



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117683066 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202211080291.0

(22) 申请日 2022.09.05

(71) 申请人 深圳艾欣达伟医药科技有限公司
地址 518000 广东省深圳市坪山区坑梓街
道金沙社区金辉路14号生物医药创新
产业园区10号楼10层1003号

(72) 发明人 蔡晓宏 段建新 陈涛 曲桐
阮美珍 卢兆强

(74) 专利代理机构 武汉智汇为专利代理事务所
(普通合伙) 42235

专利代理师 李恭渝

(51) Int. Cl.

C07F 9/564 (2006.01)

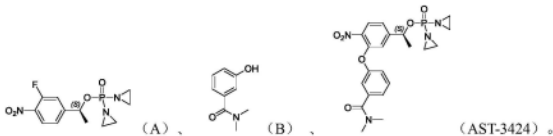
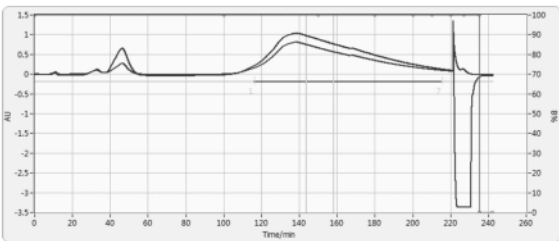
权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

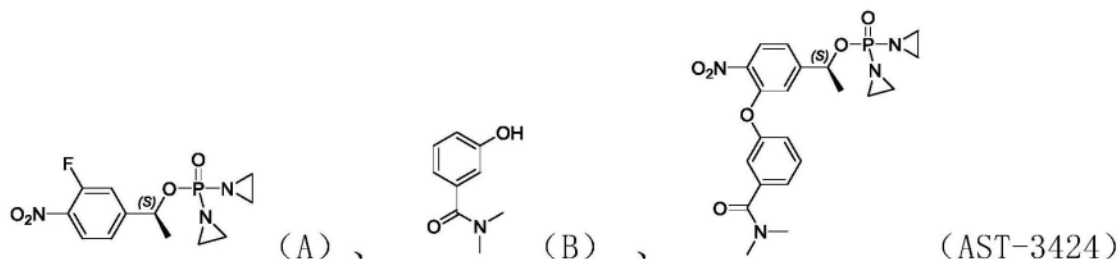
改进的AST-3424制备工艺

(57) 摘要

本发明涉及改进的AST-3424制备工艺,其用于制备高光学纯度的AST-3424,将化合物A与化合物B在碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂进行反应,其特征在于,制备的高光学纯度的AST-3424的ee%值大于或等于96%,反应时间2-8小时。其以碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂进行反应,反应时间控制在2-8小时,最终制备的AST-3424的ee%值大于或等于96%。



1.改进的AST-3424制备工艺,其用于制备高光学纯度的AST-3424,将化合物A与化合物B在碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂进行反应,其特征在于,



制备的高光学纯度的AST-3424的ee%值大于或等于96%,
反应时间2-8小时。

2.根据权利要求1所述的制备工艺,其中,
化合物A与碳酸铯的物质的量之比为1:2-2.4;
化合物A与化合物B的物质的量之比为1:1-1.80。

3.根据权利要求1所述的制备工艺,其中,溶剂丙酮与化合物A的投料关系为1g的化合物A对应18-24ml的丙酮。

4.根据权利要求1所述的制备工艺,其中,反应温度为10-35℃。

5.根据权利要求1所述的制备工艺,具体投料步骤如下:
将化合物A与溶剂丙酮混合搅拌溶解后投入化合物B以及碳酸铯;
投料完毕后搅拌反应。

6.根据权利要求1所述的制备工艺,后处理步骤如下:
反应完毕后,过滤反应液,并使用丙酮洗涤滤饼,收集滤液;
浓缩滤液后柱层析纯化即得AST-3424。

7.柱层析纯化权利要求1-6所述的制备工艺生产的AST-3424的方法,其特征在于:
使用动态轴向压缩柱系统进行柱层析,
填料为硅胶,粒径分布为10-50 μm ,孔径为60 $\text{\AA}$,

