

替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐的制备及其稳定性研究

陈鸿翔^{1,2}, 毛建丰², 盛荣^{1*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.杭州和泽医药科技有限公司, 杭州 310018)

摘要: 目的 制备替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐, 并开展稳定性研究。方法 以替诺福韦(PMPA)为原料, 经亚磷酸三苯酯缩合、二氯亚砷氯化、L-丙氨酸异丙酯缩合制得替诺福韦艾拉酚胺, 再与 D-(-)-酒石酸成盐。结果 制得的替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐, 经 ¹H-NMR、³¹P-NMR、MS 确证结构, 并与半富马酸盐进行稳定性比较。结论 替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐比半富马酸盐具有更好的稳定性, 值得进一步开发。

关键词: 替诺福韦艾拉酚胺; 替诺福韦; D-(-)-酒石酸; 稳定性

中图分类号: R914.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)07-0978-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.010

引用本文: 陈鸿翔, 毛建丰, 盛荣. 替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐的制备及其稳定性研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 978-981.

Preparation and Stability Research of Tenofovirafenamide D-(-)-Tartaric Acid Salt (2 : 1)

CHEN Hongxiang^{1,2}, MAO Jianfeng², SHENG Rong^{1*} (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Hangzhou Heze Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare tenofovirafenamide D-(-)-tartaric acid salt(2:1)and to study its stability. **METHODS** Tenofovir (PMPA) was utilized as the starting material, condensed with triphenylphosphite, chlorinated by thionyl chloride, and then condensed with L-alanine isopropyl to obtain tenofovirafenamide. Tenofovirafenamide was reacted with D-(-)-tartaric acid to form the salt. **RESULTS** The chemical structure of tenofovirafenamide D-(-)-tartaric acid salt (2 : 1) was confirmed by ¹H-NMR, ³¹P-NMR, MS. The stability of the compound was also studied and compared with tenofovirafenamide hemifumarate. **CONCLUSION** The results showed that D-(-)-tartaric acid salt has a better effect on stability than hemifumarate salt. It is worthy to be further developed.

KEY WORDS: tenofovirafenamide; D-(-)-tartaric acid; stability

我国有乙型肝炎病毒(HBV)(简称乙肝)感染者九千多万, 乙肝患者二千余万, 乙肝最终可发展为肝硬化、肝癌, 因此乙肝仍然是当前严重威胁人类健康的杀手^[1]。目前临床用于乙肝治疗的主要以核苷类药物为主, 包括拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(Adefovir, ADV)、替比夫定(telbivudine, LdT)、替诺福韦酯(tenofovir disoproxil, TDF)和恩替卡韦(entecavir, ETV)^[2]。其中 TDF 与大多数核苷类似物不同, 无需转化成三磷酸形式, 只要二磷酸形式就能抑制 HBV-DNA 聚合酶^[3-4], 这引起了人们的广泛关注。但是 TDF 存在一定的肾毒性和骨骼毒性, 因此, 吉利德(Gilead)公司将 TDF 改造为替诺福韦艾拉酚胺半富马酸(tenofovir alafenamide, TAF)。25 mg 的 TAF 疗效与 300 mg TDF 相当, 且对肾脏和骨骼的不良反应有所降低^[4]。该公司报道了利用手性柱制备的方法得到替诺福

韦艾拉酚胺后, 再与富马酸成盐^[5-6], 并报道了 TAF 盐具有良好的稳定性, 并且具有一定的手性提纯效果^[7]。笔者在对替诺福韦艾拉酚胺的研究中发现, 利用 D-(-)-酒石酸与替诺福韦艾拉酚胺成盐^[8], 不但具有良好的拆分效果, 而且得到的替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐具有良好的热力学稳定性和化学稳定性。因此, 笔者对其结构进行表征, 并与 TAF 盐进行稳定性比较研究, 为替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐的开发提供依据。替诺福韦艾拉酚胺的合成路线见图 1。

1 仪器与试剂

AV-600 核磁共振仪(美国 Bruker); ZQ400 质谱(美国 Waters); Q200 差热扫描量热仪(美国 TA); U3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司); TAF 盐为自制, 纯度 99.82%; 替诺福韦(PMPA)购自浙江苏泊尔制药有限公司; 亚磷酸三苯酯、4-二甲氨基吡

