

(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯单晶制备及其结构表征

许常旭¹, 杨海刚¹, 莫小鹏¹, 胡勇¹, 钱圣典¹, 邵建平¹, 王未¹, 张俊¹, 张强¹, 毛龙^{2*}

1. 杭州艾森医药研究有限公司, 浙江 杭州 310030

2. 艾森医药股份有限公司, 美国 圣地亚哥 CA92121

摘要: 目的 培养(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯单晶, 并进行晶型表征和立体结构确证。方法 用醋酸乙酯-甲基叔丁基醚(1:1)体系培养单晶, 并采用热重法、差示扫描量热法、粉末 X 射线衍射和单晶 X 射线衍射分析。结果 制备得到无色块状晶体; 样品熔点约为 114 °C; 该晶胞属于正交晶系, 空间群为 $P2_12_12_1$, 分子式为 $C_{13}H_{22}N_2O_5$, 相对分子质量为 286.33, 晶体密度为 1.152 mg/mm³, 绝对构型为 S,S 构型。结论 确定了(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的立体构型, 培养的晶体为非水合物和溶剂化物。

关键词: (S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯; 单晶; 热重法; 差示扫描量热法; 粉末 X 射线衍射; 单晶 X 射线衍射; 构型

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)03-0604-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.03.009

Single crystal culture and its structure characterization of methyl (S)-2-(tert-butoxycarbonyl) amino-3-[(S)-2-oxopyrrolidin-3-yl] propanoate

XU Changxu¹, YANG Haigang¹, MO Xiaopeng¹, HU Yong¹, QIAN Shengdian¹, SHAO Jianping¹, WANG Wei¹, ZHANG Jun¹, ZHANG Qiang¹, MAO Long²

1. ACEA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310030, China

2. ACEA Therapeutics, Inc., San Diego, CA 92121, USA

Abstract: Objective To cultivate the single crystal and perform crystal morphology characterization and stereo-structural confirmation of methyl (S)-2-(tert-butoxycarbonyl) amino-3-[(S)-2-oxopyrrolidin-3-yl] propanoate. **Methods** The single crystals were cultivated with of ethyl acetate - methyl tert-butyl ether (1 : 1) solvent system, and TGA, DSC, XRPD, and SXRD were used to analyze. **Results** Nice colorless bulk crystals were obtained with approximately 114 °C of melting point. The crystal cell belongs to an orthogonal crystal system, with a spatial group of $P2_12_12_1$. Molecular formula was $C_{13}H_{22}N_2O_5$, molecular weight was 286.33, crystal density was 1.152 mg/mm³, and an absolute configuration was S,S style. **Conclusion** The stereo-configuration of methyl (S)-2-(tert-butoxycarbonyl) amino-3-[(S)-2-oxopyrrolidin-3-yl] propanoate has been confirmed, and the cultured crystals are non-hydrated and solvated.

Key words: methyl (S)-2-(tert-butoxycarbonyl) amino-3-[(S)-2-oxopyrrolidin-3-yl] propanoate; single crystal; TGA; DSC; PXRD; SXRD; configuration

化合物(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯是奈玛特韦和其他已上市及研发中的 M^{pro} 抑制剂如先诺特韦、来瑞特韦、阿泰特韦和奥格特韦钠的关键起始原料, 结构式见图 1。目前国内外对于(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的研究主要集中在合成、生产工艺方面^[1-4]。(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]

丙酸甲酯结构中的两个手性中心会引入到下游 M^{pro} 抑制剂中, 因此确证其绝对构型将有助于相关药物的立体构型研究。单晶 X 射线衍射是手性化合物立体构型确证的“金指标”, 能够精准分析原子的空间排布和相互间作用力, 从而确证化合物的手性构型^[5-6]。本研究对(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯单晶培养和热重法(TGA)、差示