上样量为硅胶质量的2%-5%,即1kg硅胶对应的AST-3424净含量为20-50g,
洗脱过程包括

使用流动相为乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱并收集洗脱液。

8.根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

其中,使用乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱的
体积为13倍以上的层析柱填料体积,优选为13至55倍。

9.根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

其中,流动相的流速为500-600ml每分钟:15cm直径,即其他规格的层析柱的流速经折合为15cm内直径的柱子其流速为500-600ml每分钟。

10.根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

洗脱过程中还包括使用乙酸乙酯冲洗,且乙酸乙酯冲洗在乙醇体积百分比为4%-10%
的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱之前进行;

优选的,洗脱过程中使用乙酸乙酯冲洗的量为2.8倍以上的层析柱填料体积,优选为

2.8-8.2倍。

11. 根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

层析柱复用3-5次。

12. 根据权利要求11所述的柱层析方法,其特征在于:

洗脱过程结束后,使用乙醇体积比85-95%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂冲洗层析柱;

优选的,冲洗层析柱的乙醇体积比85-95%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂的体积为层析柱填料体积的2.8-3.2倍。

13. 根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

收集所述乙醇-乙酸乙酯混合溶剂洗脱的洗脱液体积的40-90%部分,即从洗脱液总体积的40%至总体积的90%进行收集,溶剂浓缩后即为AST-3424。

14. 根据权利要求7所述的柱层析方法,其特征在于:

湿法上样,待装柱完毕后将待纯化的含有AST-3424的乙酸乙酯溶液注入到层析柱中。

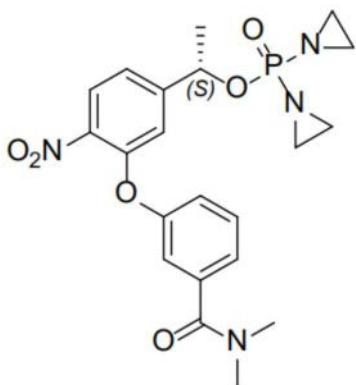
改进的AST-3424制备工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及抗癌候选药物AST-3424(OBI-3424)的原料药制备工艺及纯化方法。

背景技术

[0002] 我公司开发的以过表达醛酮还原酶1C3(AKR1C3)为标靶的DNA烷化癌症治疗药物AST-3424(参见专利申请:DNA烷化剂,对应PCT申请号PCT/US2016/021581,公开号W02016/145092,对应中国申请号2016800150788,公开号CN107530556A中公开化合物TH2870;(R)-及(S)-1-(3-(3-N,N-二甲基胺基羰基)苯氧基-4-硝基苯基)-1-乙基-N,N'-双(仲乙基)胺基磷酸酯、组合物及其使用及制备方法,对应PCT申请号PCT/US2016/062114,公开号W02017087428A1,对应中国申请号2016800446081,公开号CN108290911A中的S构型化合物),中文名为(S)-1-(3-(3-N,N-二甲氨基羰基)苯氧基-4-硝基苯基)-1-乙基-N,N'-双(亚乙基)氨基磷酸酯,也称为OBI-3424、TH-2870的S构型化合物),CAS号为2097713-69-2,其结构如下:

