21),收率 64.5%, mp 230.3 ~ 231.7 °C。ESI-MS m/z : 227.0 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.27 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 7.92 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 2.8, 2.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H)。

2.4 4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2-胺(1)的制备

将 35.1 g (155.3 mmol) 中间体 21 溶于 200 mL 1,4-二氧六环-水(体积比 1:1)混合溶剂并加入至 500 mL 圆底烧瓶中,加入 24.8 g (620.1 mmol) 氢氧化钠,50 °C 加热反应 4 h, TLC 监测反应完全。减压浓缩去除有机溶剂,有固体析出,经布氏漏斗抽滤,用 50 mL 乙腈淋洗滤饼,于 60 °C 真空干燥 8 h,得到 24.3 g (142.4 mmol)

白色固体(**1**), 收率 91.7%, mp 201.3 ~ 202.4 °C。ESI-MS m/z : 169.0 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.63 (s, 1H), 7.62 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 6.17 (s, 2H), 6.20 (d, J = 3.0 Hz, 1H)。

2.5 4-[(2-氨基-4-氯-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酸甲酯(**3**)的制备

将 10.0 g (59.5 mmol) 原料 **1** 与 15.5 g (59.5 mmol) 3-甲氧基-4-溴甲基苯甲酸甲酯(**2**) 溶于 200 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) 并加入至 500 mL 圆底烧瓶中, 加入 8.2 g (59.5 mmol) 碳酸钾, 氮气保护下室温搅拌反应 12 h, TLC 监测反应完全。减压浓缩得黄色固体粗品, 将粗产物溶于 100 mL 乙酸乙酯, 超声搅拌 30 min, 经布氏漏斗抽滤, 滤饼用 15 mL 乙酸乙酯淋洗, 于 60 °C 真空干燥 8 h, 得到 18.3 g (52.8 mmol) 白色固体(**3**), 收率 88.72%, HPLC 纯度 99.38% [HPLC 归一化法: 色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 A: 水 (40%); 流动相 B: 乙腈 (60%); 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 进样体积 10 μL; 保留时间 17.7 min], mp 225.1 ~ 225.7 °C。ESI-MS m/z : 347.1 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.77 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.31 (s, 2H), 6.30 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.83 (s, 3H)。

2.6 4-{[2-氨基-4-(戊基氨基)-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-5-基]甲基}-3-甲氧基苯甲酸甲酯(**10**)的制备

将 18.0 g (52.0 mmol) 中间体 **3** 溶于 300 mL *N*-甲基吡咯烷酮(NMP) 并加入至 500 mL 圆底烧瓶中, 依次加入 30.1 mL (260.1 mmol) 戊胺和 35 mL (52.0 mmol) DIPEA, 60 °C 搅拌反应 60 h, TLC 监测反应完全。减压浓缩除去溶剂, 得到黄色固体, 粗产物以 100 mL 乙酸乙酯溶解, 超声搅拌 30 min, 经布氏漏斗抽滤, 滤饼以 10 mL 乙酸乙酯淋洗, 于 60 °C 真空干燥 8 h, 得到 18.4 g (46.2 mmol) 白色固体(**10**), 收率 88.9%, HPLC 纯度 99.80% (HPLC 条件同上, 保留时间 15.7 min), mp 230.3 ~ 231.7 °C。ESI-MS m/z : 398.2 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.53 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 7.9,

1.5 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.07 (s, 2H), 5.83 (s, 2H), 5.54 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.30 ~ 3.28 (m, 2H), 1.33 (dt, J = 14.5, 6.9 Hz, 2H), 1.12 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.01 ~ 0.88 (m, 2H), 0.73 (t, J = 7.4 Hz, 3H)。

2.7 4-{[2-氨基-4-(戊基氨基)-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-5-基]甲基}-3-甲氧基苯基]甲醇(**11**)的制备

将 18.4 g (46.2 mmol) 中间体 **10** 溶于 300 mL 四氢呋喃并加入至 500 mL 圆底烧瓶中, 冷却至 0 °C 以下, 缓慢滴加 56 mL (56.6 mmol) 1 mol·L⁻¹ 的氢化铝锂四氢呋喃溶液, 升至室温搅拌反应 8 h, TLC 监测反应完全。反应液经 Fieser 法淬灭 [0 °C 下依次加入水 (56.6 mmol)、1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠水溶液 (56.6 mmol) 及水 (56.6 mmol × 3)], 过滤除去铝盐, 减压浓缩滤液, 得到白色粗产物, 加入 50 mL 乙酸乙酯, 超声搅拌 30 min, 经布氏漏斗抽滤, 滤饼以 10 mL 乙酸乙酯淋洗, 于 60 °C 真空干燥 12 h, 得到 13.3 g (36.0 mmol) 白色固体(**11**), 收率 77.8%, HPLC 纯度 96.21% (HPLC 条件同上, 保留时间 14.0 min), mp 140.2 ~ 141.9 °C。ESI-MS m/z : 370.2 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.20 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.64 (s, 1H), 5.37 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.32 ~ 3.23 (m, 2H), 1.39 (p, J = 7.2 Hz, 2H), 1.22 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.09 (tt, J = 9.2, 6.3 Hz, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