收稿日期: 2023-12-08

作者简介: 许常旭(1987—), 男, 浙江临海人, 工程师, 主要从事药物研发。E-mail: Changxu.Xu@aceapharma.com

*通信作者: 毛龙, 男, 首席科学家, 研究方向为药物研发。E-mail: lmao@aceatherapeutics.com

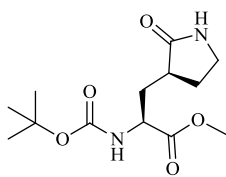


图 1 (S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of (S)-2-(tert-butoxycarbonyl) amino-3-[(S)-2-oxopyrrolidin-3-yl] propanoate

扫描量热法 (DSC)、粉末 X 射线衍射 (PXRD) 和单晶 X 射线衍射 (SXRD) 检测, 确证了其立体构型, 同时确定了其晶型特征和分子间氢键关系, 对相关药物的质量研究和控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

XTL-240 体视偏光显微镜, Mettler TGA2 热重分析仪, Bruker D8 Advance X 射线衍射仪, Bruker D8 Venture X 射线单晶衍射仪; (S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯 (宣城美诺华药业有限公司, 批号 XC023-3-221101, 面积归一化法测得质量分数为 99.7%); 醋酸乙酯、甲基叔丁醚 (试剂级, Sigma Aldrich)。

2 方法与结果

2.1 单晶的制备

根据 (S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的理化性质, 参考小试实验结果可知其易溶于醋酸乙酯、二氯甲烷, 微溶于甲基叔丁基醚、正庚烷, 因此采用交叉混合体系: 醋酸乙酯 - 甲基叔丁基醚、醋酸乙酯 - 正庚烷、二氯甲烷 - 甲基叔丁基醚和二氯甲烷 - 正庚烷进行单晶条件筛选, 其中醋酸乙酯 - 甲基叔丁基醚体系培养 2 d 析出透明块状晶体, 其他溶剂体系未能培养出合适晶体。因此本研究选取醋酸乙酯 - 甲基叔丁基醚体系通过溶剂自然挥发进行单晶培养。将 5 mg 样品溶于醋酸乙酯 - 甲基叔丁基醚 (1:1) 体系, 加热溶清后关闭加热, 自然冷却, 静置析晶 2 d, 即得到无色块状晶体。

2.2 热分析

(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯样品采用 TGA 和 DSC 进行热分析, 检测过程用氧化铝坩埚, 气体为氮气, 升温范围为 25~500 °C, 升温速率 10 °C/min, 结果见图 2。样品随温度升高, DSC 显示在 113.65 °C 处有 1 个尖锐的吸热峰, 表明样品有明确熔点; 大约 160 °C 开始

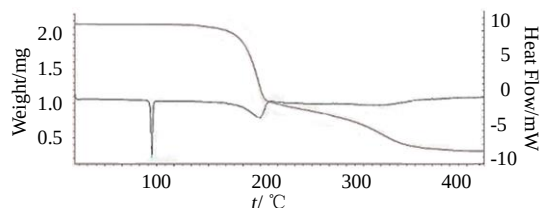


图 2 TGA 和 DSC 图谱

Fig. 2 TGA and DSC

TGA 显示样品逐渐失重, DSC 出现较宽的吸热峰, 表明样品开始逐渐分解。热分析表明样品熔点约为 114 °C, 晶体为非水合物和溶剂化物。

2.3 PXRD 分析

(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯样品晶体粉末采用 PXRD 进行分析。检测过程用 Cu K α ($\lambda=1.54060$ nm) 为辐射光源, 电压 40 kV, 电流 100 mA, 2θ 扫描范围 3~40°, 扫描步长 0.02°, 扫描速率 6°/min, 结果见图 3。样品特征峰分别位于 6.433°、9.265°、13.318°、17.385°、17.675°、18.083°、18.675°、19.299°、20.235°、20.764°、21.146°、23.091°、23.849°、25.158°, 与单晶结构理论 PXRD 结果一致。