作者简介: 陈鸿翔, 男, 高级工程师 Tel: 15988111228
副教授 Tel: (0571)88208458 E-mail: shengr@zju.edu.cn

E-mail: chen hongxiang@hezepharm.com

*通信作者: 盛荣, 男, 博士,

啉(DMAP)、三乙胺(Et_3N)、二氯亚砷(SOCl_2)、乙腈(CH_3CN)、二氯甲烷(DCM)等试剂均购自浙江常青化工有限公司。

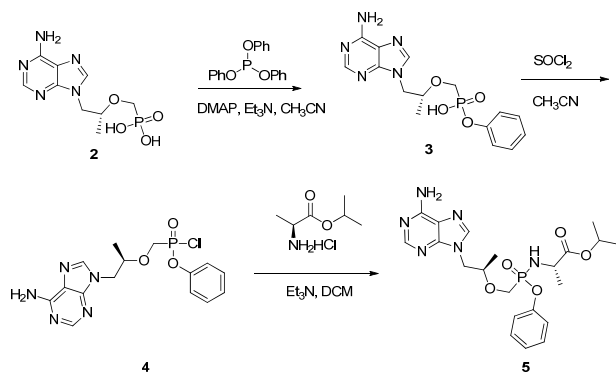


图1 替诺福韦艾拉酚胺的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of TAF

2 合成方法

2.1 化合物3的制备

室温下,向500 mL三颈瓶中加入320 mL乙腈,搅拌下依次加入40.00 g(139.28 mmol)替诺福韦(2)、28.40 g(280.68 mmol)三乙胺、17.04 g(139.48 mmol)4-二甲氨基吡啶和64.80 g(208.84 mmol)亚磷酸三苯酯,将混合物置于油浴加热至微回流,保温反应 ≥ 48 h(图1),反应结束,冷却至45 °C,减压浓缩反应液得桔色油状物,加入80 mL乙酸乙酯和120 mL水稀释,分层,水层用乙酸乙酯萃取2次,每次80 mL,向水层滴加约20 mL浓盐酸,调pH至3,析晶4 h,过滤,滤饼用少量水洗涤,滤饼直接用400 mL甲醇打浆,过滤,滤饼用40 mL甲醇洗涤后,将滤饼置于45 °C鼓风烘箱干燥16 h,得27.92 g白色固体,收率为55.2%。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 8.25(s, 1H, 嘧啶环 H), 8.17(s, 1H, 咪唑环 H), 7.16(t, $J=8.0$ Hz, 2H, Ph-H), 7.03(t, $J=7.4$ Hz, 1H, Ph-H), 6.66(d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ph-H), 4.36(dd, $J=15.0, 3.0$ Hz, 1H, NCH_2), 4.21(dd, $J=15.0, 9.0$ Hz, 1H, NCH_2), 4.04-3.98(m, 1H, OCH), 3.77(dd, $J=13.5, 7.5$ Hz, 1H, OCH_2), 3.51(dd, $J=13.5, 9.0$ Hz, 1H, OCH_2), 1.22 (d, $J=6.0$ Hz, 3H, CH_3); ESI-MS m/z : 364.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2.2 化合物4的制备

室温下,向500 mL三颈瓶中加入250 mL乙腈,搅拌下加入25.00 g(68.80 mmol)化合物3,搅拌15 min,向体系中加入12.30 g(103.40 mmol)氯化亚砷,将混合物置于油浴加热至75 °C,保温反