2.8 5-[4-(氯甲基)-2-甲氧基苯基]-*N*⁴-戊基-5*H*-吡咯并[3,2-*d*]嘧啶-2,4-二胺(**12**)的制备

将 13.3 g (36.0 mmol) 中间体 **11** 溶于 400 mL 乙腈并加入至 500 mL 圆底烧瓶中, 0 °C 缓慢滴加 16.5 mL (180.0 mmol) 氯化亚砷, 加热至 70 °C 反应 1 h, TLC 监测反应完全。减压蒸除溶剂, 得到 12.7 g (32.9 mmol) 黄色固体(**12**), 所得产物无需纯化即可用于后续反应, 收率 91.3%, HPLC 纯度为 97.03% (HPLC 条件同上, 保留时间 14.0 min), mp 186.1 ~ 188.3 °C。ESI-MS m/z : 388.2 [M + H]⁺。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.67 (s, 1H), 7.43 (d, J = 3.0 Hz,

1H), 7.13(d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.92(dd, $J=7.8$, 1.6 Hz, 1H), 6.53(d, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.21(d, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.56(s, 2H), 4.70(s, 2H), 3.83(s, 3H), 3.46 ~ 3.41(m, 2H), 1.43(p, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.20(q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.11 ~ 1.02(m, 2H), 0.79(t, $J=7.3$ Hz, 3H)。

2.9 4-(4-{[2-氨基-4-(戊基氨基)-5H-吡咯并[3,2-d]嘧啶-5-基]甲基}-3-甲氧基苄基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(9)的制备

将 12.7 g (32.9 mmol) 中间体 12 溶于 300 mL DMF 并加入至 500 mL 圆底烧瓶中,依次加入 30.6 g (164.5 mmol) Boc-哌嗪和 5.7 mL (32.9 mmol) DIPEA, 60 °C 搅拌反应 12 h, TLC 监测反应完全。减压浓缩去除溶剂得到胶状物,用 50 mL 乙酸乙酯溶解,加入 100 mL 石油醚,有白色固体析出,经布氏漏斗抽滤,滤饼以 10 mL 乙酸乙酯淋洗,于 60 °C 真空干燥 12 h,得到 14.0 g (26.1 mmol) 白色固体(9),收率 79.3%, HPLC 纯度 98.45% (HPLC 条件同上,保留时间 7.1 min), mp 154.6 ~ 154.9 °C。ESI-MS m/z : 538.4 [M + H]⁺。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.75(dd, $J=7.7$, 1.5 Hz, 1H), 6.38 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 5.96 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.45 ~ 3.42 (m, 2H), 3.28 (d, $J=9.9$ Hz, 4H), 2.27 (t, $J=5.0$ Hz, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.33 (p, $J=7.3$ Hz, 2H), 1.22 ~ 1.16 (m, 2H), 1.07 (tt, $J=10.3$, 6.4 Hz, 2H), 0.80 (t, $J=7.3$ Hz, 3H)。

2.10 终产物 A-01 的制备

将 14.0 g (26.1 mmol) 中间体 9 溶于 200 mL 二氯甲烷并加入至 500 mL 茄形瓶中,滴加 42 mL (186.0 mmol) 浓度为 4.5 mol·L⁻¹ 的盐酸 1,4-二氧六环溶液,室温搅拌反应 2 h,析出白色晶体, TLC 监测反应完全。过滤,滤饼用 20 mL 石油醚淋洗, 50 °C 真空干燥 24 h,得到 10.9 g (25.0 mmol) 白色固体(A-01),收率 95.6%, HPLC 纯度 99.94% [HPLC 归一化法:色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m);流动相 A: 水 (50%);流动相 B: 乙腈 (50%);检测波长 254 nm;柱温 25 °C;流速 0.8 mL·min⁻¹;进样体积 10 μ L;保留时间 12.5 min], mp 139.0 ~ 141.1 °C。HR-MS m/z :

438.2976 [M + H]⁺, calcd. for 438.2975。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J=7.8$, 1.5 Hz, 1H), 6.38 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 5.96 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.35 (s, 2H), 3.28 ~ 3.25 (m, 2H), 2.63 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 2.23 (s, 2H), 1.33 (p, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.19 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.08 ~ 1.00 (m, 2H), 0.79 (t, $J=7.4$ Hz, 3H)。 ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 158.2, 155.5, 151.2, 150.5, 140.4, 132.2, 127.1, 124.1, 122.1, 111.1, 110.9, 100.0, 63.4, 55.5, 54.6, 47.5, 46.1, 40.5, 29.0, 28.9, 22.4, 14.0。