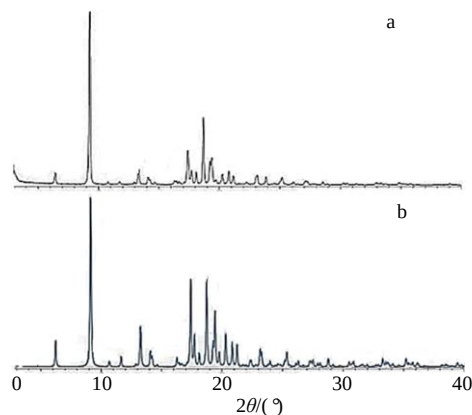


图 3 PXRD 实验图谱 (a) 和理论图谱 (b)

Fig. 3 PXRD experimental pattern (a) and theoretical pattern (b)

2.4 SXRD 分析

衍射分析所用晶体为无色块状晶体, 大小为 0.42 mm×0.35 mm×0.23 mm, 单晶衍射仪采用 CCD 面探测器收集衍射强度数据, 用 Cu K α ($\lambda=1.54178$ nm) 辐射为光源, 250 K 温度下进行衍射数据收集。

采用直接法 (ShelXT 软件) 解析晶体的结构。结果总衍射点为 62 331, 独立衍射点为 6 044, 可观

察点 $[I>2\sigma(I)]$ 5 775 点, 数据完整度 99.8%。最终 $R_1=0.040\ 2$, $wR_2=0.108\ 5$, Flack 因子为 0.01 (4), 结构可靠因子 $S=1.035$, 接近 1.0, 表明权重方案适合、结构准确。最终确定晶体属于正交晶系, 空间群为 $P2_12_12_1$, 晶胞参数 $a=8.958\ 5(2)\ \text{\AA}$ ($1\ \text{\AA}=0.1\ \text{nm}$), $b=18.905\ 2(4)\ \text{\AA}$, $c=19.500\ 6(4)\ \text{\AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, 晶胞体积 $V=3\ 302.67(12)\ \text{\AA}^3$; 晶胞内分子数 $Z=8$ 。化合物分子式为 $C_{13}H_{22}N_2O_5$, 计算晶体密度为 $1.152\ \text{mg/mm}^3$ 。用醋酸乙酯-甲基叔丁基醚体系培养, 所得晶体为非溶剂化物, 此外, 单晶结构的分析结果表明 C4、C6 手性中心为 S,S 构型, 同时分子间存在氢键。

(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯晶体于偏光显微镜下放大 10 倍, 获得的 PLM 图见图 4, 分子立体结构见图 5, 一维链状结构见图 6, 三维结构见图 7, 主要键长数据见表 1, 非氢原子坐标参数和等价各向同性位移参数见表 2, 主要键角数据见表 3, 氢键数据见表 4。

