

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 6 月 30 日 (30.06.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/101904 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 1/30 (2006.01) *C07K 7/56* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/098740
- (22) 国际申请日: 2015 年 12 月 24 日 (24.12.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410840367.4 2014 年 12 月 24 日 (24.12.2014) CN
- (71) 申请人: 上海天伟生物制药有限公司 (SHANGHAI TECHWELL BIOPHARMACEUTICAL CO.,LTD) [CN/CN]; 中国上海市闵行区金都路 4258 号, Shanghai 201108 (CN)。
- (72) 发明人: 刘石东 (LIU, Shidong); 中国上海市闵行区金都路 4258 号, Shanghai 201108 (CN)。 王修胜 (WANG, Xiusheng); 中国上海市闵行区金都路 4258 号, Shanghai 201108 (CN)。 季晓铭 (JI, Xiaoming); 中国上海市闵行区金都路 4258 号, Shanghai 201108 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS,LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958

号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

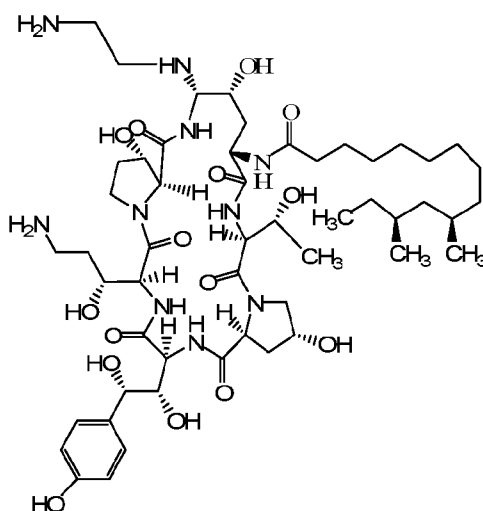
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING NITROGEN HETEROCYCLIC HEXAPEPTIDE PRECURSOR AND PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种含氮杂环六肽前体的组合物及其制备方法和用途



III

(57) Abstract: Disclosed is a preparation method of a composition containing a nitrogen heterocyclic hexapeptide precursor, compositions A and B containing a nitrogen heterocyclic hexapeptide precursor of a compound having formula I and formula II obtained by the method, and an application of the composition used for preparing a compound having formula III.

(57) 摘要: 本发明公开了一种含氮杂环六肽前体的组合物的制备方法, 以及由此方法获得的含有式 I 和式 II 化合物的含氮杂环六肽前体组合物 A 和 B, 以及所述组合物用于制备式 III 化合物的用途。

WO 2016/101904 A1

一种含氮杂环六肽前体的组合物及其制备方法和用途

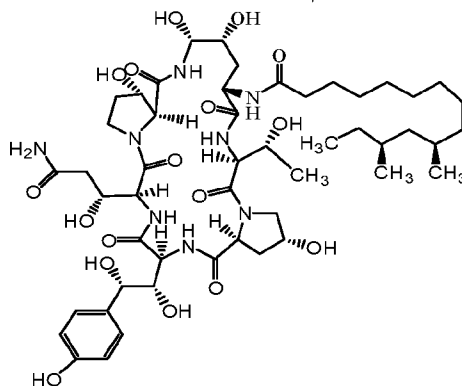
技术领域

本发明属于医药制备和药物分析领域，涉及一种卡泊芬净前体化合物组莫康定

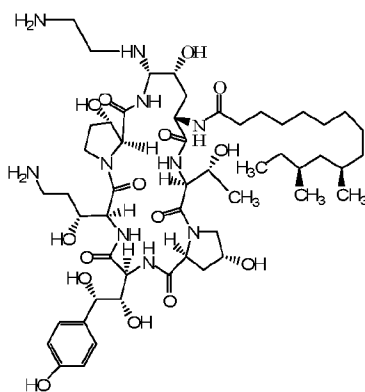
5 B0 与结构类似物的组合物及其制备方法，以及利用该组合物制备卡泊芬净的方法。

背景技术

组莫康定 B0，如式 I 所示，是由微生物发酵产生的次级代谢产物，具有环状的六肽结构，一般用于作为合成卡泊芬净（式 III 所示）的原料，其制备方法公开于若干文献中，如美国专利 US5194377、US5202309 和 US6610822。

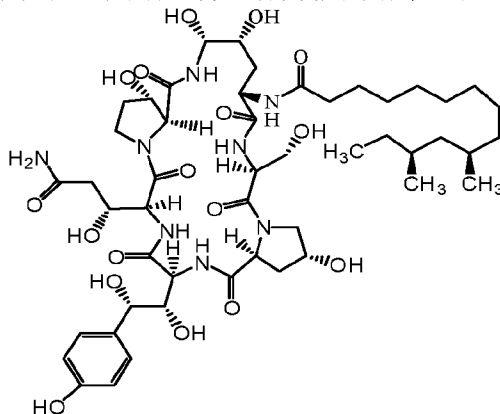


式 I



式 III

按照组莫康定结构中脯氨酸上取代基的不同，主要分为三类：A0、B0、和 C0。
B0 苏氨酸上取代基的不同，又会形成与其结构极为相似的丝氨酸类似物，式 II 化合物。



式 II

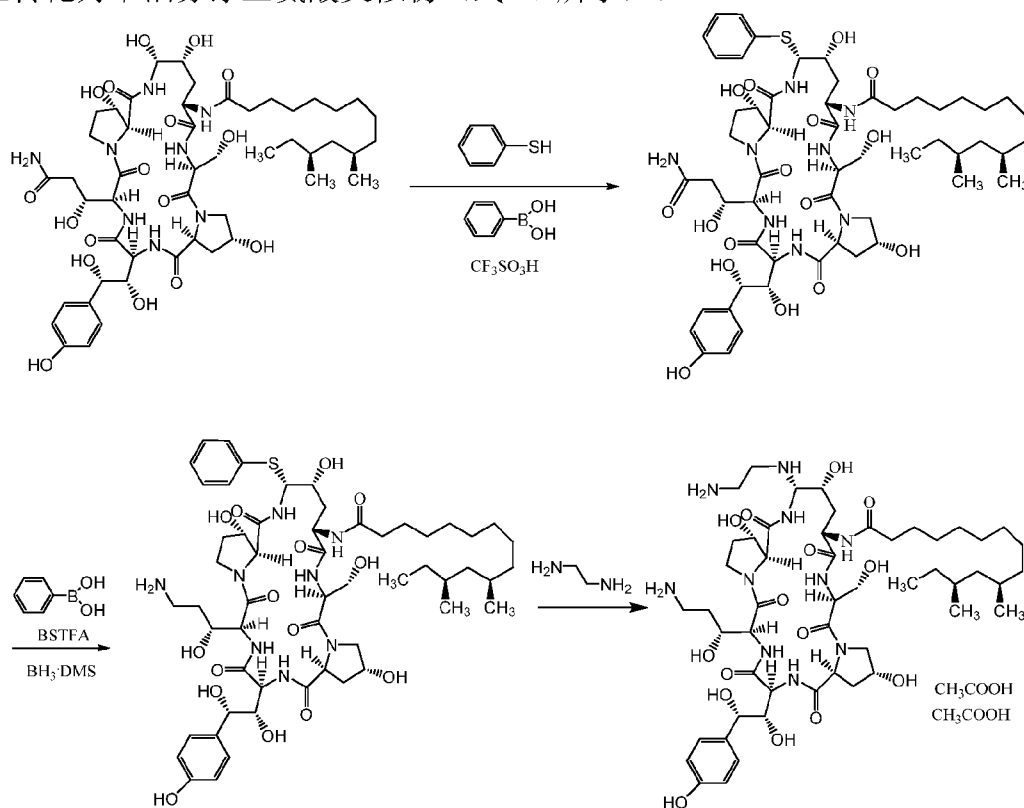
在发酵制备式 I 化合物过程中,相应会产生纽莫康定 A0、C0 和丝氨酸类似物(结构如式 II 所示)等一些杂质。纽莫康定 A0、C0 通过萃取、沉淀、大孔吸附树脂层析、制备型正相色谱等方法进行分离纯化,其专利 WO2004042350A2, WO0220618A1, WO 2005066323A1 等对分离纯化方法进行了描述。

5 WO0008197A1 和美国专利 US5378804 对式 II 化合物及其分离方法进行了描述。

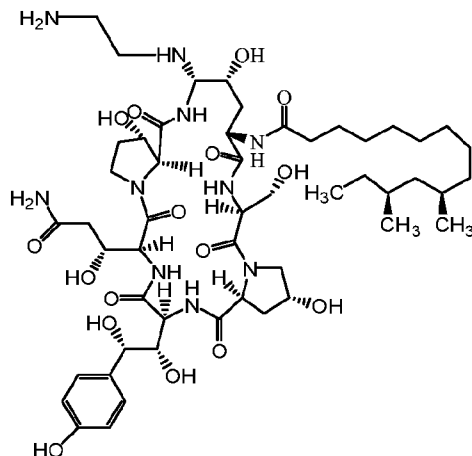
式 II 化合物通过现有的分离纯化方法能够得到一定程度的去除,例如利用制备型正相色谱,但是效果并不很理想,最终获得的产物中式 II 化合物的含量依然很高($\geq 2.5\%$)。而且此方法有机溶剂使用量大,对环境污染严重,生产成本低,生产效率低,很难实现工业化大规模生产。

10 工业微生物和生物技术期刊(Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology)第 26 期第 216-211 页(2001)描述了纽莫康定 B0 中含有的丝氨酸类似物式 II 杂质在后续的制备过程中会转化为卡泊芬净丝氨酸类似物杂质,从而导致终产物卡泊芬净的纯度降低。

在合成式 III 化合物的过程中,纽莫康定 B0 中所含的式 II 化合物可以通过例如
15 下面反应转化为卡泊芬净丝氨酸类似物(式 IV 所示):