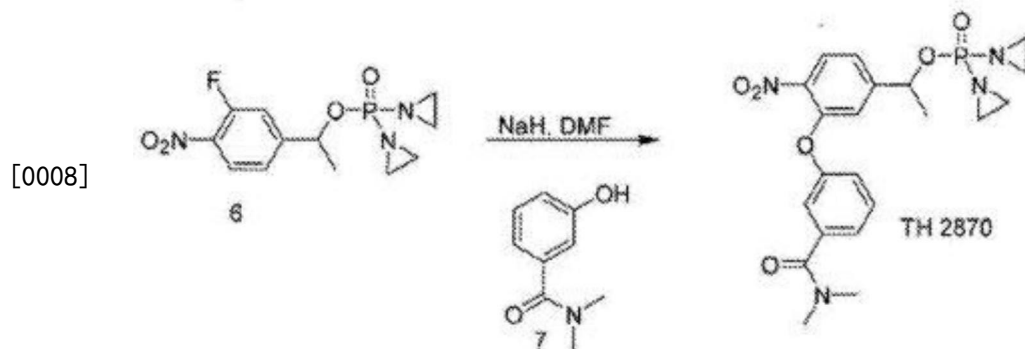


[0004] AST-3424(OBI-3424)的化学结构式

[0005] 目前该药物在中国和美国进行II期临床实验。

[0006] 仅有的三篇专利申请文件公开了该化合物或该化合物的消旋体TH-2870的制备方法。

[0007] PCT/US2016/021581,公开号W02016/145092中提供了以下的制备路线及方法(方法I):



[0009] 制备过程:

[0010] 在0℃下向化合物7于DMF (60mL) 中的混合物中分数份添加NaH (60%, 0.508g, 12.7mmol)。将混合物在0℃下搅拌0.5h, 然后添加化合物6 (2g, 6.35mmol) 且然后在0℃下搅拌2.5h。将混合物用EtOAc (500mL) 稀释, 用盐水 (50mL×3) 洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 过滤, 在减压下浓缩且通过FCC (硅胶, 丙酮/己烷) 纯化以获得呈黄色油形式的AST-2870。

[0011] TH-2870的最终纯化:

[0012] 将如上文所提及的TH 2870通过半制备型HPLC (C18管柱, 乙腈/水) 来纯化。将合并的收集物在减压下浓缩以获得作为终产物的淡黄色油。将乙腈作为共沸剂添加至蒸发物以移除水。

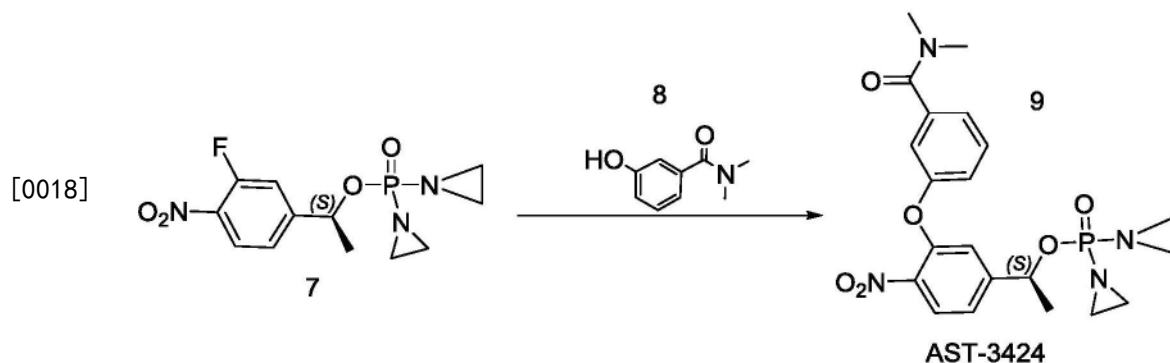
[0013] 或者通过硅胶管柱 (DCM:MeOH=40:1) 纯化以获得呈黄色油形式的化合物TH-2870。

[0014] PCT/US2016/062114, 公开号W02017087428A1中提供了以下的合成路线及制备方法 (方法II):

[0015] 通过制备型手性层析法分离TH2870的对映异构体来制备AST-3424

[0016] 将983mg的TH2870溶解于36mL的甲醇中, 在35℃至40℃的管柱温度下以3.0ml/min的流速及120巴的背压将1mL上述甲醇溶液注入至SFC-80Method Station (Thar, Waters) 中的CHIRALPAK OZ-H 4.6×250mm, 5μm (Daicel) 上, 且在CO₂/甲醇 (65-60/35-40) 的混合物中以该流速洗脱。以86.5%的产率及100%的对映异构体纯度获得式 (Ia) (构型 (R)) 的对映异构体。以83.8%的产率及100%的对映异构体纯度获得式 (Ib) (构型 (S)) 的对映异构体。