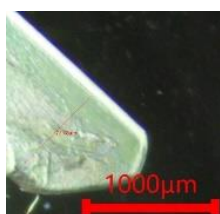


图 4 晶体 PLM 图
Fig. 4 Crystal PLM diagram

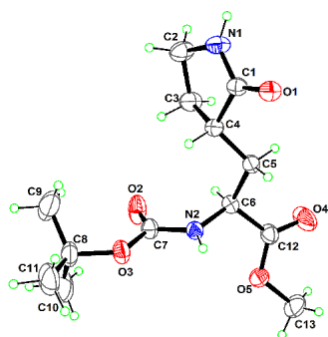


图 5 立体构型图
Fig. 5 Stereogram

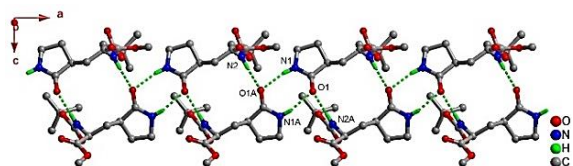


图 6 一维链状图
Fig. 6 1D chain structural diagram

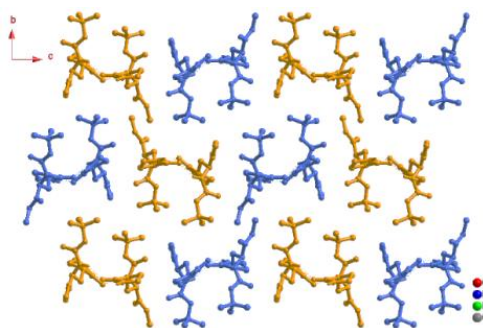


图 7 三维结构图
Fig. 7 3D structural diagram

表 1 主要成键原子的键长

Table 1 Bond lengths of main bonded atoms

原子 1	原子 2	键长/Å	原子 1	原子 2	键长/Å
O1	C1	1.236(3)	O1A	C1A	1.234(3)
N1	C1	1.326(3)	N1A	C1A	1.319(3)
N1	C2	1.454(3)	N1A	C2A	1.450(3)
C1	C4	1.516(3)	C1A	C4A	1.518(3)
O2	C7	1.208(3)	O2A	C7A	1.208(3)
N2	C6	1.439(3)	N2A	C6A	1.438(3)
N2	C7	1.340(3)	N2A	C7A	1.333(3)
C2	C3	1.526(4)	C2A	C3A	1.514(4)
O3	C7	1.347(3)	O3A	C7A	1.340(3)
O3	C8	1.470(3)	O3A	C8A	1.447(4)
C3	C4	1.536(3)	C3A	C4A	1.528(4)
O4	C12	1.183(3)	O4A	C12A	1.185(3)
C4	C5	1.515(3)	C4A	C5A	1.524(3)
O5	C12	1.312(3)	O5A	C12A	1.327(4)
O5	C13	1.445(3)	O5A	C13A	1.455(4)
C5	C6	1.532(3)	C5A	C6A	1.534(3)
C6	C12	1.518(3)	C6A	C12A	1.515(3)
C8	C9	1.486(5)	C8A	C9A	1.489(7)
C8	C10	1.513(6)	C8A	C10A	1.492(9)
C8	C11	1.516(5)	C8A	C11A	1.463(10)

3 讨论

(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯是很多 M^{pro} 抑制剂的关键起始原料, 包括笔者正在开发的口服药物奥格特韦钠^[7], 其晶型表征和结构确证将有助于相关药物质量研究。本研究采用溶剂挥发法优选到醋酸乙酯-甲基叔丁基醚体系, 培养出高质量的单晶, 所得晶体使用 TGA、DSC 和 PXRD 进行晶型表征, 采用 SXRD 进行了立体结构确证。结果表明: TGA 和 DSC 显示晶体熔点约

表 2 非氢原子坐标参数和等价各向同性位移参数

Table 2 Atomic (C, O, N) coordinates and equivalent isotropic displacement parameters