J. Org. Chem. 2007, 72, 2335-2343 233 中也有相关描述。



式IV

CN102076707A 中描述了利用中高压反相制备层析柱分离纯化含有式 IV 化合物的醋酸卡泊芬净，其中描述使用 RP C18 为填料，乙腈/醋酸溶液为流动相制备式 IV 化合物(丝氨酸类似物醋酸卡泊芬净)含量低的醋酸卡泊芬净。此工艺使用大量有毒有害的乙腈，生产成本昂贵，无法用于规模化工业生产。

CN102947327A 中记载了在卡泊芬净中间体阶段利用正相硅胶制备层析柱分离去除中间体中含有的丝氨酸类似物。此纯化工艺需要使用大量溶剂、生产成本低，基本上不具备工业化生产价值。

杂质是指在任何活性药物成分（也称原料药，API）中不需要的，并且在极端情况下，甚至可能对正在接收含 API 的剂型治疗的患者有害的成分。

最终生产的 API 的纯度是其能否实现商品化的关键。美国食品药品监督管理局（FDA）明确要求 API 生产过程杂质必须控制在规定的界限以下。在 ICH Q7A 指南中，FDA 指定了可使用的原材料的质量，以及可接受的工艺条件例如温度、压力、时间和化学计量比，包括纯化步骤例如结晶、蒸馏和液-液萃取。（参见 ICH 关于活性药物成分的药品生产质量管理规范 ICH Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, Q7A）。化学反应的产物很少为具有足够纯度而符合药品标准的单一化合物，反应的副产物和副产品以及用于反应的辅助剂在大多数情况下也将存在于产物中。在加工 API 期间的某些阶段中，必须分析其纯度，通常通过高效液相色谱法或薄层色谱法，以确定其是否适于继续加工，并最终用于药物产品中。FDA 要求 API 尽可能无杂质，使得其在临床应用时尽可能地安全。例如，FDA 推荐某些杂质的量限制在少于 0.1 个百分比，（参见 ICH 关于活性药物成分的药品生产质量管理规范，Q7A）。

根据上述对于 API 中杂质限量的严格要求，如何尽可能的提高 API 的纯度，降低杂质的含量成为工艺开发的关键。如果最终药物产品的纯化难度太高，通常可以考虑通过提高其药物中间体的纯度来提高其纯度。因此，在式 III 化合物的制备工艺中，作为中间体的式 I 化合物纯度越高，经化学修饰得到的式 III 化合物纯度也会越高。如

果经化学修饰得到的式III化合物纯度高,那么就可以极大程度地减轻式III化合物纯化步骤的工艺压力,利用简便的纯化工艺得到高纯度的最终药物产品。因此,就要求式II化合物的含量尽可能低。

因此发明人急切的希望在纽莫康定 B0 阶段,利用特定的纯化手段,获得式 II 化合物含量极低的纽莫康定 B0。

发明内容

最初,发明人试图采用常规的结晶方法,即希望通过获得式 I 化合物的晶体将式 II 化合物杂质去除。然而在经过大量实验后发现采用常规的结晶手段,加入反溶剂通过过饱和度的方式使式 I 化合物析出,获得式 I 化合物晶体中,式 II 化合物的含量并没有降低,换言之,常规的结晶析出过程对式 II 化合物没有任何去除效果。

发明人在整理大量结晶实验过程时却意外发现,在一些实验中,加入有机溶剂后溶液会发生浑浊,明显有固体颗粒析出,但与结晶不同,固体颗粒并不沉淀下来,而是悬浮在混合液中。发明人将固体颗粒从混合液中分离出来,进一步分析后,惊喜地发现,固体颗粒为非结晶态的式 I 化合物,而且杂质式 II 化合物的含量非常低,经过多次实验反复证实了上述结果,由此得出结论,通过得到上述悬浮状态的体系,可以有效去除杂质式 II 化合物。发明人在进一步研究上述体系后明确:上述悬浮液实际是式 I 化合物与水、溶剂形成了一种粗分散体系的悬浮液(参考《胶体与界面化学》书籍,高等教育出版社),即式 I 化合物与水、溶剂形成一种特殊的状态,粒子直径大于 0.1 μ m,在此状态下,式 I 化合物既没有溶于溶剂中形成溶液,也没有以沉淀或晶体的形式析出,而是以一种颗粒的状态悬浮于溶剂中。而式 II 化合物却大量溶解于溶剂中,通过过滤或离心分离的方式,将固体颗粒和溶剂分离,就获得了纯度更高的式 I 化合物,而大量的式 II 化合物却留在了溶剂里,因此可以非常有效地去除式 I 化合物中的杂质式 II 化合物。

为了确定获得上述粗分散体系的悬浮液的方法,发明人又开展了大量实验研究,最终发现:当控制溶剂体系中水分含量在 8%-30%体积百分比时,可以获得粗分散体系的悬浮液。当水分含量大于 30%时,由于水分含量过高,在加入非极性的反溶剂时,通常会使反溶剂使用量过大或者使得整个体系分相,最终无法获得所述的粗分散体系的悬浮液。

此外,根据实验数据统计,每进行一遍上述操作,杂质式 II 化合物的含量可以降低 40%至 60%,而式 I 化合物的损失仅 2%以下。通过重复上述方法,可以确保将式 I 化合物中杂质式 II 化合物的含量降到 2.0%,优选 0.49%以下;更优为 0.2%以下;最优为 0.1%以下。

进一步地,通过将杂质式 II 化合物含量极低的式 I 化合物作为制备卡泊芬净的原料合成卡泊芬净中间体或醋酸卡泊芬净,通常情况下,所获得的卡泊芬净(式 III 化

合物) 产品中卡泊芬净丝氨酸类似物杂质(式 IV 化合物) 可以控制在 0.1% 下。可以大大减轻卡泊芬净产品纯化阶段的工艺压力。

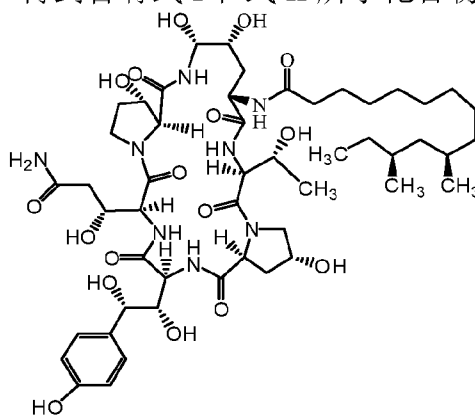
制备含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物的方法及用该方法制备获得的组合物 A 和 B

5 本发明提供了一种制备含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物的方法, 所述的方法包括步骤:

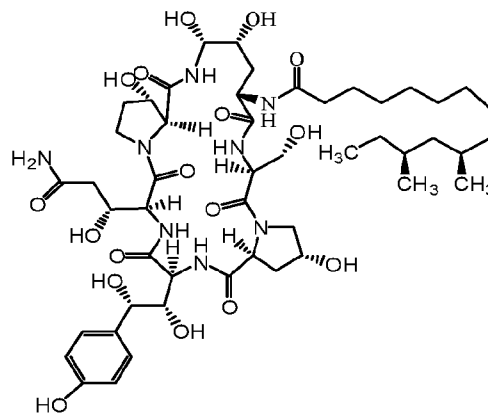
(a) 将式 I 化合物粗品溶解在有机溶剂(i)的水性溶液中;

(b) 通过降温和/或添加有机溶剂(ii), 使固体从溶解液中析出, 得到含式 I 化合物的悬浮液;

10 (c) 通过离心或过滤, 得到含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 A。



式 I



式 II

在另一优选例中, 步骤(a)中, 所述有机溶剂(i)的水性溶液中, 水的体积百分比为 8%-30%, 优选 10%-25%, 更优选 12%-22%, 最优选 16%-22%。。

15 在另一优选例中, 步骤(a)中, 所述有机溶剂(i)选自: 甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、异丁醇、正丁醇、丙酮中的一种或多种的混合物。

在另一优选例中, 步骤(b)中, 所述有机溶剂(ii)选自: C₃₋₇酯、己烷、正庚烷、正戊烷、二氯甲烷中的一种或多种的混合物; 优选自: 乙酸乙酯、乙酸异丙酯、正己烷中的一种或多种的混合物。

20 在另一优选例中, 所述步骤(a) - (c) 可以重复一次或一次以上。

本发明还提供了一种由上述的制备方法所获得的含有式 I 化合物的悬浮液，所述悬浮液中固体颗粒直径大于等于 0.1 μm 。

在一优选例中所述悬浮液中固体颗粒直径大于等于 0.2 μm 。

5 在另一优选例中所述悬浮液中固体颗粒直径大于等于 0.3 μm 。

在一优选例中，所述悬浮液中固体颗粒直径，即“颗粒尺寸分布”使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 来分析确定悬浮液中固体颗粒直径。确定悬浮液中固体颗粒直径，优选方法是激光衍射。

10 本发明还提供了一种由上述的制备方法所获得的含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 A，所述组合物中还含有 1%至 40%有机溶剂（质量百分含量）和 1%至 15%的水（质量百分含量）。

在一优选例中所述组合物中还含有 5%-35%有机溶剂（质量百分含量）和 2%-12%的水（质量百分含量）。

15 在另一优选例中所述组合物还含有 10-30%有机溶剂（质量百分含量）和 3%-10%的水（质量百分含量）。

在另一优选例中所述有机溶剂选自：甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、异丁醇、正丁醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、正己烷、二氯甲烷。

20 在另一优选例中所述的组合物 A 中，式 I 所示化合物的折干后含量大于 95%；式 II 所示化合物的折干后含量为 0.0001%-2.0%；优选 0.0001%-0.49%；更优为 0.0001%-0.2%；最优为 0.0001%-0.1%。