应16 h(图1),反应结束,冷却至45 °C,减压浓缩反应液得类白色固体(化合物4)26.25 g,收率为99.9%,无需进一步纯化,直接用于下一步。

2.3 化合物5的制备

室温下,向500 mL三颈瓶中加入250 mL二氯甲烷,搅拌下加入51.75 g(308.70 mmol)L-丙氨酸异丙酯盐酸盐,将体系置于冰盐浴中降温至-15 °C,然后滴加32.30 g(319.20 mmol)三乙胺,滴加过程维持反应体系内温 ≤ -10 °C,滴加完毕保温搅拌30 min,分批加入26.25 g(68.80 mmol)化合物4,维持反应体系内温 ≤ -10 °C,加毕,保温搅拌1 h(图1),升温至室温,保温搅拌1 h,反应毕,将反应体系过滤,滤饼用少量二氯甲烷洗涤,滤液用10%磷酸二氢钠溶液萃取3次,每次250 mL,分得有机相,有机相用无水硫酸钠25.00 g干燥,过滤,滤液减压浓缩至干得油状物25.11 g,收率为76.6%,HPLC手性纯度为50.41%。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.14(s, 1H, 嘧啶环 H), 8.10(s, 1H, 咪唑环 H), 7.29(dd, $J=8.5, 7.0$ Hz, 2H, Ph-H), 7.20(s, 2H, NH_2), 7.15-7.11(m, 1H, Ph-H), 7.05(dt, $J=8.5, 1.0$ Hz, 2H, Ph-H), 5.63(dd, $J=12.0, 10.0$ Hz, 1H, NH), 4.87-4.81(m, 1H, NHCH), 4.27(dd, $J=14.5, 4.0$ Hz, 1H, NCH_2), 4.15(dd, $J=14.5, 6.5$ Hz, 1H, NCH_2), 3.96-3.91(m, 1H, OCH), 3.89-3.81(m, 2H, OCH_2 和 CH_3CHCH_3), 3.77(dd, $J=13.5, 10$ Hz, 1H, OCH_2), 1.16(d, $J=6.5$ Hz, 6H, CH_3CHCH_3), 1.14(d, $J=7.0$ Hz, 3H, OCHCH_3), 1.07(d, $J=6.0$ Hz, 3H, NCHCH_3); ESI-MS m/z : 477.19 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2.4 化合物1a的制备

室温下,向50 mL三颈瓶中加入20 mL乙腈和2.5 mL乙醇,搅拌下加入4.00 g(8.40 mmol)化合物5,0.60 g(4.00 mmol) D-(-)-酒石酸,加热升温至微回流,保温搅拌1 h(图2),自然冷却,过滤,滤饼用少量乙腈洗涤,滤饼于45 °C鼓风干燥,得1.76 g白色固体,收率为79.6%,HPLC手性纯度为99.05%(面积归一化法)。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.15(s, 1H, 嘧啶环 H), 8.11(s, 1H, 咪唑环 H), 7.30(t, $J=8.0$ Hz, 2H, Ph-H), 7.22(s, 2H, NH_2), 7.14(t, $J=7.0$ Hz, 1H, Ph-H), 7.06(d, $J=8.0$ Hz, 2H, Ph-H), 5.63(dd, $J=12.0, 10.5$ Hz, 1H, NH), 4.88~4.83(m, 1H, NHCH), 4.32(s, 1H, 酒石酸 CH), 4.28(dd, $J=14.5, 3.5$ Hz, 1H,

NCH₂), 4.16(dd, *J*=14.5, 6.5 Hz, 1H, NCH₂), 3.97~3.93(m, 1H, OCH), 3.91~3.82(m, 2H, OCH₂和 CH₃CHCH₃), 3.77(dd, *J*=13.5, 10 Hz, 1H, OCH₂), 1.16(d, *J*=6.0 Hz, 6H, CH₃CHCH₃), 1.14(d, *J*=7.0 Hz, 3H, OCHCH₃), 1.08(d, *J*=6.0 Hz, 3H, NCHCH₃); ESI-MS *m/z*: 477.19 [M+H]⁺.

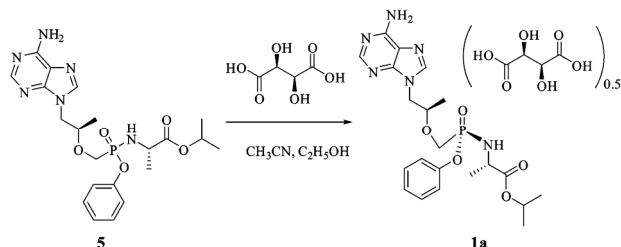


图2 替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐的合成路线
Fig. 2 Synthetic route of TAF D-(-)-tartaric acid salt (2 : 1)

2.5 化合物 1b~1e 的制备

化合物 1b~1e 的制备方法同化合物 1a 的制备, 仅仅把与替诺福韦艾拉酚胺成盐的酸依次替换为 L-(+)-酒石酸、S-(+)-扁桃酸、顺丁烯二酸和 L-苹果酸, 相应的试验结果见表 1。

