

• 实验研究 •

TJ1508 的合成及晶型研究

赵胜贤, 厉 昆, 付凌燕, 任党培, 金 龙

浙江普洛得邦制药有限公司, 浙江 东阳 322118

摘 要: 目的 研发一种新型噁唑烷酮类抗生素((3*R*,3*aS*)-7-(6-((*S*)-3-甲基-2-噁唑烷酮-5-基)吡啶-3-基)-1-氧-1,3,3*a*,4-四氢苯并[b]噁唑[3,4-*d*][1,4]噁嗪-3-基)甲基)磷酸单酯(TJ1508)的合成工艺,并研究其晶型。方法 以磷酸二苄酯中间体为原料,通过酸催化脱苄基得到 TJ1508,在不同的溶剂体系中析晶得到不同晶型,采用粉末 X 射线衍射分析(PXRD)和差示扫描量热分析(DSC)对其进行表征,并对其进行加速稳定性试验和溶剂残留检测。结果 目标化合物的收率最高为 89%,得到 3 种不同的晶型 A、B 和 C,稳定性、溶剂残留和钯残留均优于化合物专利无定型产品。结论 设计了一种 TJ1508 的简易合成路线,得到 3 种稳定的晶型,其中晶型 C 最为稳定。

关键词: TJ1508; 噁唑烷酮; 磷酸二苄酯; 抗生素; 晶型

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)02-0165-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.02.001

Synthesis and polymorphic study of TJ1508

ZHAO Sheng-xian, LI Kun, FU Ling-yan, REN Dang-pei, JIN Long

Zhejiang Apeloa Tosopo Pharmaceutical Co., Ltd., Dongyang 322118, China

Abstract: Objective To study the synthetic technology of a novel oxazolidinone antibiotic ((3*R*,3*aS*)-7-(6-((*S*)-3-methyl-2-oxazolidino-5-yl)pyridin-3-yl)-1-oxo-1,3,3*a*,4-tetrahydrobenzo[b]oxazolo[3,4-*d*][1,4]oxazin-3-yl)methyl)phosphate (TJ1508), and study its crystal form. **Methods** TJ1508 was synthesized from dibenzyl phosphate intermediate by acid-catalyzed de-protection. Crystal forms were obtained from different solvent systems and characterized by powder X-ray diffraction (PXRD) and differential scanning calorimeter (DSC). Accelerated stability test and residual solvent analysis were also performed. **Results** The best yield was 89%, and crystal form A, B and C were obtained from different solvent systems. According to stability test, residual solvent and palladium residue analysis, three crystal forms were superior to amorphous one described in product patent. **Conclusion** A facile synthetic route for synthesis of TJ1508 is developed. Three stable crystal forms are obtained, and crystal form C is the most stable polymorph.

Key words: TJ1508; oxazolidinone; dibenzyl phosphate; antibiotics; crystal form

近年来,各类抗菌药物耐药菌的发展极其迅速,人类面临回到对细菌感染束手无策的“后抗生素时代”的危险^[1-3]。世界各国已经意识到研发新型抗菌药物的重要性,美国于 2012 年批准了《FDA 安全与创新法案》,其第八部分即为《鼓励开发抗生素法案》(GAIN 法案)^[4]。2016 年国家卫生计生委等 14 个部委联合下发了《关于印发遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020 年)的通知》,应对细菌耐药带来的挑战被首次提升到国家层面的高度,作为抗

击细菌耐药问题的一个重要措施,支持和鼓励新型抗菌药物的研发再次成为焦点^[5]。

((3*R*,3*aS*)-7-(6-((*S*)-3-甲基-2-噁唑烷酮-5-基)吡啶-3-基)-1-氧-1,3,3*a*,4-四氢苯并[b]噁唑[3,4-*d*][1,4]噁嗪-3-基)甲基)磷酸单酯(TJ1508)是一种新型的噁唑烷酮类抗生素候选化合物,合成路线见图 1。研究显示,其具有较同类药物更强的抗菌活性,尤其是抗多耐药菌活性,其合成工艺的最后一步是磷酸二苄酯中间体催化氢化脱苄基保护基^[6-7]。该合成路

收稿日期: 2016-11-01

作者简介: 赵胜贤(1970—),男,博士,高级工程师,主要从事药物化学及晶型研究。Tel: (0579)86559047 E-mail: 2086488660@qq.com