在另一优选例中所述的组合物 A 中，各组分的折干后含量用 HPLC 测定。

在另一优选例中所述 HPLC 测定方法为：

色谱柱：Symmetry C18 3.5 μm 2.1 $\times$ 150mm；

流动相：乙腈/水=39/61；

25 流速：0.4 ml/min；

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；

样品稀释剂：乙腈/水=39/61；

进样温度：5 $^{\circ}\text{C}$ ；

检测波长：205nm。

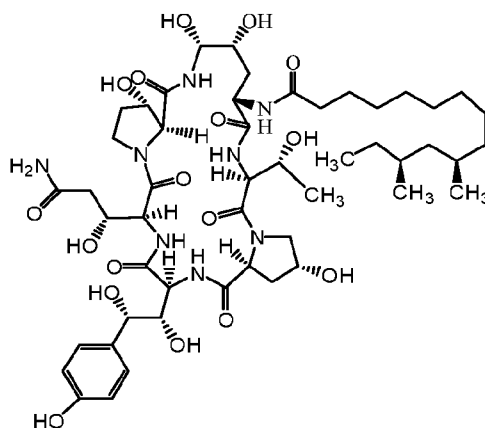
30

在另一优选例中将含有式 I 和式 II 化合物的组合物 A 进一步干燥，获得干燥的组合物 B。

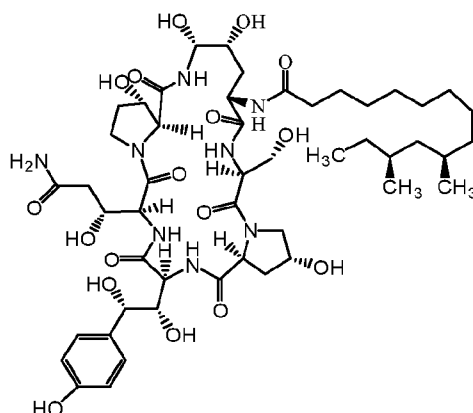
在另一优选例中，组合物 B 的水分含量小于等于 5%。

35 含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 B

本发明提供了一种含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 B。



式 I



式 II

在另一优选例中，式 I 所示化合物折干后的含量大于 95%。

在另一优选例中，式 II 所示化合物折干后的含量为 0.0001%-2.0%。

5 在另一优选例中，式 II 所示化合物折干后的含量为 0.0001%-0.49%。

在另一优选例中，式 II 所示化合物折干后的含量为 0.0001%-0.2%。

在另一优选例中，式 II 所示化合物折干后的含量为 0.0001%-0.1%。

在另一优选例中，所述组合物中各组分折干后的含量用 HPLC 测定。

在另一优选例中，所述 HPLC 测定方法为：

10 色谱柱：Symmetry C18 3.5um 2.1×150mm；

流动相：乙腈/水=39/61；

流速：0.4 ml/min；

柱温：30℃；

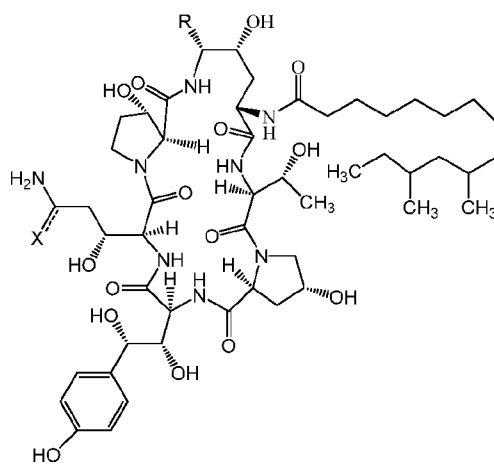
样品稀释剂：乙腈/水=39/61；

15 进样温度：5℃；

检测波长：205nm。

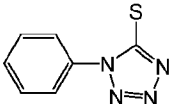
含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 B 的用途

20 本发明还提供了含有式 I 和式 II 所示化合物组合物 B 的用途，用于制备结构如式 X 所示化合物。



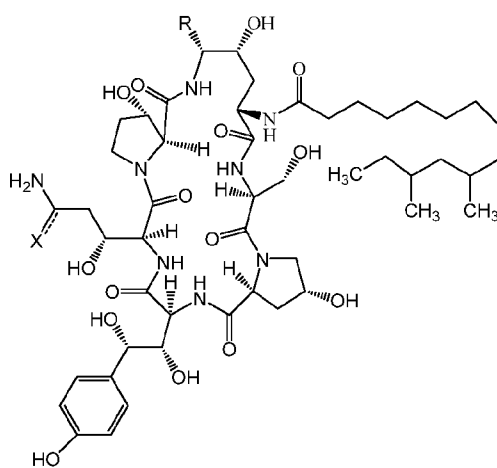
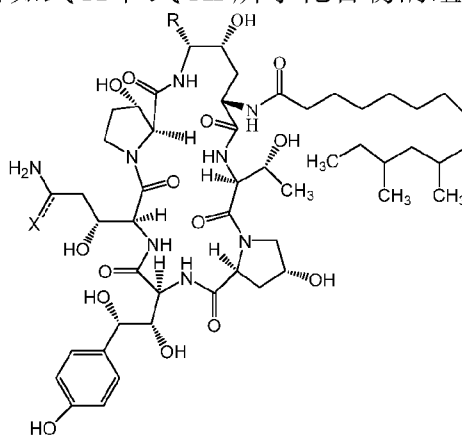
式 X

化合物 X	R	X (a= O, b=2H)
X1		a
		b
X2		a
		b
X3		a
		b
X4		a
		b
X5		a
		b
X6		a
		b
X7		a
		b
X8		a
		b
X9		a
		b
X10		a
		b
X11		a
		b

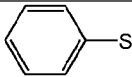
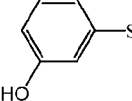
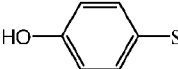
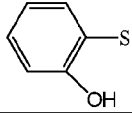
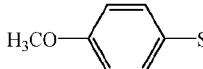
X12		a
		b

含有式 **X** 和式 **XI** 所示化合物的组合物

本发明还提供了含有如式 **X** 和式 **XI** 所示化合物的组合物。



5

化合物 X	化合物 XI	R	X (a = O, b =2H)
X1	XI1		a
			b
X2	XI2		a
			b
X3	XI3		a
			b
X4	XI4		a
			b
X5	XI5		a
			b

X6	XI6		a
			b
X7	XI7		a
			b
X8	XI8		a
			b
X9	XI9		a
			b
X10	XI10		a
			b
X11	XI11		a
			b
X12	XI12		a
			b

在另一优选例中，组合物中式 X 所示化合物的含量大于 95%。

在另一优选例中，组合物中式 XI 化合物的 HPLC 含量为 0.0001%-2.0%。

在另一优选例中，组合物中式 XI 化合物的 HPLC 含量为 0.0001%-0.49%。

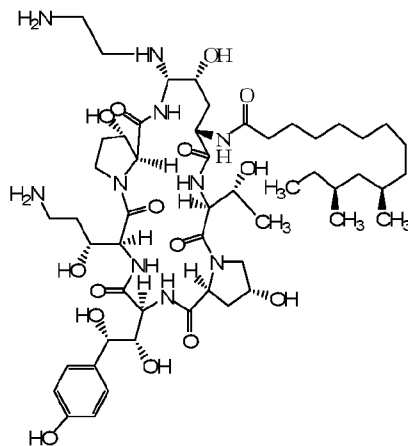
在另一优选例中，组合物中式 XI 化合物的 HPLC 含量为 0.0001%-0.2%。

5

在另一优选例中，组合物中式 XI 化合物的 HPLC 含量为 0.0001%-0.1%。

含有式 X 和式 XI 所示化合物的组合物的用途

本发明获得的含有式 X 和式 XI 所示化合物的组合物可以用于制备式 III 所示化合物。

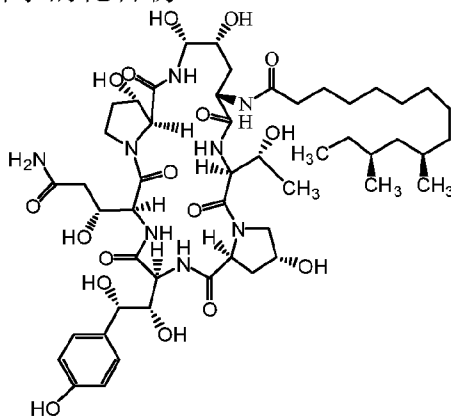


式III

10

相关术语

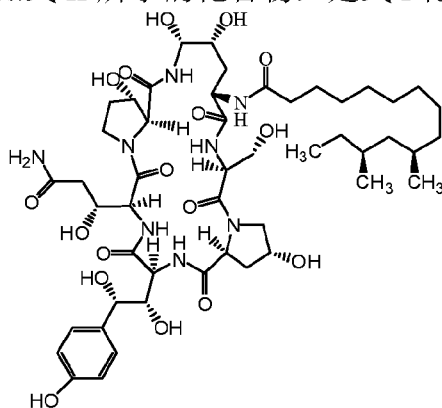
如本文所用,“式 I 化合物”,“如式 I 所示化合物”或“纽莫康定 B0”可以互换使用,都是指一种化学结构如式 I 所示的化合物。



式 I

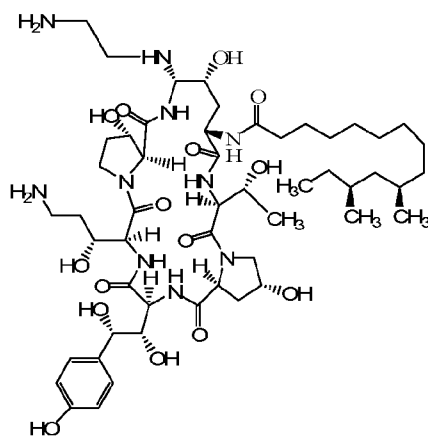
如本文所用,“式 I 化合物粗品”,“纽莫康定 B0 粗品”是指含有式 I 化合物的原料,可以使用本领域常规的方法获得,例如但不限于,美国专利 US5194377、US5202309, US6610822 和 WO2000/008197 等公开的化合物 I 的制备方法获得;也可以通过商业渠道获得,例如但不限于,如 Merck 公司。根据上述几篇专利提供的不同的发酵工艺,我们进行发酵工艺对于杂质含量的研究实验证实,不同的发酵工艺所获得的式 I 化合物中式 II 化合物的含量在 0.5%至 8%之间。

如本文所用,“式 II 化合物”,“如式 II 所示化合物”,“丝氨酸类似物杂质”可以互换使用,都是指化学结构如式 II 所示的化合物,是式 I 化合物的结构类似物杂质。