表 1 化合物 1b~1e 制备结果

Tab. 1 Synthesis results of compound 1b~1e

化合物 代号	化合物 结构式	手性纯 度/%	收率/ %	产物 性状	³¹ P- NMR/δ	EI-MS <i>m/z</i> [M+H] ⁺
1b		20.13	57.0			
1c		51.30	92.4	白色 泡沫 状固 体	22.13, 23.14	477.19
1d		50.34	93.9			
1e		50.44	96.1			

注: ³¹P-NMR 的检测条件为 202 MHz, DMSO-d₆。

Note: The test conditions of ³¹P-NMR was 202 MHz and DMSO-d₆.

综上, 由“2.4”及“2.5”试验结果可知: 在考察的条件下, 替诺福韦艾拉酚胺与 D-(-)-酒石酸成盐形成得到的化合物 1a, 相比替诺福韦艾拉酚

胺与其他成盐得到的化合物 1b~1e 具有更好的手性纯度, 适合于进一步的稳定性考察; 化合物 1a 制备的收率达到近 80%, 相对理想。

2.6 化合物 1a 的化学稳定性考察^[9]

2.6.1 影响因素试验 将替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐(化合物 1a)和 TAF 盐分别于高湿(25 °C, 92.5%RH)、高温(60 °C)、光照(照度 4 500 LX±500 LX)条件下放置 30 d, 考察 0, 5, 10, 30 d 的有关物质情况, 结果显示, 替诺福韦艾拉酚胺的半 D-(-)-酒石酸盐在影响因素试验中, 在考察的高湿(25 °C, 92.5%RH)、高温(60 °C)条件下, 30 d 的化学稳定性明显优于 TAF 盐; 在考察的光照(4 500 LX)条件下, 其化学稳定性比 TAF 盐略好。具体试验设计方案和试验结果见表 2。

表 2 影响因素试验结果

Tab. 2 Test results of influencing factors

试验 条件	考察 时间/d	TAF		1a	
		色谱纯度/%	最大单杂/%	色谱纯度/%	最大单杂/%
高湿 试验	0	99.82	0.06	99.83	0.06
	5	99.79	0.08	99.82	0.06
	10	99.75	0.13	99.79	0.10
	30	99.68	0.15	99.75	0.11
高温 试验	0	99.82	0.06	99.83	0.06
	5	99.81	0.07	99.83	0.08
	10	99.78	0.11	99.81	0.09
	30	99.71	0.12	99.78	0.10
光照 试验	0	99.82	0.06	99.83	0.06
	5	99.82	0.06	99.83	0.06
	10	99.80	0.06	99.83	0.06
	30	99.79	0.07	99.82	0.06

2.6.2 加速试验 将替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐(化合物 1a)和 TAF 盐, 于 40 °C, 75%RH 条件下放置 6 个月, 考察 0 d、3 月、6 月的有关物质情况。结果显示替诺福韦艾拉酚胺的半 D-(-)-酒石酸盐加速试验中, 6 个月内的化学稳定性明显优于 TAF 盐。具体试验设计方案和试验结果见表 3。

表 3 加速试验结果

Tab. 3 Accelerated testing results

试验 条件	考察 时间	TAF 盐		1a	
		色谱纯度/%	最大单杂/%	色谱纯度/%	最大单杂/%
加速 试验	0 天	99.82	0.06	99.83	0.06
	3 月	99.56	0.23	99.65	0.13
	6 月	99.01	0.56	99.23	0.35

2.6.3 长期试验 将替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐(化合物 **1a**)和 TAF 盐, 于 25 °C, 60%RH 条件下放置 12 个月, 考察 0 d、3 月、6 月、9 月和 12 月的有关物质情况。结果显示, 替诺福韦艾拉酚胺的半 D-(-)-酒石酸盐在长期试验中, 12 个月的化学稳定性略优于 TAF 盐。具体试验设计方案和试验结果见表 4。

表 4 长期试验结果

Tab. 4 Long-term experiment results

试验条件	考察时间	TAF 盐		1a	
		色谱纯度/%	最大单杂/%	色谱纯度/%	最大单杂/%
长期试验	0 d	99.82	0.06	99.83	0.06
	3 月	99.81	0.06	99.83	0.06
	6 月	99.81	0.06	99.83	0.06
	9 月	99.80	0.06	99.85	0.06
	12 月	99.78	0.07	99.82	0.06