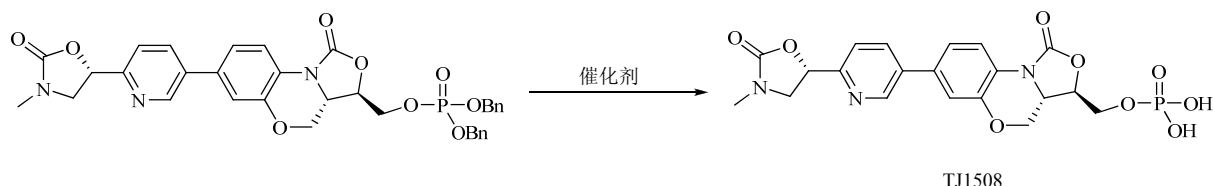


图 1 TJ1508 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of TJ1508

线最后一步使用钯碳催化剂, 终产品中的金属钯残留不易控制。同时, 晶型是影响药物质量和疗效的重要因素之一, 晶型研究已成为药学研究的一个必不可少的组成部分^[8-12]。按照原文献工艺制备得到的 TJ1508 为无定型。通常无定型产品溶剂残留容易超标, 稳定性相对较差, 因此有必要开发 TJ1508 的晶型产品。

本研究在原文献路线的基础上进行了工艺改进, 通过磷酸二苄酯中间体酸催化脱苄基保护基得到 TJ1508, 经过析晶体系的筛选, 在不同的溶剂中得到 3 种晶型: 晶型 A、B 和 C, 产品经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、MS、差示扫描量热分析 (DSC) 和粉末 X 射线衍射分析 (PXRD) 表征。研究发现, 这 3 种晶型均较原文献中的无定型产品溶剂残留低, 稳定性好, 同时由于去除了最后一步的钯催化剂, 钯残留能够符合药用要求。

1 仪器与试剂

Brucker Avance III 500 型核磁共振仪; Agilent 1260 HPLC+6120 MSD 液质联用仪; PANalytical Empyrean 衍射仪; Mettler Toledo TGA/DSC1 同步热分析仪; PlasmaQuad3 电感耦合等离子体质谱仪; Agilent 7890A 气相色谱仪; Agilent 1260 高效液相色谱仪。

所用试剂均为工业级。磷酸二苄酯中间体按文献自制^[6-7], 质量分数为 97.6%, 产品批号 151015。

2 方法与结果

2.1 合成工艺

2.1.1 晶型 A 的制备 称取磷酸二苄酯中间体 (10 g, 15 mmol) 于反应瓶中, 加入三氟乙酸 (100 mL) 搅拌溶解。冷却到 -5 °C, 保温反应 3 h。旋蒸除去三氟乙酸, 残留物用二甲亚砜 (DMSO, 20 mL) 溶解, 搅拌滴加水 (60 mL), 析出固体, 抽滤, 滤饼水洗 3 次, 真空干燥得白色固体 16.43 g, 收率 89%, 质量分数 99.6%, mp 169.24 °C (DSC); ESI-MS

m/z: 478.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.82 (3H, s, CH₃), 3.70~3.72 (1H, m, CH₂), 3.97 (1H, t, *J*=8.8 Hz, CH₂), 4.11~4.22 (4H, m, CH₂×2), 4.64~4.69 (2H, m, CH×2), 5.63 (1H, dd, *J*=9.0、6.0 Hz, CH), 7.41~7.42 (2H, m, Ph-H), 7.55 (1H, d, *J*=8.4 Hz, Py-H), 7.98 (1H, d, *J*=9.0 Hz, Ph-H), 8.15 (1H, dd, *J*=8.4、2.2 Hz, Py-H), 8.93 (1H, d, *J*=2.2 Hz, Py-H)。¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 31.2, 51.7, 52.0, 65.1, 66.3, 73.8, 74.8, 115.6, 119.7, 120.3, 121.8, 124.1, 133.0, 135.0, 135.4, 145.2, 147.9, 153.9, 156.9, 157.8, 上述数据与文献报道^[6]的基本一致。

2.1.2 晶型 B 的制备 称取磷酸二苄酯中间体 (10 g, 15 mmol) 于反应瓶中, 加入 27% 盐酸异丙醇溶液 (100 mL) 搅拌溶解, 室温反应 2 h, 旋蒸除去溶剂, 残留物用 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 20 mL) 溶解, 搅拌滴加丙酮 (60 mL), 析出固体, 抽滤, 滤饼丙酮洗涤 3 次, 真空干燥得淡黄色固体 15.87 g, 收率 81%, 质量分数 99.1%, mp 213.27 °C (DSC)。