原子	$x(\times 10^4)$	$y(\times 10^4)$	$z(\times 10^4)$	$U_{eq}(\text{\AA}^2\times 10^3)$	原子	$x(\times 10^4)$	$y(\times 10^4)$	$z(\times 10^4)$	$U_{eq}(\text{\AA}^2\times 10^3)$
O1	8 083.8(18)	4 421.8(9)	3 188.2(8)	52.0(4)	O1A	2 156(2)	4 642.7(13)	3 185.3(8)	69.4(5)
N1	9 469(2)	5 099.6(13)	2 458.2(11)	59.4(5)	N1A	648(2)	4 526.7(14)	4 116.5(9)	59.0(6)
C1	8 202(2)	4 841.2(12)	2 705.0(11)	45.3(5)	C1A	1 940(3)	4 639.1(14)	3 810.3(11)	51.0(5)
O2	4 135(3)	6 257.4(10)	1 335.7(9)	77.7(7)	O2A	6 097(3)	5 655.5(12)	5 205.7(12)	88.5(7)
N2	3 647(2)	5 410.8(9)	2 120.0(9)	43.3(4)	N2A	6 523(2)	4 776.7(10)	4 450.9(10)	49.6(4)
C2	9 283(3)	5 593.3(18)	1 893.3(14)	68.4(7)	C2A	698(3)	4 576(2)	4 858.1(12)	70.4(8)
O3	3 046(2)	6 511.8(8)	2 358.9(9)	60.0(5)	O3A	7 613(2)	5 794.2(10)	4 283.1(13)	77.5(6)
C3	7 690(3)	5 447.8(17)	1 655.0(13)	62.2(7)	C3A	2 235(3)	4 874(2)	5 002.0(14)	74.1(9)
O4	3 831(3)	3 659.8(13)	1 442(2)	131.2(14)	O4A	7 724(2)	3 491.7(13)	4 736.3(14)	85.0(7)
C4	6 915(2)	5 136.3(12)	2 289.3(11)	46.2(5)	C4A	3 140(3)	4 751.4(13)	4 348.6(12)	49.0(5)
O5	1 947(2)	4 382.3(9)	1 601.5(9)	56.6(4)	O5A	5 675(3)	3 138.1(13)	5 277.3(16)	105.2(10)
C5	5 751(3)	4 572.9(12)	2 150.3(12)	47.3(5)	C5A	4 174(3)	4 111.8(12)	4 371.8(12)	48.6(5)
C6	4 386(3)	4 847.0(11)	1 758.7(11)	44.1(5)	C6A	5 591(2)	4 264.0(12)	4 787.6(11)	45.3(5)
C7	3 649(3)	6 077.6(12)	1 886.8(11)	47.9(5)	C7A	6 694(3)	5 430.3(13)	4 694.9(13)	54.0(6)
C8	2 950(4)	7 278.1(13)	2 237.5(18)	75.4(9)	C8A	7 846(6)	6 547.0(18)	4 365(3)	112.1(12)
C9	4 441(6)	7 584(2)	2 082(3)	125.3(19)	C9A	8 893(9)	6 712(3)	3 794(4)	207(3)
C10	1 794(7)	7 412(2)	1 687(3)	134(2)	C10A	6 381(9)	6 902(3)	4 249(4)	190(3)
C11	2 396(6)	7 550(2)	2 923(3)	117.8(17)	C11A	8 477(12)	6 707(4)	5 040(5)	252(4)
C12	3 373(3)	4 226.8(13)	1 589.8(14)	56.5(6)	C12A	6 488(3)	3 599.6(14)	4 926.1(14)	59.1(6)
C13	937(4)	3 805.0(17)	1 459(2)	81.6(9)	C13A	6 370(7)	2 459(2)	5 424(3)	146(2)

表 3 主要键角数据

Table 3 Data of angle

原子 1	原子 2	原子 3	键角/(°)	原子 1	原子 2	原子 3	键角/(°)	原子 1	原子 2	原子 3	键角/(°)
C1	N1	C2	114.4(2)	O3	C8	C9	111.3(3)	C5A	C4A	C3A	114.7(2)
O1	C1	N1	125.9(2)	O3	C8	C10	108.6(3)	C12A	O5A	C13A	116.5(3)
O1	C1	C4	125.4(2)	O3	C8	C11	102.2(3)	C4A	C5A	C6A	111.71(19)
N1	C1	C4	108.75(19)	C9	C8	C10	113.9(4)	N2A	C6A	C5A	111.45(18)
C7	N2	C6	122.01(18)	C9	C8	C11	110.0(3)	N2A	C6A	C12A	109.41(19)
N1	C2	C3	102.8(2)	C10	C8	C11	110.2(4)	C12A	C6A	C5A	112.2(2)
C7	O3	C8	120.9(2)	O4	C12	O5	123.0(3)	O2A	C7A	N2A	124.7(2)
C2	C3	C4	104.3(2)	O4	C12	C6	123.1(3)	O2A	C7A	O3A	125.8(2)
C1	C4	C3	103.18(18)	O5	C12	C6	113.9(2)	N2A	C7A	O3A	109.4(2)
C5	C4	C1	111.12(19)	C1A	N1A	C2A	114.4(2)	O3A	C8A	C9A	102.4(3)
C5	C4	C3	115.9(2)	O1A	C1A	N1A	125.9(2)	O3A	C8A	C10A	107.4(5)
C12	O5	C13	115.9(2)	O1A	C1A	C4A	124.8(2)	O3A	C8A	C11A	111.0(5)
C4	C5	C6	113.63(18)	N1A	C1A	C4A	109.32(18)	C9A	C8A	C10A	110.2(5)
N2	C6	C5	111.93(18)	C7A	N2A	C6A	121.9(2)	C11A	C8A	C9A	112.7(6)
N2	C6	C12	113.8(2)	N1A	C2A	C3A	103.7(2)	C11A	C8A	C10A	112.6(7)
C12	C6	C5	108.89(18)	C7A	O3A	C8A	121.8(3)	O4A	C12A	O5A	124.1(3)
O2	C7	N2	124.5(2)	C2A	C3A	C4A	105.7(2)	O4A	C12A	C6A	125.6(3)
O2	C7	O3	125.5(2)	C1A	C4A	C3A	102.85(19)	O5A	C12A	C6A	110.2(2)
N2	C7	O3	109.93(19)	C1A	C4A	C5A	109.9(2)				