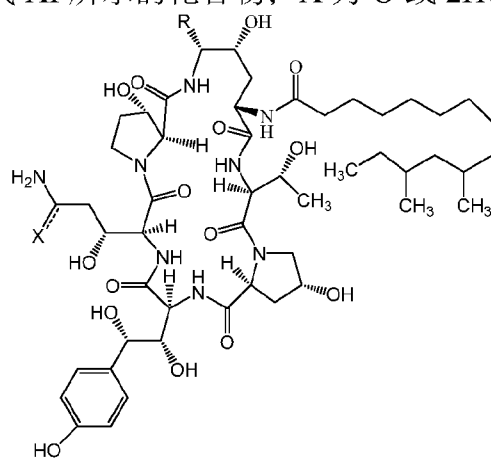
式 II

如本文所用,“式 III 化合物”,“如式 III 所示化合物”或“卡泊芬净”可以互换使用,都是指一种化学结构如式 III 所示的化合物,其醋酸盐作为一种抗真菌药物用于治疗侵袭性曲霉菌感染、食管念珠菌病、由念珠菌属引起的腹内脓肿病、胸膜炎、腹腔感染,以及嗜中性粒细胞减少症患者不明致病源引起的发热等。

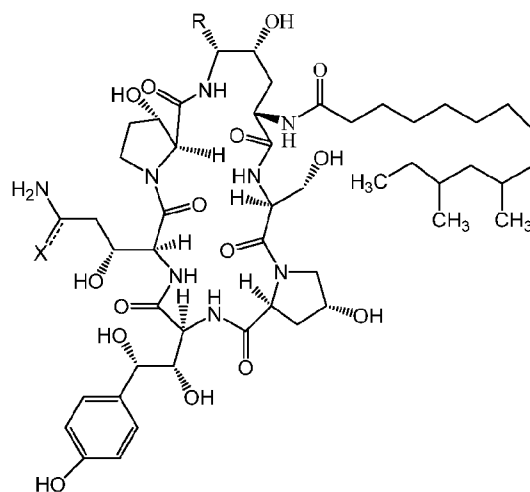


式III

如本文所用，“式 X 化合物”，“如式 X 所示化合物”可以互换使用，都是指一种化学结构如式 X 所示的化合物；“式 XI 化合物”，“如式 XI 所示化合物”可以互换使用，都是指一种化学结构如式 XI 所示的化合物；X 为 O 或 2H。

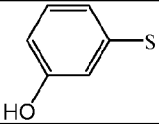
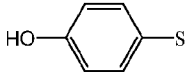
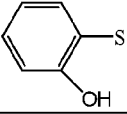
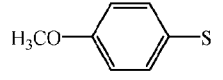
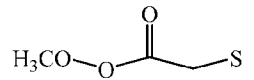
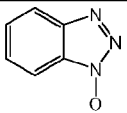
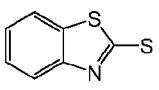
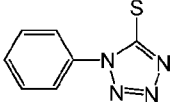


式 X



式 XI

化合物 X	化合物 XI	R	X (a= O, b=2H)
X1	XI1		a
			b

X2	XI2		a
			b
X3	XI3		a
			b
X4	XI4		a
			b
X5	XI5		a
			b
X6	XI6		a
			b
X7	XI7		a
			b
X8	XI8		a
			b
X9	XI9		a
			b
X10	XI10		a
			b
X11	XI11		a
			b
X12	XI12		a
			b

式 X 所示化合物由式 I 化合物为原料制备，可以使用本领域常规的方法获得，例如但不限于，J. Org. Chem. 2007, 72, 2335-2343 等公开的制备方法。由式 X 化合物可以使用本领域常规的方法进一步制备获得式 III 化合物，例如但不限于，J. Org. Chem. 2007, 72, 2335-2343 等公开的制备方法。

5

附图说明

图 1 显示实施例 1 获得的式 I 化合物粗品的 HPLC 图谱。

图 2 显示实施例 6 获得的组合物 A10 的 HPLC 图谱。

图 3 显示实施例 10 获得的式 X2a 化合物的 HPLC 图谱。

图 4 显示实施例 18 获得的式 III 化合物（卡泊芬净）的 HPLC 图谱。

10

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照
5 常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

10 使用下列 HPLC 测定方法分析纽莫康定 B0 及丝氨酸类似物的含量：

色谱柱：Waters Symmetry C18 3.5 μ m 2.1 $\times$ 150mm；

流动相：乙腈/水=39/61；

流速：0.4 ml/min；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

15 样品稀释剂：乙腈/水=39/61；

进样温度：5 $^{\circ}$ C；

检测波长：205nm。

使用下列 HPLC 测定方法分析卡泊芬净中间体及它的丝氨酸类似物的含量：

色谱柱：YMC-Pack ODS-A 250 $\times$ 4.6mm，5 μ m ；

20 流动相 A：0.1%高氯酸及 0.075%氯化钠水溶液；

流动相 B：乙腈；

流速：约 1.5ml/min；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

检测波长：220nm；

25 梯度程序表：

时间(分钟)	%A	%B
0	65.5	34.5
14.5	65.5	34.5
35	50	50
30 45	35	65
50	20	80
52	20	80
53	65.5	34.5
66	65.5	34.5

35

实施例 1 （制备式 I 化合物粗品）

参照 WO2000/008197, 通过 *Glaea Lozoyensis*(*Zalerion arboricla*)的发酵工艺得到含式 I 化合物的粗品。

参照 WO2005026323, 将上述得到的含式 I 化合物的粗品层析纯化细分收集, 得到式 I 化合物约 267g。测定式 II 化合物含量为 3.1%。

5

实施例 2 (制备式 I 化合物粗品)

参考文献“Pneumocandin B0 Production by Fermentation of the Fungus *Glaea lozoyensis*: Physiological and Engineering Factors Affecting Titer and Structural Analogue Formation”通过在发酵培养过程中添加丝氨酸, 得到含式 I 化合物的粗品。

10 参照 WO2005026323, 将上述得到的含式 I 化合物的粗品层析纯化细分收集, 得到式 I 化合物约 36g。测定式 II 化合物含量为 8.0%。

实施例 3 (制备式 I 化合物粗品)

15 参照文献 WO2005026323, 在发酵培养过程中添加苏氨酸, 得到含式 I 化合物的粗品。将上述得到的含式 I 化合物的粗品层析纯化细分收集, 得到式 I 化合物约 22g。测定式 II 化合物含量为 0.5%。

实施例 4

20 将实施例 1 获得的式 II 化合物含量 3.1%的式 I 化合物粗品 36g, 溶解在水分含量为 18%的异丁醇溶液中, 体积 720ml。缓慢加入乙酸乙酯 1440ml, 搅拌, 得到含有式 I 化合物的悬浮液, 使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.3 μ m 以上, 过滤固液分离得到组合物 A, 液体中式 I 化合物的损失为 1.5%。HPLC 测定组合物 A1 中式 I 化合物的含量为 98.6%, 式 II 化合物的含量为 0.95%。

25 将上述过滤得到的组合物 A1 (式 II 化合物含量为 0.95%) 分成两份。取其中一份进行真空干燥, 得到 17.6g 组合物 B1, 测定水分含量为 4%, 式 II 化合物的含量为 0.95%。

30 取另一份组合物 A1 溶解在水分含量为 12%的异丁醇溶液中, 体积 240ml。缓慢加入乙酸异丙酯 460ml, 搅拌, 得到含有式 I 化合物的悬浮液, 使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.5 μ m 以上, 过滤固液分离得到组合物 A2, 液体中式 I 化合物的损失为 1.6%。HPLC 测定式 II 化合物的含量为 0.38%。

35 将上述过滤得到的组合物 A2 (其中式 II 化合物含量为 0.38%), 溶解在水分含量为 20%的异丁醇溶液中, 体积 246ml。缓慢加入乙酸异丙酯 460ml, 搅拌, 得到含有式 I 化合物的悬浮液, 使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.2 μ m 以上, 过滤固液分离得到组合物 A3, 液体中式 I 化合物的损失为 1.2%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.16%。

将上述过滤得到的组合物 A3 (其中式 II 化合物含量为 0.16%), 溶解在水分含

量为 15% 的异丁醇溶液中，体积 206ml。缓慢加入乙酸异丙酯 410ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.4 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A4，液体中式 I 化合物的损失为 1.0%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.09%。

- 5 将上述组合物 A4，真空干燥，得到 17g 组合物 B2，测定水分含量为 2.4%，式 II 化合物的含量为 0.09%。

实施例 5

- 10 将实施例 2 获得的式 II 化合物含量 8% 的式 I 化合物粗品 6g，溶解在水分含量为 8% 的异丁醇溶液中，体积 150ml。缓慢加入乙酸异丙酯 250ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.2 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A5，液体中式 I 化合物的损失为 1.9%。测定组合物 A5 中式 I 化合物的含量为 96.4%，式 II 化合物的含量为 3.1%。

- 15 将上述过滤得到的组合物 A5（式 II 化合物含量为 3.1%），溶解在水分含量为 12% 的异丁醇溶液中，体积 120ml。缓慢加入乙酸异丙酯 230ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.3 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A6，液体中式 I 化合物的损失为 1.6%。HPLC 测定式 II 化合物的含量为 1.4%。

- 20 将上述过滤得到的组合物 A6（其中式 II 化合物含量为 1.4%），溶解在水分含量为 20% 的异丁醇溶液中，体积 123ml。缓慢加入乙酸异丙酯 230ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.4 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A7，液体中式 I 化合物的损失为 1.2%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.6%。

- 25 将上述过滤得到的组合物 A7（其中式 II 化合物含量为 0.6%），溶解在水分含量为 15% 的异丁醇溶液中，体积 103ml。缓慢加入乙酸异丙酯 205ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.6 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A8，液体中式 I 化合物的损失为 1.0%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.2%。

- 30 将上述过滤得到的组合物 A8（其中式 II 化合物含量为 0.2%），溶解在水分含量为 15% 的异丁醇溶液中，体积 80ml。缓慢加入乙酸异丙酯 190ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.1 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A9，液体中式 I 化合物的损失为 1.0%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.08%。