2.1.3 晶型 C 的制备 称取磷酸二苄酯中间体 (10 g, 15 mmol) 于反应瓶中, 加入二氯甲烷 (100 mL) 搅拌溶解。再加入三氟化硼四氢呋喃络合物 (35 g), 室温反应 2 h, 旋蒸除去溶剂, 残留物用 DMSO (30 mL) 溶解, 搅拌滴加甲基叔丁基醚 (90 mL), 析出固体, 抽滤, 滤饼用甲基叔丁基醚洗涤 3 次, 真空干燥得类白色固体 15.62 g, 收率 77%, 质量分数 98.6%, mp 256.22 °C (DSC)。

2.2 晶型研究

2.2.1 粉末 X 射线衍射分析 (PXRD) Cu 辐射, 无单色器, 管压 40 kV, 管流 40 mA, 2θ 扫描范围 5~40°, 扫描速率 0.02 °/s, 采样时间 1 s, 波长 0.154 056 nm, 发散狭缝 1°。通过对比上述 PXRD 图谱及数据可以发现, 3 种晶型的特征衍射峰位置与强度存

在显著差异。其中晶型 B 的图谱最为简单, 最强峰在 17.40°, 特征衍射峰最少; 晶型 A 和晶型 C 的图谱相对复杂, 特征衍射峰较多, 晶型 A 的最强峰在 8.45°, 晶型 C 的最强峰在 21.90°。晶型 A 在 15.30°

处有一相对强度为 89%的分叉峰, 晶型 B 附近没有特征衍射峰, 晶型 C 在 15.33°、16.06°、16.72°处有 3 个相对强度分别为 25%、37%、47%的特征衍射峰。晶型 A~C 的 PXRD 图谱见图 2, 数据见表 1。

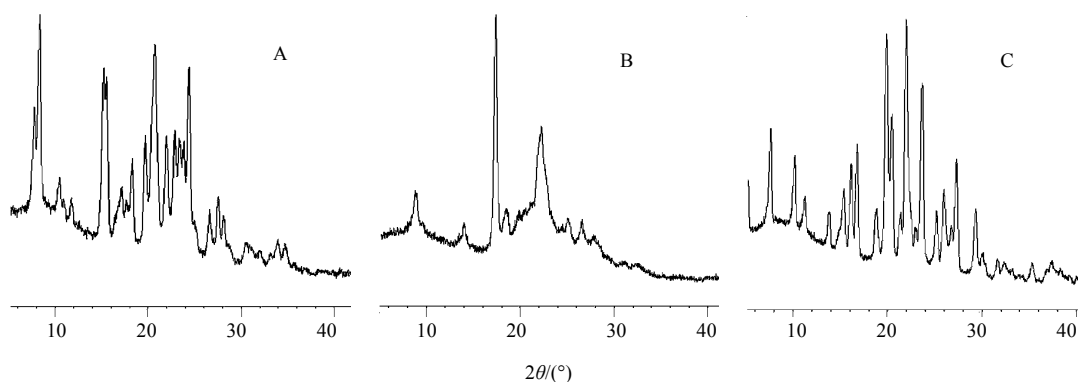


图 2 晶型 A~C 的 PXRD 图谱
Fig. 2 PXRD pattern of crystal form A — C

表 1 晶型 A~C 的 PXRD 分析数据
Table 1 PXRD data of crystal form A — C

晶型	衍射角 $2\theta/(\circ)$	面间距 d/nm	强度比 $I/I_0/\%$	晶型	衍射角 $2\theta/(\circ)$	面间距 d/nm	强度比 $I/I_0/\%$
晶型 A	7.85	11.25	53	晶型 C	22.25	3.99	37
	8.45	10.46	100		25.08	3.55	8
	10.55	8.38	21		26.60	3.35	10
	15.30	5.79	89		7.55	11.70	41
	18.38	4.82	40		10.13	8.72	31
	19.77	4.49	42		11.21	7.89	15
	20.81	4.27	92		13.72	6.45	14
	22.08	4.02	45		15.33	5.78	25
	23.00	3.86	31		16.06	5.51	37
	23.42	3.80	30		16.72	5.30	47
	23.94	3.71	30		18.79	4.72	21
	24.49	3.63	99		19.82	4.48	96
	26.70	3.34	21		20.40	4.35	59
	27.59	3.23	26		21.90	4.06	100
	28.18	3.16	19		23.62	3.76	75
晶型 B	8.86	9.97	17		25.10	3.54	22
	14.04	6.30	11		25.91	3.44	28
	17.40	5.09	100		27.22	3.27	43
	18.60	4.77	10		29.24	3.05	26