2.7 化合物 **1a** 的热稳定性考察

差示扫描量热计(DSC)用于考察化合物 **1a** 的热稳定性。取毫克级样品放置于未加盖的铝坩埚内, 以 10 °C·min⁻¹ 的升温速度在 50 mL·min⁻¹ 干燥 N₂ 的保护下将样品从室温升至 200 °C, 同时 TA 软件记录样品在升温过程中的热量变化。结果显示, 替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐和 TAF 盐的熔点分别为 175.08 和 132.43 °C, 前者比后者高约 43 °C, 表明与半富马酸盐形式相比, 替诺福韦艾拉酚胺的半 D-(-)-酒石酸盐的热稳定性得到了改良, 结果见图 3。

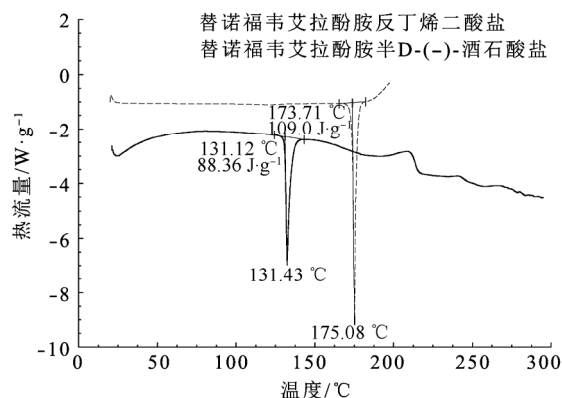


图 3 替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐和 TAF 盐的 DSC 叠加图

Fig. 3 DSC overlay of Tenofovir alafenamide D-(-)-tartaric acid salt (2 : 1) and Tenofovir alafenamide hemifumarate

3 结论

本文提供了替诺福韦艾拉酚胺一种新的药理学上可接受的盐-替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐, 由其化学稳定性考察结果可知: D-(-)-酒石酸盐不仅可作为替诺福韦艾拉酚胺的优良拆分剂, 提高手性纯度; 且拆分方法简洁, 收率高, 适合于工业化大规模生产。同时, 得到的替诺福韦艾拉酚胺半 D-(-)-酒石酸盐具有优良的化学稳定性、热稳定性, 具有进一步成药性评价的潜力, 可根据 2016 年 CFDA 颁布的新药品注册分类办法中改良型新药的要求进行药物开发^[10]。

REFERENCES

- [1] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-1960.
- [2] CLERCQ E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A personal account [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(6): 711-725.
- [3] PRADERE U, GARNIER-AMBLARD E C, COATS S J, et al. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs [J]. Chem Rev, 2014, 114(18): 9154-9218.
- [4] 吉利德科学公司. 核苷酸磷酸酯类似物前药及其筛选和制备方法: 中国, 01813161. 1 [P]. 2003-09-17.
- [5] CHAPMAN H, KERNAN M, PRISBE E et al. Practical synthesis, separation, and stereochemical assignment of the PMPA pro-drug GS-7340 [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2001, 20(4-7): 621-628.
- [6] CHAPMAN H, KERNAN M, ROHLOFF J et al. Purification of PMPA amidateprodrugs by SMB chromatography and X-ray crystallography of the diastereomerically pure GS-7340 [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2001, 20(4-7): 1085-1090.
- [7] 吉利德科学公司. 替诺福韦艾拉酚胺(TENOFOVIR ALAFENAMIDE)半富马酸盐: 中国, 201280039891. 0 [P]. 2014-04-16.
- [8] ZHANG K, XUE N, DU Y M, et al. Synthesis of D-(-)-tartrate of (S)-(-)-amisulpride [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(8): 635-637.
- [9] 国家食品药品监督管理总局. 化学药物(原料药和制剂)稳定性研究技术指导原则 [EB/OL]. 2015-02-05, <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/114289.html>.
- [10] 国家食品药品监督管理总局. 总局关于发布化学药品注册分类改革工作方案的公告(2016 年第 51 号)[EB/OL]. 2016-03-04, <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/114289.html>.

收稿日期: 2016-11-07

(本文责编: 李艳芳)