表 4 氢键数据

Table 4 Data of hydrogen bond

质子供体 D-H	质子受体 A	D-H 键长/Å	H-A 距/Å	D-A 距/Å	DHA 角/(°)
N1-H1	O1A[1+x,+y,+z]	0.87	2.07	2.924(3)	168.0
N2-H2	O1A	0.87	2.06	2.865(3)	153.3
N1A-H1A	O1[-1+x,+y,+z]	0.87	2.08	2.931(3)	164.6
N2A-H2AA	O1	0.87	2.04	2.910(3)	177.5

为 114 ℃，是非水合物和溶剂化物；PXRD 显示了该晶型的特征峰，并与 Material Studio 软件对单晶结构数据模拟的 PXRD 理论图谱保持一致，表明该晶型可能是(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的稳定晶型；SXR D 显示分子结构为氨基端被 Boc 保护，羧基端形成甲酯，中间接有吡咯烷酮；分子中心和吡咯环上各有 1 个手性碳原子，绝对构型为 S,S 构型，且分子间存在氢键，表现为两个分子的氧代吡咯烷基团的羰基和氨基互相作为氢键的受体和供体，将分子头头相连，同时 Boc-氨基提供氢键给邻近分子的氧代吡咯烷羰基，将分子连接成一维超分子链，链与链之间通过分子间作用力平行堆叠，形成三维堆积结构。本研究对(S)-2-(Boc-氨基)-3-[(S)-2-氧代-3-吡咯烷基]丙酸甲酯的晶型表征和单晶结构解析为下游 M^{pro} 抑制剂的质量研究和立体结构确证提供了重要参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Vuong W, Vederas J C. Improved synthesis of a cyclic glutamine analogue used in antiviral agents targeting 3C and 3CL proteases including SARS-CoV-2 M^{pro} [J]. *J Org*

Chem, 2021, 86: 13104-13110.

[2] Tian Q, Nayyar N K, Babu S, *et al*. An efficient synthesis of a key intermediate for the preparation of the rhinovirus protease inhibitor AG7088 via asymmetric dianionic cyanomethylation of N-Boc-L-(+)-glutamic acid dimethyl ester [J]. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42 (39): 6807-6809.

[3] 洪浩, 詹姆斯·盖吉, 肖毅, 等. 2-氧吡咯烷衍生物其制备方法及中间体的制备方法: 中国, CN114409585A [P]. 2022-04-29.

[4] Algera R F, Allais C, Becirovic H, *et al*. Synthesis of nirmatrelvir: Development of magnesium sulfate-mediated aminolysis for the manufacture of the eastern fragment [J]. *Org Process Res Dev*, 2023, 27(12): 2271–2279.

[5] 赖群萍, 高浩凌, 李昌芳, 等. 左氧氟沙星的单晶制备及其结构表征 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(10): 2032-2038.

[6] 朱兰芳, 范钢, 王文斌, 等. 盐酸去甲金霉素的单晶制备及其结构表征 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(3): 547-552.

[7] Mao L, Shaabani N, Zhang X, *et al*. An oral antiviral olgotrelvir with dual inhibitory activities of SARS CoV-2 M^{pro} and cathepsin L as a standalone intervention candidate for COVID-19 [J]. *Medicine*, 2024, 5(1): 42-61.

【责任编辑 解学星】