2.2.2 差示扫描量热分析 (DSC) 空白铝坩埚为对照, 升温速率为 10 °C/min, 升温范围为 30~400 °C。DSC 分析显示, 晶型 A 的 DSC 吸热峰 (熔点) 为 169.24 °C, 晶型 B 的 DSC 吸热峰 (熔点) 为 213.27

°C, 晶型 C 的 DSC 吸热峰 (熔点) 为 256.22 °C。晶型 A~C 的 DSC 图谱见图 3。

2.2.3 加速稳定性试验和溶剂残留检测 根据《中国药典》2015 年版四部通则<0861 残留溶剂测定法>

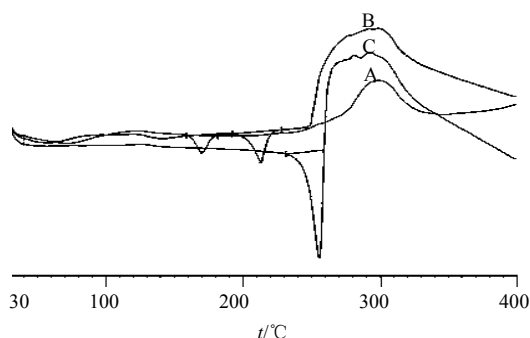


图 3 晶型 A~C 的 DSC 图谱

Fig. 3 DSC curves of crystal form A—C

及指导原则〈9001 原料药物与制剂稳定性试验指导原则〉相关规定对按化合物专利工艺^[6]制备的无定型固体和按本工艺制备的 3 种晶型产品进行加速稳定性试验和溶剂残留检测。

降解杂质检测的液相色谱条件: C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 1% 乙酸铵 (A) - 甲醇 - 乙腈 (1:1, B), 梯度洗脱 (0~5 min, 90% A; 5~25 min, 90% A→75% A; 25~50 min, 75% A→50% A; 50~60 min, 50% A→90% A); 波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

在加速稳定性试验条件 (40 °C, 75% 相对湿度) 下放置 6 个月, 按照上述液相色谱条件, 在保留时间为 19.58 min (TJ1508 的保留时间为 22.98 min) 处出现 1 个新的降解杂质, 见图 4。结果显示, 3 种晶型产品降解杂质均远小于化合物专利描述的无定型产品, 其中晶型 C 最稳定。化合物专利中 TJ1508 的无定型产品由其 DMF 溶液旋干得到, 检测其残留高达 1.03%, 远远超过不得高于 0.088% 的限度, 3 种晶型产品溶剂残留均合格。见表 2。

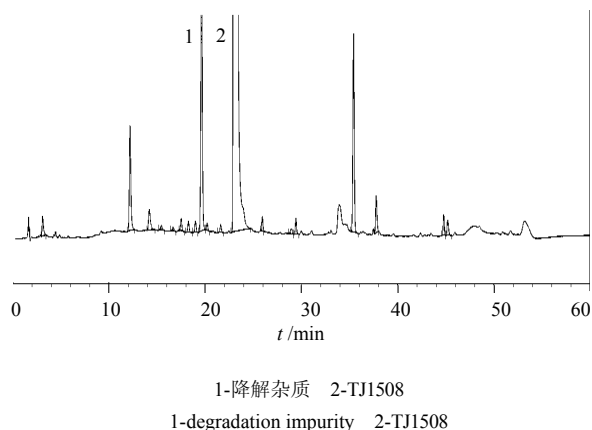
1-降解杂质 2-TJ1508
1-degradation impurity 2-TJ1508

图 4 TJ1508 的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of TJ1508

表 2 TJ1508 不同晶型的降解杂质和溶剂残留

Table 2 Degradation impurities and residual solvents of different crystal forms of TJ1508

晶型类别	降解杂质/%	溶剂残留	
		限度	实测值/%
无定型	2.64	DMF≤0.088%	1.03
晶型 A	0.24	DMSO≤0.5%	0.11
晶型 B	0.12	DMF≤0.088%	0.04
		丙酮≤0.5%	0.01
晶型 C	0.05	DMSO≤0.5%	0.02
		甲基叔丁基醚≤0.5%	0.06