- 35 将上述组合物 A9，真空干燥，得到 5.3g 组合物 B3，测定水分含量为 4.9%，式 II 化合物的含量为 0.08%。

实施例 6

将实施例 3 获得的式 II 化合物含量 0.5% 的式 I 化合物粗品 9g，溶解在水分含量为 28% 的甲醇、异丁醇溶液中（其中甲醇：异丁醇=2:8 体积比），体积 120ml。缓慢加入乙酸乙酯 380ml，搅拌，得到含有式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸
5 仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.4 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A10，液体中式 I 化合物的损失为 1.9%。测定组合物 A10 中式 I 化合物的含量为 98.8%，式 II 化合物的含量为 0.2%。

将上述过滤得到的组合物 A10（式 II 化合物含量为 0.2%），溶解在水分含量为 12% 的乙醇溶液中，体积 120ml。缓慢加入二氯甲烷 230ml，搅拌，得到含有式 I 化
10 合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.2 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A11，液体中式 I 化合物的损失为 1.6%。HPLC 测定式 II 化合物的含量为 0.12%。

将上述过滤得到的组合物 A11（其中式 II 化合物含量为 0.12%），溶解在水分含量为 30% 的异丙醇溶液中，体积 95ml。缓慢加入正己烷 230ml，搅拌，得到含有式 I
15 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.1 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A12，液体中式 I 化合物的损失为 0.8%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.06%。

将上述过滤得到的组合物 A12（其中式 II 化合物含量为 0.06%），溶解在水分含量为 15% 的正丁醇溶液中，体积 103ml。缓慢加入乙酸甲酯 205ml，搅拌，得到含有
20 式 I 化合物的悬浮液，使用 Malvern 颗粒尺寸仪 2600C 测得悬浮液中式 I 化合物固体颗粒直径为 0.2 μ m 以上，过滤固液分离得到组合物 A13，液体中式 I 化合物的损失为 1.0%。HPLC 测定式 II 化合物含量为 0.01%。

将上述组合物 A13，真空干燥，得到 8.6g 组合物 B4，测定水分含量为 1.5%，式 II 化合物的含量为 0.01%。

25

比较例 1（水分含量控制 8% 以内，式 I 化合物为晶体状态，无除杂效果）

将实施例 1 获得的式 II 化合物含量 3.1% 的式 I 化合物粗品 2.6g，溶解到含有 7% 水的甲醇溶液中，溶液体积 22ml。缓慢加入乙酸异丙酯 100ml，有固体析出，过滤，
30 HPLC 分析测定式 II 化合物含量为 3.1%，没有任何去除效果。X-射线粉末衍射（XRPD）分析显示上述析出固体为晶体形式。

比较例 2（水分含量控制 8% 以内，式 I 化合物为晶体状态，无除杂效果）

将实施例 1 获得的式 II 化合物含量 3.1% 的式 I 化合物粗品 2.6g，溶解到含有 3% 水的正丙醇溶液中，溶液体积 100ml。缓慢加入乙酸乙酯 200ml，有固体析出，过滤，
35 HPLC 分析测定式 II 化合物的含量为 3.1%，没有任何去除效果。X-射线粉末衍射（XRPD）分析显示上述析出固体为晶体形式。

实施例 7 (组合物 B 制备式 X1a 化合物, R 为苯硫基)

氮气保护下, 将乙腈(300ml)、组合物 B2(10.0g, 其中式 II 化合物含量 0.09%)、苯硼酸(2.0g)和苯硫酚(3.6g), 搅拌均匀, 降温至-20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸(2.5ml), 滴毕, 于-20~-15℃反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液(2.3g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 125ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X1a 化合物的样品 9.0g, HPLC 测定式 XI1a 含量为 0.088%。

实施例 8 (组合物 B 制备式 X5a 化合物, R 为甲氧基苯硫基)

氮气保护下, 将乙腈(30ml)、组合物 B1(1.0g, 其中式 II 化合物含量 0.95%)、苯硼酸(0.20g)和甲氧基苯硫酚(0.38g), 搅拌均匀, 降温至-20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸(0.25ml), 滴毕, 于-20~-15℃反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液(0.23g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X5a 化合物的样品 0.94 g, HPLC 测定式 XI5a 含量为 0.93%。

实施例 9 (组合物 B 制备式 X2a 化合物, R 为间羟基苯硫基)

氮气保护下, 将乙腈(30ml)、组合物 B4(1.0g, 其中式 II 化合物含量 0.01%)、苯硼酸(0.2g)和羟基苯硫酚(0.36g), 搅拌均匀, 降温至-20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸(0.25ml), 滴毕, 于-20~-15℃反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液(0.23g NaOAc 溶于 0.5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 1.25ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X2a 化合物的样品 0.93g, HPLC 测定式 XI2a 含量为 0.009%。

实施例 10 (组合物 B 制备式 X2a 化合物, R 为间羟基苯硫基)

氮气保护下, 将乙腈(300ml)、组合物 B1(10g, 其中式 II 化合物含量 0.95%)、苯硼酸(2.0g)和间羟基苯硫酚(3.6g), 搅拌均匀, 降温至-20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸(2.5ml), 滴毕, 于-20~-15℃反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液(2.3g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X2a 化合物的样品 9.3g, HPLC 测定式 XI2a 含量为 0.87%。

实施例 11 (组合物 B 制备式 X2a 化合物, R 为间羟基苯硫基)

氮气保护下, 将乙腈 (300ml)、组合物 B2 (10g, 其中式 II 化合物含量 0.09%)、苯硼酸 (2.0g) 和间羟基苯硫酚 (3.6g), 搅拌均匀, 降温至 -20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸 (2.5ml), 滴毕, 于 -20~-15℃ 反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液 (2.3g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃ 搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃ 以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X2a 化合物的样品 9.2g, HPLC 测定式 XI2a 含量为 0.09%。

实施例 12 (组合物 B 制备式 X9a 化合物, R 为)

氮气保护下, 将乙腈 (30ml)、组合物 B3 (1.0g, 其中式 II 化合物含量 0.08%)、苯硼酸 (0.20g) 和四氮唑 (0.27g), 搅拌均匀, 降温至 -20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸 (0.25ml), 滴毕, 于 -20~-15℃ 反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液 (0.23g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃ 搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃ 以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X9 化合物的样品 0.91g, HPLC 测定 XI9a 含量为 0.079%。

实施例 13 (组合物 B 制备式 X10 化合物, R 为)

氮气保护下, 将乙腈 (30ml)、组合物 B3 (1.0g, 其中式 II 化合物含量 0.08%)、苯硼酸 (0.20g) 和吡啶 (0.32g), 搅拌均匀, 降温至 -20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸 (0.25ml), 滴毕, 于 -20~-15℃ 反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液 (0.23g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃ 搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃ 以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X10 化合物样品 0.90g, HPLC 测定式 XI10a 含量为 0.079%。

实施例 14 (组合物 B 制备式 X11a 化合物, R 为)

氮气保护下, 将乙腈 (30ml)、组合物 B4 (1.0g, 其中式 II 化合物含量 0.01%)、苯硼酸 (0.20g) 和巯基苯并噻唑 (0.45g), 搅拌均匀, 降温至 -20~-15℃, 滴加三氟甲磺酸 (0.25ml), 滴毕, 于 -20~-15℃ 反应 2.5h 左右, TLC 显示反应完全, 淬灭反应, 缓慢加入 NaOAc 水溶液 (0.23g NaOAc 溶于 5ml 水中), 加毕, 将温度升至 20℃ 搅拌 2h。有大量固体析出, 再降温至 0℃ 以下, 过滤, 滤饼用乙腈/水=9: 1 (V/V) 12.5ml 洗涤, 洗涤三次, 真空干燥 5h, 得到含式 X11 化合物样品 0.98g, HPLC 测定式 XI11a 含量为 0.009%。

实施例 15 (式 X1a 化合物还原反应)

氮气保护下, 将实施例 7 得到的式 X1a 化合物(2.0g), 苯硼酸 (0.28g), 无水四氢呋喃 (80ml), 加热回流 30min 后, 冷却至室温, 加入 BSTFA (2.1ml), 于室温搅拌 1h, 冷却到-10~-5℃, 滴加硼烷二甲硫醚络合物 (0.8ml, 0.94%), 滴毕, 升温 10~15℃反应 3.5h。用 HPLC 监测, 转化率为 82%。然后滴加 2N 盐酸 (4.8ml), 并加入水 (160ml), 减压浓缩除去溶剂, 然后室温搅拌 24h, 将其上样于制备柱上, 用 22%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 合并富含产物的收集液, 将其用水稀释一倍, 仍旧上样于制备柱中, 用 90%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 收集产品馏分, 将其冷冻冻干, 得到含 X1b 化合物的样品 1.6g, HPLC 测定式 XI1b 含量为 0.082%。

实施例 16 (由式 X1b 化合物制备式 III 化合物)

氮气保护下, 将按照实施例 15 得到的 X1b 化合物 (1.0g) 溶于甲醇 (4.2ml) 中, 冷却至-20~-15℃, 滴加乙二胺 (4.2ml), 滴毕后升温至室温反应 48h, HPLC 监测反应转化率为 99%。将其滴入冰乙酸 (8.3ml) 的水 (18.5ml) 溶液, 然后并将其用水稀释一倍, 将其上样于制备柱上, 用 22%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 合并富含产物的收集液, 将其用水稀释一倍, 仍旧上样于制备柱中, 用 90%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 收集产品馏分, 将其减压浓缩到干, 用溶解液 (乙醇/水/醋酸=210.0/19.7/1.0, v/v/v, 10ml) 将上述浓缩物溶解, 于 5~20℃条件下, 滴加乙酸乙酯(14ml) 进行析晶, 过滤得到白色结晶固体即卡泊芬净醋酸盐(0.71g), HPLC 检测纯度为 99.82%, 其中式 IV 化合物的含量为 0.072%。

实施例 17 (式 X2a 化合物还原反应)