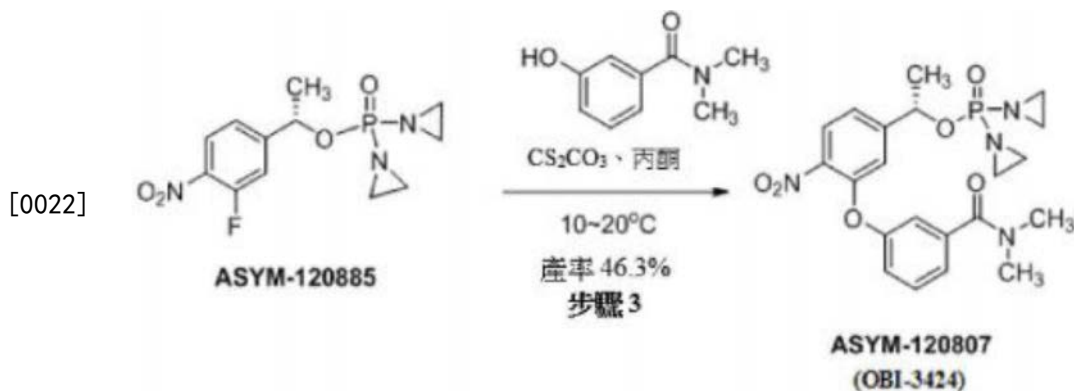
[0017] 通过使用手性原料来合成制备AST-3424 (TH-3424)



[0019] 在室温下搅拌化合物7 (1.0g)、化合物8 (785mg)、K₂CO₃ (880mg) 于DMF (8mL) 中的混合物隔夜。用水稀释混合物, 用DCM萃取, 经Na₂SO₄干燥。过滤, 浓缩且接着进行快速层析法以得到呈黄色油状物的化合物9 (1.1g)。

[0020] 这些方法在最后步骤中使用的是碱性试剂NaH、K₂CO₃, 而在后续的纯化步骤中使用的是普通的柱层析或者制备HPLC。

[0021] PCT/US2020/019176, 公开号W02020172506中提供了以下的技术细节 (路线III):

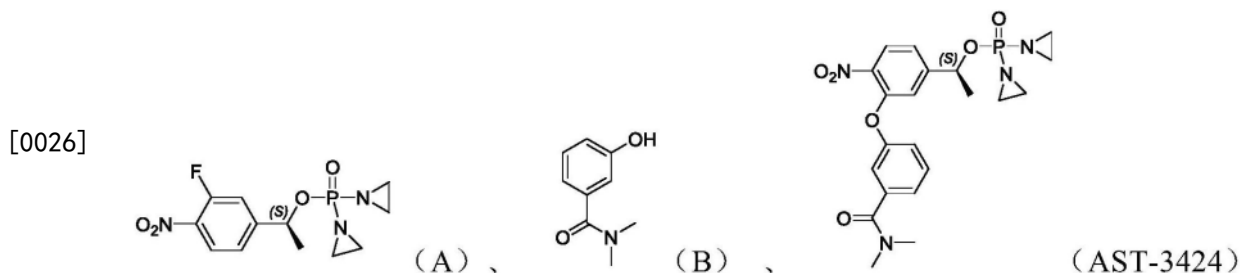


[0023] 该申请只提供了上述路线图,未具体提及操作过程以及其他细节。

发明内容

[0024] 在后续的工业化大规模生产过程中,技术人员发现使用NaH/K₂CO₃、过长的反应时间会导致反应后手性纯度降低,为了解决这个问题,在进行了一系列的工艺条件探索后,提出以下的技术方案来制备高光学纯度的AST-3424,其以碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂进行反应,反应时间严格控制在2-8小时,最终制备的AST-3424的ee%值大于或等于96%。