3 讨论

3.1 合成工艺

原文献工艺为磷酸二苄酯中间体在钨碳催化下氢化脱苄基保护基得到 TJ1508, 液相检测存在两个主要副产物, 含量有时超过 5%, 有可能是脱苄基不完全或噁唑烷酮开环产生的, 这两个杂质后处理难以除去干净, 影响产品的质量。本方法改用酸催化脱苄基, 两个副产物最低可以控制在 0.5% 以下, 再经过析晶提纯, 产品质量能够符合药用要求。钨碳催化氢化方法的另一缺点是金属钨残留不易控制, 按照欧洲药物评审委员会 (EMA) 的指导原则, 原料药中金属钨残留不得超过 10×10^{-6} ^[13]。如果采用原文献方法, 钨残留通常在 $100 \sim 1000 \times 10^{-6}$, 严重超标。

本文的制备方法去除了钨催化剂, 产品中的无机金属杂质能够符合监管要求。本合成方法适用的酸催化剂既可以是无机酸、有机羧酸或有机磺酸等质子酸, 也可以是三氯化铁、四氯化钛、氯化锌或三氯化硼等 Lewis 酸。

3.2 晶型研究

TJ1508 的溶解度较差, 经过试验, 常用溶剂中仅溶于 DMF 和 DMSO 两个非质子极性溶剂。反溶剂考察了水和丙酮、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸、醋酸乙酯、二氯甲烷、甲基叔丁基醚、正己烷、正庚烷等多种有机溶剂。在 DMF 和 DMSO 中溶解后, 加溶剂体积 3 倍的反溶剂析晶。在不同的溶剂体系中总共得到 3 种不同的晶型, 见表 3。

按照化合物专利^[6]工艺得到的产品经检测确定为无定型产品。对晶型 A、B、C 和无定型产品进行质量比较发现: 无定型产品溶剂残留超标, 所有的晶型产品溶剂残留均合格。产品的稳定性: 晶型

表 3 TJ1508 不同晶型所用的溶剂组合

Table 3 Solvent systems of different crystal forms of TJ1508

晶型	溶剂	反溶剂
晶型 A	DMF、DMSO	水
晶型 B	DMF、DMSO	丙酮、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸、醋酸乙酯、二氯甲烷
晶型 C	DMF、DMSO	甲基叔丁基醚、正己烷、正庚烷

C>晶型 B>晶型 A>无定型产品。所有晶型产品的稳定性均明显优于无定型产品，降解杂质大幅降低。TJ1508 的晶型产品适合作为原料药成药形式。

参考文献

- [1] 郑跃杰. 细菌耐药与微生态平衡 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(4): 272-274.
- [2] Fukuda Y. New approaches to overcoming bacterial resistance [J]. *Drug Future*, 2009, 34(2): 127-136.
- [3] Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, *et al.* The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(2): 155-164.
- [4] Food and Drug Administration Safety and Innovation Act. [OL]. (2012-07-09) [2012-09-11]. <https://www.gpo.gov/>

fdsys/pkg/PLAW-112publ144/html/PLAW-112publ144.htm.

- [5] 关于印发遏制细菌耐药国家行动计划（2016-2020 年）的通知 [OL]. (2016-08-05) [2016-08-25]. http://www.gov.cn/xinwen/2016-08/25/content_5102348.htm.
- [6] Yang Y S, Guo B. Benzoxazine oxazolidinone compound, preparation method and application thereof [P]. EP: 2940024A1, 2015-11-04.
- [7] Guo B, Fan H X, Xin Q S, *et al.* Solubility-driven optimization of (pyridin-3-yl) benzoxazinyl oxazolidinones leading to a promising antibacterial agent [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(6): 2642-2650.
- [8] 吴蔚, 朱荣. 重视对药物晶型的研究 [J]. 中国药业, 2004, 13(11): 18-19.
- [9] 郝甜媛, 刘欢, 陈常青. 晶型转化对药物稳定性的影响研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 457-460.
- [10] 王哲清. 药物多晶型与有效性 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 442-446.
- [11] 殷萌, 杨峰, 张欣荣. 药物多晶型的研究现状 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(3): 163-165.
- [12] 秦雪, 王成港, 兰静, 等. 新药研发中药物盐型的筛选策略 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 414-417.
- [13] EMEA. *Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents* [S]. 2008: 1-34.