3 结果与讨论

本文作者对新型小分子 TLR7 激动剂的合成路线进行优化,建立了 13 步反应的全新工艺路线,并首次报道了 4-氯-5H-吡咯并[3,2-d]嘧啶-2-胺(1)的合成路线。新工艺路线实现了昂贵中间体 1 的自主合成,将其单位成本由每克 1 000 元的商业价格大幅降低至每克 60 元左右,降幅达 94%,突破了大批量生产的原料供应瓶颈,为后续工业化应用奠定了基础。在此基础上,新工艺通过精准调控反应条件,收率大幅提高,总收率由原专利路线的 17.3% 提升至 42.2% (以起始原料 1 计),提升幅度 144%。同时将柱色谱纯化过程优化为浆洗、溶剂置换沉淀等方法,产品纯度大于 99%,极大简化了后处理操作。综上,新工艺路线原料成本降低、纯化步骤简便,为 TLR7 激动剂 A-01 的工业化生产提供了可行方案。

参考文献:

- [1] GE S J, FU C, CHEN J, et al. Research progress of myeloid differentiation factor 88 inhibitors[J]. Chin J Med Chem (中国药物化学杂志), 2025, 35 (6): 480 - 490.
- [2] CORTEZ A, HOFFMAN T, LI Y, et al. Compounds and compositions as toll-like receptor 7 agonists: WO, 2015168279 A1[P]. 2015 - 11 - 05.
- [3] MULLINS S R, VASILAKOS J P, DESCHLER K, et al. Intratumoral immunotherapy with TLR7/8 agonist MEDI9197 modulates the tumor microenvironment leading to enhanced activity when combined with other immunotherapies[J]. J Immuno Ther, 2019, 7 (1): 232 - 244.

- [4] ZHANG Y, LI Y, XU Z, et al. PPS-TLR7/8 agonist nanoparticles equip robust anticancer immunity by selectively prolonged activation of dendritic cells[J]. *Biomaterials*, 2025, 316(5): 1–10.
- [5] MADERNA A, GALAN A, BAJJURI K, et al. 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine-2,4-diamino compounds and antibody conjugates thereof; WO, 2020252043 [P]. 2020–12–17.
- [6] BAUM A, HAN A, KYRATSOUS C, et al. TLR7 agonists and antibody-drug-conjugates for cancer and hepatitis B treatment; WO, 2024118785 [P]. 2024–06–06.
- [7] THEOCLITOU M E, AQUILA B, BLOCK M H, et al. Discovery of (+)-*N*-(3-aminopropyl)-*N*-[1-(5-benzyl-3-methyl-4-oxo[1,2]thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-6-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamide (AZD4877), a kinesin Spindle protein inhibitor and potential anticancer agent[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(19): 6734–6750.
- [8] MCGOWAN D C, HERSCHKE F, PAUWELS F, et al. Identification and optimization of pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine toll-like receptor 7 (TLR7) selective agonists for the treatment of hepatitis B [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(14): 6137–6151.

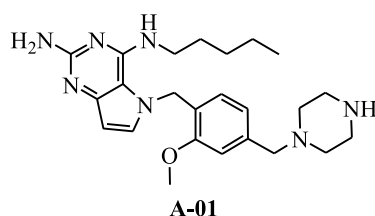
Improvement of the synthesis process of TLR7 agonist A-01

FANG Zixin^{1,2}, LIU Dan^{2*}, ZHONG Wu^{1*}

(1. National Engineering Center for the Emergency Drug, Beijing 100080, China ;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The synthetic process of the TLR7 agonist 5-[2-methoxy-4-(piperazine-1-ylmethyl)benzyl]-*N*⁴-pentyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine-2,4-diamine (**A-01**) has been optimized to address several issues in previous methods, including the high cost of starting materials, harsh reaction conditions, low yields, and challenges in scale-up. The new process significantly improved the yield, increasing from 17.3% to 42.2% (based on starting material 4-chloro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine). The total yield for the new route was 7.6% (based on isoxazole). The structure was confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and ESI-MS, with the final product exhibiting a purity of 99.94%. Additionally, a novel synthetic route for starting material 4-chloro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-amine was developed, reducing its cost from 1 000 CNY/g to approximately 60 CNY/g. Combined with key optimizations such as low-cost acid-binding agent screening, solvent system improvement, and simplified post-treatment, the process provides an economically feasible solution for large-scale production. The optimized process offers a viable approach for the industrial production of TLR7 agonists, which have shown promising potential in cancer immunotherapy and other therapeutic areas.



Key words: TLR7 agonist; immunostimulatory drug; synthesis; process optimization