[0025] 改进的AST-3424制备工艺,其用于制备高光学纯度的AST-3424,将化合物A与化合物B在碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂进行反应,其特征在于,



[0027] 制备的高光学纯度的AST-3424的ee%值大于或等于96%,

[0028] 反应时间2-8小时。

[0029] A与B反应是酚羟基与卤代烃的亲核取代反应,需要碱的参与:

[0030] 第一步:B中的酚羟基在碱的条件下,生成烷氧基负离子;

[0031] 第二步:烷氧基负离子作为亲核试剂,进攻A,同时卤素负离子F⁻离去,即烷氧基负离子上去而卤素F⁻离子离去,最终生产产物AST-3424。

[0032] 这其中的关键步骤是第一步即在碱的作用下生成烷氧基负离子,碱性不能太弱:

[0033] 方法I中使用的是强碱NaH,并且在反应一段时间(30分钟)后再投入化合物B;

[0034] 方法II、路线III中使用的是较弱的K₂CO₃或Cs₂CO₃,且反应时将化合物A、化合物B以及碱一并投入混合搅拌进行反应。

[0035] 申请人在后续较大规模(10g以上)的工艺验证实验和GMP批次(100g及Kg级别)反应中发现使用过强的碱可能会导致化合物出现消旋,致使最终的产品AST-3424的手性纯度相较于反应物A降低,即过强的碱有可能会降低产物的手性纯度。

[0036] 进一步的研究发现,即使使用了较弱的碱(K₂CO₃或Cs₂CO₃)在过长的反应时间下也会导致手性纯度降低,基于申请人的实验探索,最终确定使用碳酸铯作为碱、以丙酮作为溶剂且反应时间在2-8小时得到的AST-3424产品的光学(手性)纯度高(可达98%)。

[0037] 光学(手性)纯度可以有多种表示方法,如以手性HPLC表示,则本申请所指的光学(手性)纯度可表示为AST-3424的HPLC纯度为大于或等于98%,如以ee%值表示则为ee%大于或等于96%。

[0038] 化合物A、化合物B的合成制备方法可参考PCT/US2016/021581,公开号W02016/145092;PCT/US2016/062114,公开号W02017087428A1提供的技术方案。

[0039] 优选的,化合物A与碳酸铯的物质的量之比为1:2-2.4;化合物A与化合物B的物质的量之比为1:1-1.80。

[0040] 理论上,化合物A与碳酸铯的物质的量之比为1:1为理论反应比例,但实际中通过过量添加碳酸铯:一方面可以提供价值高的原料化合物A的转化率,另一方面可以在一定程度上提高反应速率。但过多的碱有可能破坏化合物A、产物AST-3424,因此也不能过量太多,实验表明,化合物A与碳酸铯的物质的量之比为1:2-2.4比较合适,兼顾了上述两个方面。

[0041] 优选的,溶剂丙酮与化合物A的投料关系为1g的化合物A对应18-24ml的丙酮。

[0042] 由于反应中使用的是丙酮作为溶剂,溶剂的量应合适:过低将导致反应体系不能完全溶解,而过高的溶剂量将稀释反应物浓度而使得反应速度过慢,而且溶剂过多将加重后处理工作量和废液排放,经过多次实验摸索得到1g的化合物A对应18-24ml的丙酮这样的比例比较合适。

[0043] 优选的,反应温度为15-35℃。

[0044] 反应温度直接关系到反应速率以及反应是否发生副反应。由于化合物A与化合物B发生亲核取代反应生成产物AST-3424。在碱存在下,在发生亲核取代反应的同时也会发生消去反应生成烯烃。一般而言,高温会促进消去反应而生成副产物,为了尽量抑制消去反应发生而生成副产物应控制反应在较低温度进行;较低的反应温度会使得反应速率降低而最终延长反应时间,已经实验证明了过长的反应时间会导致最终的产物AST-3424消旋。