氮气保护下, 将实施例 11 得到的式 X2a 化合物(2.0g), 苯硼酸 (0.28g), 无水四氢呋喃 (80ml), 加热回流 30min 后, 冷却至室温, 加入 BSTFA (2.1ml), 于室温搅拌 1h, 冷却到-10~-5℃, 滴加硼烷二甲硫醚络合物 (0.8ml, 0.94%), 滴毕, 升温 10~15℃反应 3.5h。用 HPLC 监测, 转化率为 82%。然后滴加 2N 盐酸 (4.8ml), 并加入水 (160ml), 减压浓缩除去溶剂, 然后室温搅拌 24h, 将其上样于制备柱上, 用 22%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 合并富含产物的收集液, 将其用水稀释一倍, 仍旧上样于制备柱中, 用 90%的乙腈/水 (0.15%的乙酸) 洗脱, 收集产品馏分, 将其冷冻冻干, 得到含 X2b 化合物的样品 1.42g, HPLC 测定式 XI2b 含量为 0.09%。

实施例 18 (由式 XI2b 化合物制备式 III 化合物)

氮气保护下, 将按照实施例 17 得到的 X2b 化合物 (1.0g) 溶于甲醇 (4.2ml) 中, 冷却至-10~-5℃, 滴加乙二胺 (4.2ml), 滴毕后升温至室温反应 48h, HPLC 监测反应转化率为 99%。将其滴入冰乙酸 (8.3ml) 的水 (18.5ml) 溶液, 然后并将其用

水稀释一倍，将其上样于制备柱上，用 22% 的乙腈/水（0.15% 的乙酸）洗脱，合并富含产物的收集液，将其用水稀释一倍，仍旧上样于制备柱中，用 90% 的乙腈/水（0.15% 的乙酸）洗脱，收集产品馏分，将其减压浓缩到干，用溶解液（乙醇/水/醋酸=210.0/19.7/1.0, v/v/v, 10ml）将上述浓缩物溶解，于 5~20℃ 条件下，滴加乙酸乙酯(14ml) 5 进行析晶，过滤得到白色结晶固体即卡泊芬净醋酸盐(0.72g)，HPLC 检测纯度为 99.76%，其中式 IV 化合物的含量为 0.06%。

比较例 3（按照 CN102070707A 的方法制备无式 IV 化合物的醋酸卡泊芬净）

按照 CN102070707A 实施例的方法制备式 IV 化合物小于 0.05% 的醋酸卡泊芬净，10 结果显示制备约 1g 的醋酸卡泊芬净，在用制备型 HPLC（装有 RP C-18 树脂填料），乙酸和乙腈缓冲液纯化，所使用的有机溶剂乙腈约为 6L，所使用的生产设备和树脂填料非常昂贵。

而通过实施例 4、5、6 可知，制备 1g 式 II 杂质含量在 0.1% 以下的式 I 化合物所15 使用的溶剂约为 0.3L，由此直接可以制备式 IV 化合物小于 0.05% 的醋酸卡泊芬净，无需再使用制备型 HPLC 进行纯化。

比较例 4（按照专利 CN102947327A 的方法制备无式 IV 化合物的醋酸卡泊芬净中间体）

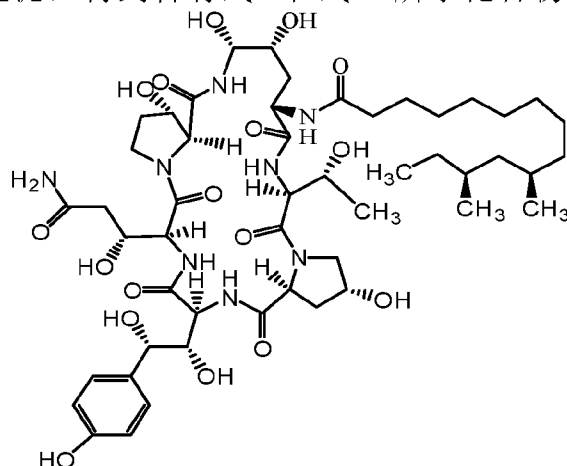
按照 CN102947327A 实施例的方法制备低丝氨酸类似物卡泊芬净中间体的醋酸20 卡泊芬净中间体，按照 CN102947327A 中描述的方法制备含有低于 0.1% 丝氨酸类似物卡泊芬净中间体杂质的醋酸卡泊芬净中间体，其制备收率只有 20% 到 40%，工业化生产价值非常小。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并非用以限定本发明的实质技术内容范25 围，本发明的实质技术内容是广义地定义于申请的权利要求范围中，任何他人完成的技术实体或方法，若是与申请的权利要求范围所定义的完全相同，也或是一种等效的变更，均将被视为涵盖于该权利要求范围之内。

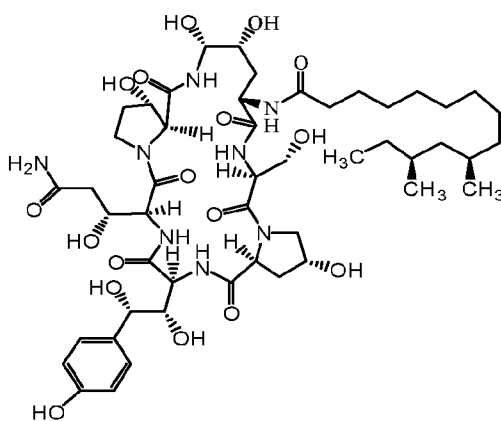
权 利 要 求

1. 一种制备含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物的方法，其特征在于，所述的方法包括步骤：

- 5 (a) 将式 I 化合物粗品溶解在有机溶剂(i)的水性溶液中；
 (b) 通过降温和/或添加有机溶剂(ii)，使固体从溶解液中析出，得到含式 I 化合物的悬浮液；
 (c) 通过离心或过滤，得到含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 A；



式 I



式 II

2. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中，所述有机溶剂(i)的水性溶液中，水的体积百分含量为 8%-30%，优选 10%-25%，更优选 12%-22%，最优选 16%-22%。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤(a)中，所述有机溶剂(i)选自：甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、异丁醇、正丁醇、丙酮中的一种或多种的混合物。

4. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤(b)中，所述有机溶剂(ii)选自：C₃₋₇ 酯、己烷、正庚烷、正戊烷、二氯甲烷中的一种或多种的混合物；优

选自：乙酸乙酯、乙酸异丙酯、正己烷中的一种或多种的混合物。

5. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (a) - (c) 可以重复一次或一次以上。

6. 一种由如权利要求 1-4 任一所述的制备方法所获得的含有式 I 化合物的悬浮液，其特征在于，所述悬浮液中固体颗粒直径大于等于 0.1 μ m, 优选直径大于等于 0.2 μ m，更优选大于等于 0.3 μ m。

7. 一种由如权利要求 1-5 任一所述的制备方法所获得的含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 A，其特征在于，所述组合物中含有 1%至 40%有机溶剂（质量百分含量），优选 5%-35%，更优选 10-30%；所述组合物还含有 1%至 15%的水（质量百分含量），优选 2%-12%，更优选 3%-10%；

其中，所述有机溶剂选自：甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、异丁醇、正丁醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、正己烷、二氯甲烷。

8. 如权利要求 7 所述的组合物 A，其特征在于，所述的组合物 A 中，式 I 所示化合物的折干后含量大于 95%；式 II 所示化合物的折干后含量为 0.0001%-2.0%；优选 0.0001%-0.49%；更优为 0.0001%-0.2%；最优为 0.0001%-0.1%。

9. 如权利要求 8 所述的组合物 A，其特征在于，所述组合物中各组分的折干后含量用 HPLC 测定。

10. 如权利要求 9 所述的组合物 A，其特征在于，所述 HPLC 测定方法为：

色谱柱：Symmetry C18 3.5 μ m 2.1 $\times$ 150 mm；

流动相：乙腈/水 = 39/61；

流速：0.4 ml/min；

柱温：30 $^{\circ}$ C；

样品稀释剂：乙腈/水 = 39/61；

进样温度：5 $^{\circ}$ C；

检测波长：205nm。

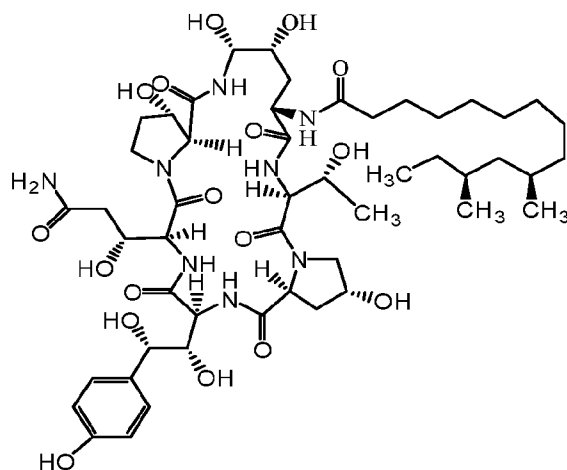
11. 如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 (c) 之后还包含以下步骤：

(d) 将步骤 (c) 获得的组合物 A 进一步干燥，得到干燥的组合物 B。

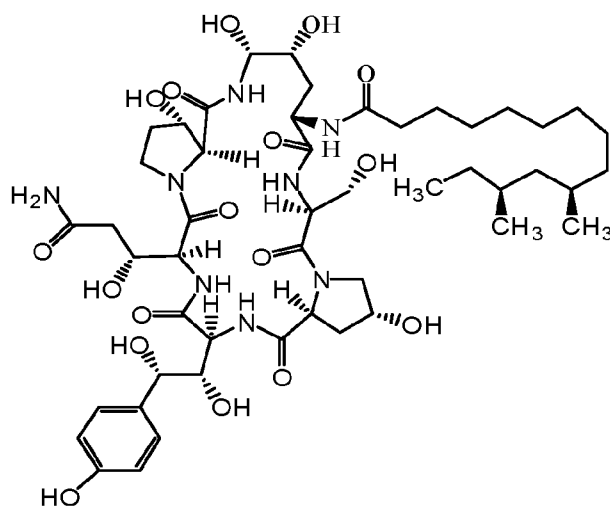
12. 如权利要求 11 所述的制备方法，其特征在于，所述组合物 B 的水分含量小于等于 5%。