[0045] 合适的反应温度是必要的,既能使得反应中尽量少的发生消去反应,又能在尽量短的时间内完成反应使得生成的AST-3424的光学纯度高,通过实验摸索得出反应温度为15-35℃比较合适。

[0046] 优选的,本申请的工艺的具体投料步骤如下:

[0047] 将化合物A与溶剂丙酮混合搅拌溶解后投入化合物B以及碳酸铯;

[0048] 投料完毕后搅拌反应。

[0049] 优选的,反应完成后的后处理步骤如下:

[0050] 反应完毕后,过滤反应液,并使用丙酮洗涤滤饼,收集滤液;

[0051] 浓缩滤液后柱层析纯化即得AST-3424。

[0052] 本发明还提供上述工艺制备的AST-3424的纯化方法。

[0053] 在现有技术中:方法I使用半制备型HPLC(C18管柱,乙腈/水)来纯化,或者普通的柱层析;方法II使用超临界流体色谱法(SFC)进行手性分离,使用的流动相为超临界液态的CO₂中掺加甲醇。

[0054] 制备型HPLC使用乙腈作为流动相,一方面成本高,无法大规模在工业生产(百克级甚至公斤级规模)中使用,而且由于HPLC的生产能力比较小,将导致分离时间特别长,使用溶剂量大,不经济,因此大规模生产无法使用HPLC进行分离生产。

[0055] 超临界流体色谱法,效率高、速度快,但目前仅仅在实验室使用,大量的分离纯化

技术还不成熟,应用到工业生产上难度较大,而且成本十分高昂。

[0056] 普通的柱层析,可以通过使用更大直径的色谱柱,调整流动相比比例甚至使用梯度洗脱来提高一次分离量和分离效果,但由于受到不同批次的层析柱很难具有稳定的分离效果,会导致批次之间的分离效果、产率差别较大,不利于质量控制,因此在更大规模的公斤级生产中,使用普通的柱层析并不适用。

[0057] 申请人通过实验优化和选择,使用动态轴向压缩柱系统进行分离,并选择合适的特定粒径的硅胶(粒径分布10-50 μm),操作时使用特定的上样量,洗脱时使用乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱,可以达到工业大规模生产的要求:百克级大规模分离、分离效果好。

[0058] 柱层析纯化上述制备工艺生产的AST-3424的方法,其特征在于:

[0059] 使用动态轴向压缩柱系统进行柱层析,

[0060] 填料为硅胶,粒径分布为10-50 μm ,孔径为60 $\text{\AA}$,

[0061] 上样量为硅胶质量的2%-5%,即1kg硅胶对应的AST-3424净含量为20-50g,

[0062] 洗脱过程包括

[0063] 使用流动相为乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱并收集洗脱液。

[0064] 实验探索确定使用乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱的体积为13倍以上的层析柱填料体积,优选为13至55倍。

[0065] 优选的,流动相的流速为500-600ml每分钟:15cm直径,即其他规格的层析柱的流速经折合为15cm内直径的柱子其流速为500-600ml每分钟。

[0066] 柱层析时,流速的快慢决定分离的效率,一般而言低速有利于分离,即低速的流动相冲洗负载有化合物的硅胶,化合物的分离效果更好;但过低的速度会导致化合物与硅胶结合时间太长而导致硅胶上的活性基团与化合物反应(AST-3424具有多个可能发生反应的活性基团),因此流速应合适,通过实验摸索得出15cm内直径的柱子其流速为500-600ml每分钟,如7.5cm内直径的柱子期流速为125-150ml每分钟,30cm内直径的柱子期流速为2000-2400ml每分钟。

[0067] 柱层析上样(上样,即将待纯化的样品加载吸附在硅胶上)常用的方法有湿法上样和干法上样。湿法上样是直接将待分离的化合物溶液注入到装有硅胶的层析柱中。干法上样比较复杂,先将适量硅胶加入到待纯化的样品溶液中,然后去除溶剂得到负载了样品化合物的干硅胶,将干硅胶装入到干的硅胶柱上。通入流动相后进行冲洗。