13. 如权利要求 11 所述的制备方法，其特征在于，所述干燥的组合物 B 中，式 I 所示化合物的折干后含量大于 95%；式 II 所示化合物的折干后含量为 0.0001%-2.0%；优选 0.0001%-0.49%；更优为 0.0001%-0.2%；最优为 0.0001%-0.1%。

14. 一种含有式 I 和式 II 所示化合物的组合物 B；



式 I



式 II

所述组合物中式 I 所示化合物的折干后含量大于 95%;

所述组合物中式 II 所示化合物的折干后含量为 0.0001%-2.0%; 优选

5 0.0001%-0.49%; 更优为 0.0001%-0.2%; 最优为 0.0001%-0.1%。

15. 如权利要求 14 所述的组合物 B, 其特征在于, 所述组合物中各组分的折干后含量用 HPLC 测定。

16. 如权利要求 15 所述的组合物 B, 其特征在于, 所述 HPLC 测定方法为:

色谱柱: Symmetry C18 3.5 μ m 2.1 $\times$ 150 mm;

10 流动相: 乙腈/水=39/61;

流速: 0.4 ml/min;

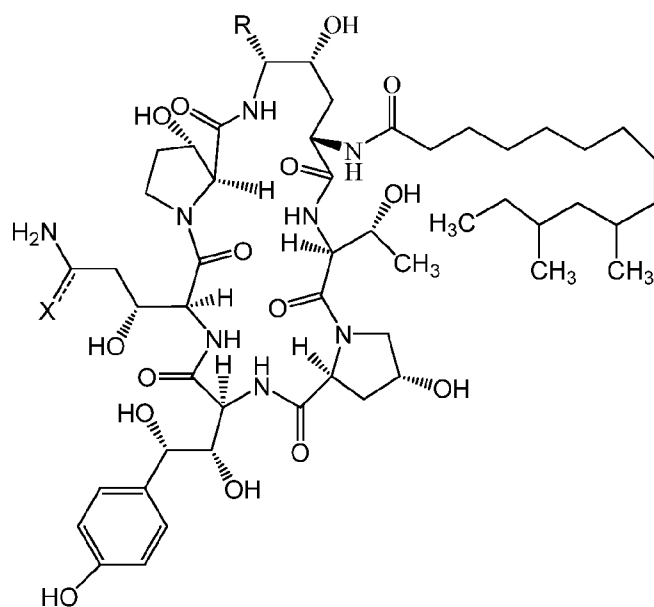
柱温: 30 $^{\circ}$ C;

样品稀释剂: 乙腈/水=39/61;

进样温度: 5 $^{\circ}$ C;

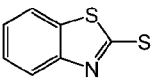
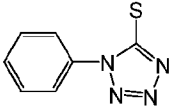
15 检测波长: 205 nm。

17. 一种如权利要求 14-16 任一所述组合物 B 的用途, 其特征在于, 用于制备结构如式 X 所示的化合物;



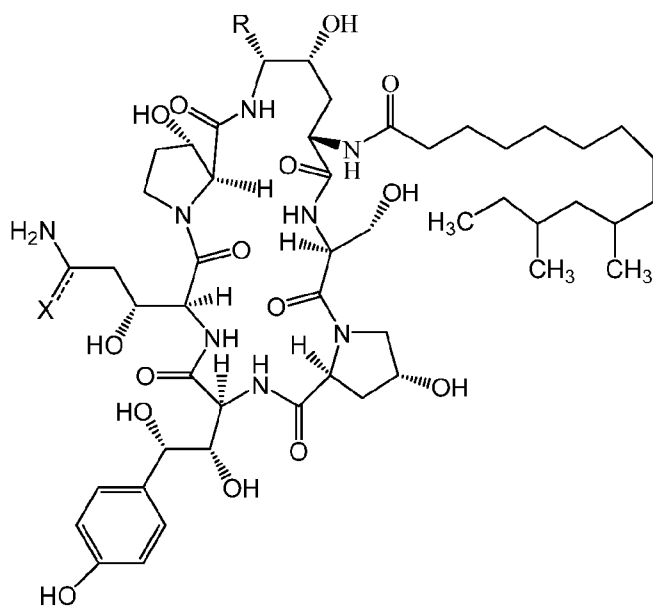
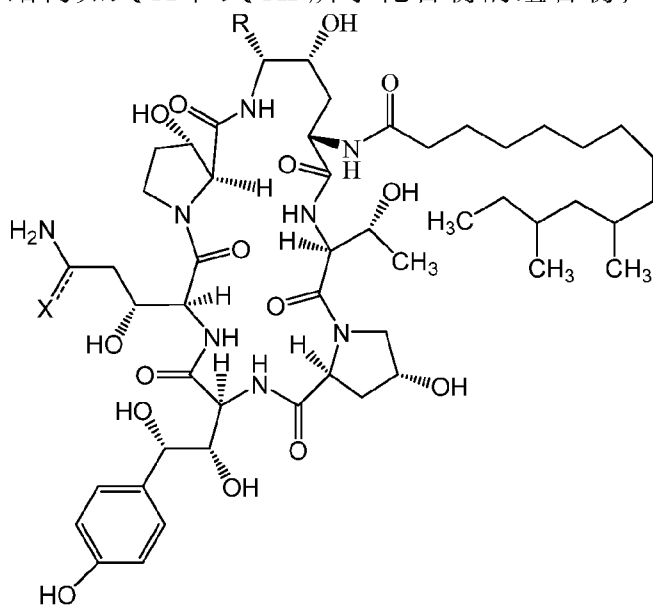
式 X;

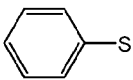
化合物 X	R	X (a= O, b=2H)
X1		a
		b
X2		a
		b
X3		a
		b
X4		a
		b
X5		a
		b
X6		a
		b
X7		a
		b
X8		a
		b
X9		a
		b
X10		a
		b

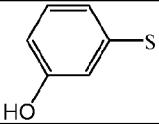
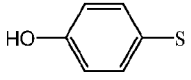
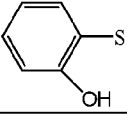
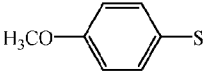
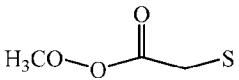
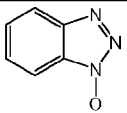
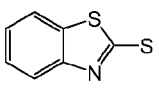
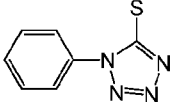
X11		a
		b
X12		a
		b

。

18.一种含有结构如式 X 和式 XI 所示化合物的组合物；



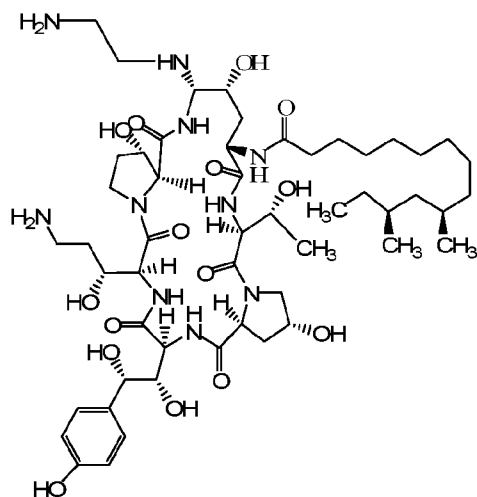
化合物 X	化合物 XI	R	X (a= O, b=2H)
X1	XI1		a
			b

X2	XI2		a
			b
X3	XI3		a
			b
X4	XI4		a
			b
X5	XI5		a
			b
X6	XI6		a
			b
X7	XI7		a
			b
X8	XI8		a
			b
X9	XI9		a
			b
X10	XI10		a
			b
X11	XI11		a
			b
X12	XI12		a
			b

19.如权利要求 18 所述的组合物，其特征在于，所述组合物中式 X 所示化合物的含量大于 95%。

20. 如权利要求 18 所述的组合物，其特征在于，所述组合物中式 XI 化合物的 HPLC 含量为 0.0001%-2.0%，优选 0.0001%-0.49%，更优选 0.0001%-0.2%；最
5 优选 0.0001%-0.1%。

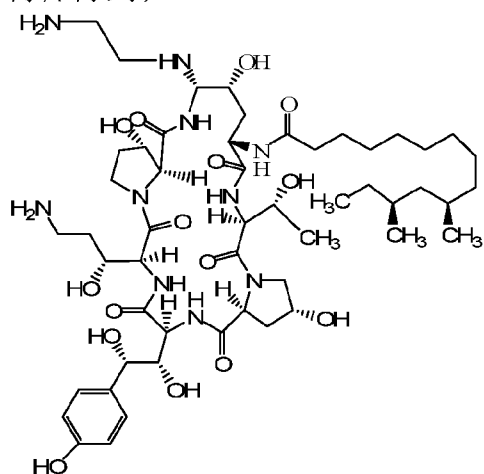
21. 如权利要求 18-20 任一所述的组合物的用途，其特征在于，用所述的组合物制备式 III 所示化合物；



式III

。

22. 一种式 III 所示化合物，其特征在于，所述式 III 化合物由权利要求 1 所述的方法制备得到的组合物 A 或权利要求 11 所述的方法制备得到的组合物 B 作为原料制备得到；



式III

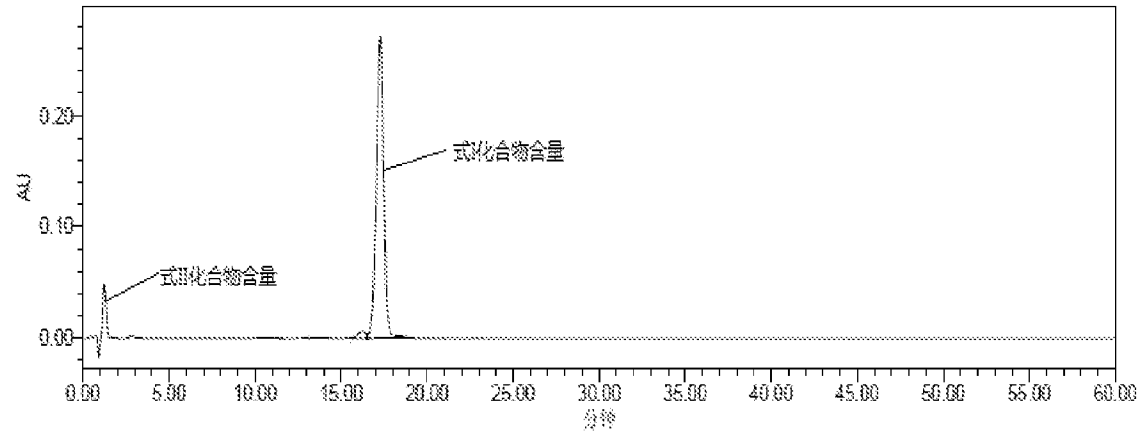


图 1

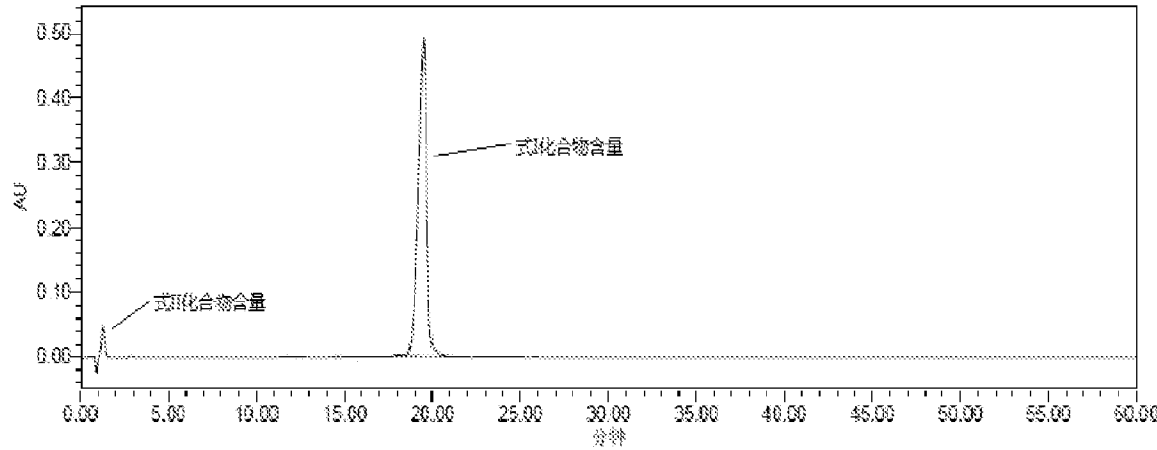


图 2

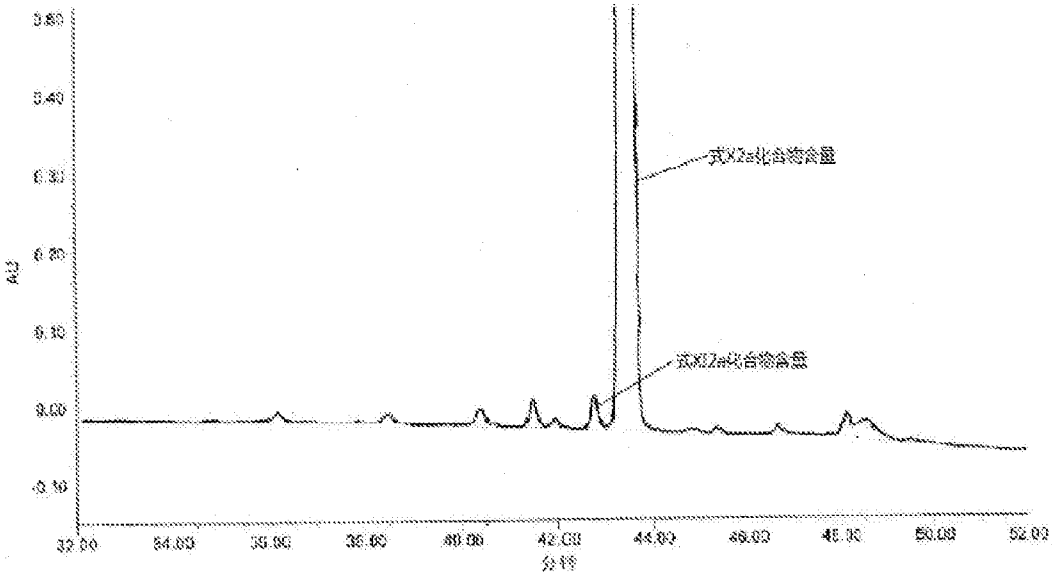


图 3

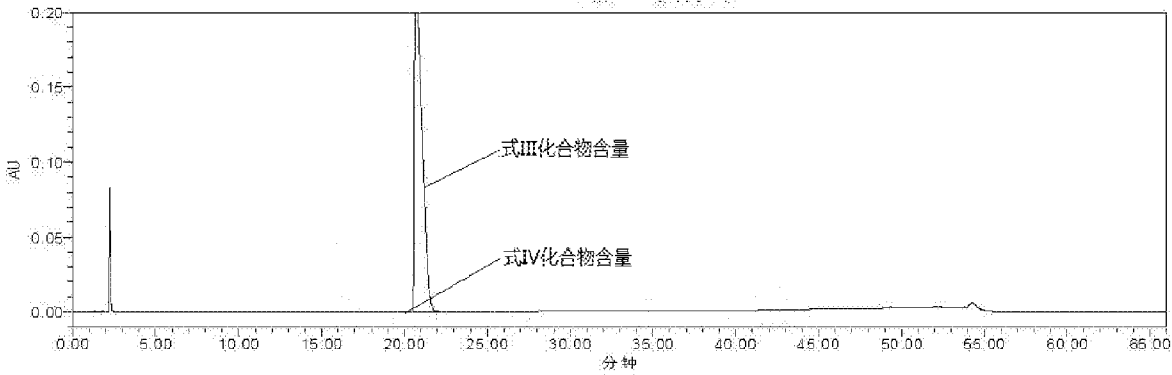


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/098740**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 1/30 (2006.01) i; C07K 7/56 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of knowledge and key words: purif+, pneumocandin, echinocandin, caspofungin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102295686 A (INSTITUTE OF BIOLOGICAL ENGINEERING, HANGZHOU EAST CHINA PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.), 28 December 2011 (28.12.2011), claims 1-9, and description, page 1, paragraph [0002]	22
A	CN 102295686 A (INSTITUTE OF BIOLOGICAL ENGINEERING, HANGZHOU EAST CHINA PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.), 28 December 2011 (28.12.2011), claims 1-9, and description, page 1, paragraph [0002]	1-21
X	PAN, Yi et al. "STUDY ON PURIFICATION PROCESS OF PNEUMOCANDIN BY CHROMATOGRAPHY", BIOTECH WORLD, number 7, 31 July 2012 (31.07.2012), ISSN: 1674-2060, abstract, page 7, left column, paragraph 1, right column, section 1.4, and page 8, table 1	6-10, 14-22
A	PAN, Yi et al. "STUDY ON PURIFICATION PROCESS OF PNEUMOCANDIN BY CHROMATOGRAPHY" BIOTECH WORLD, number 7, 31 July 2012 (31.07.2012), ISSN: 1674-2060, abstract, page 7, left column, paragraph 1, right column, section 1.4, page 8, table 1	1-5, 11-13
A	CN 102947327 A (DSM SINOCHEM PHARMACEUTICALS NETHERLANDS B.V.), 27 February 2013 (27.02.2013), the whole document, particularly abstract, claims 1-10, and description, pages 1-2, paragraphs [0005]-[0006]	22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2016 (16.03.2016)

Date of mailing of the international search report

24 March 2016 (24.03.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

JIA, TaoTelephone No.: (86-10) **62411993**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/098740

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102947327 A (DSM IP ASSETS B.V.), 27 February 2013 (27.02.2013), the whole document, particularly abstract, claims 1-10, and description, pages 1 and 2, paragraphs [0005]-[0006]	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/098740

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102295686 A	28 December 2011	None	
CN 102947327 A	27 February 2013	WO 2011120842 A1	06 October 2011
		EP 2552941 A1	06 February 2013
		US 8951958 B2	10 February 2015
		US 2013018171 A1	17 January 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/098740

A. 主题的分类

C07K 1/30(2006.01)i; C07K 7/56(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNKI;DWPI;ISI Web of knowledge和关键词:纽莫康定, 纯化, 棘白菌素, 棘球白素, 卡泊芬净, purif+, pneumocandin, echinocandin, caspofungin

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102295686 A (杭州华东医药集团生物工程研究所有限公司) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 权利要求1-9, 说明书第1页第[0002]段	22
A	CN 102295686 A (杭州华东医药集团生物工程研究所有限公司) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 权利要求1-9, 说明书第1页第[0002]段	1-21
X	潘毅等. “纽莫康定B0色谱纯化工艺的研究” 生物技术世界, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1674-2060, 摘要, 第7页左栏第1段, 右栏1.4节, 第8页表1	6-10, 14-22
A	潘毅等. “纽莫康定B0色谱纯化工艺的研究” 生物技术世界, 第7期, 2012年 7月 31日 (2012 - 07 - 31), ISSN: 1674-2060, 摘要, 第7页左栏第1段, 右栏1.4节, 第8页表1	1-5, 11-13
X	CN 102947327 A (中化帝斯曼制药有限公司荷兰公司) 2013年 2月 27日 (2013 - 02 - 27) 全文, 特别是摘要, 权利要求1-10, 说明书第1-2页第[0005]-[0006]段	22

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 3月 16日

国际检索报告邮寄日期

2016年 3月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

贾涛

电话号码 (86-10)62411993

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 102947327 A (中化帝斯曼制药有限公司荷兰公司) 2013年 2月 27日 (2013 - 02 - 27) 全文，特别是摘要，权利要求1-10，说明书第1-2页第[0005]-[0006]段	1-21

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/098740

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102295686	A	2011年 12月 28日	无			
CN	102947327	A	2013年 2月 27日	WO	2011120842	A1	2011年 10月 6日
				EP	2552941	A1	2013年 2月 6日
				US	8951958	B2	2015年 2月 10日
				US	2013018171	A1	2013年 1月 17日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)