[0068] 使用干法上样和湿法上样都可以,但AST-3424极性较大,湿法上样就能完全吸附在硅胶中,并不需要干法上样来加强吸附,因此建议使用湿法上样,即待装柱完毕后将待纯化的含有AST-3424的乙酸乙酯溶液注入到层析柱中。

[0069] 洗脱过程中还包括使用乙酸乙酯冲洗,且乙酸乙酯冲洗在乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱之前进行;

[0070] 优选的,洗脱过程中使用乙酸乙酯冲洗的量为2.8倍以上的层析柱填料体积,优选为2.8-8.2倍。

[0071] 洗脱过程结束后,使用乙醇体积比85-95%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂冲洗层析柱;

[0072] 优选的,冲洗制备柱的乙醇体积比85-95%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂的体积为层析柱填料体积的2.8-3.2倍。

[0073] 层析柱可复用3-5次,进一步的,层析柱复用3-4次较好,在复用第4次后,如要再使用应在冲洗后进行干燥重新装柱,重新装柱后即成为新的层析柱可以再次复用。

[0074] 收集所述乙醇-乙酸乙酯混合溶剂洗脱的洗脱液体积的40-90%部分,即从洗脱液总体积的40%至总体积的90%进行收集,溶剂浓缩后即为AST-3424。如此收集到的洗脱液中AST-3424纯度高。头部的洗脱液或是尾部的洗脱液都含有其他杂质。

附图说明

[0075] 图1为第一组实验层析柱第一次进样纯化洗脱图谱,从标记为1开始进行AST-3424收集,标记为7处结束AST-3424收集;

[0076] 图2为第三组实验层析柱第一次进样纯化洗脱图谱,从标记为1开始进行AST-3424收集,标记为9处结束AST-3424收集;

[0077] 图3为第三组实验层析柱第二次进样纯化洗脱图谱,从标记为1开始进行AST-3424收集,标记为9处结束AST-3424收集;

[0078] 图4为第三组实验层析柱第三次进样纯化洗脱图谱,从标记为1开始进行AST-3424收集,标记为10处结束AST-3424收集;

[0079] 图5为第三组实验层析柱第四次进样纯化洗脱图谱,从标记为2开始进行AST-3424收集,标记为10处结束AST-3424收集;

[0080] 图6为第三组实验层析柱第五次进样纯化洗脱图谱,从标记为2开始进行AST-3424收集,标记为10处结束AST-3424收集。

具体实施方式

[0081] 实验说明

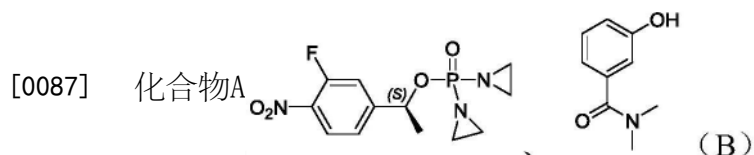
[0082] 所有的实验试剂如无特殊说明,均为分析纯。

[0083] HPLC测试使用仪器为安捷伦1200液相色谱仪。

[0084] AST-3424的HPLC纯度测试使用C8色谱柱,乙腈/水体系流动相(参考CN108290911A即WOW02017/087428)

[0085] AST-3424的手性HPLC纯度测试使用手性色谱柱(填料为多糖衍生物,比如大赛璐Daicel CHIRALPAK系列),使用正己烷/异丙醇体系流动相。

[0086] 动态轴向压缩柱系统设备型号为DAC150和DAC50。



[0088] 化合物A、B由申请人根据PCT/US2016/062114,公开号W02017087428A1或PCT/US2020/019176,公开号W02020/172506公开的方法制备。

[0089] HPLC,高效液相色谱。

[0090] TLC,薄层色谱。

[0091] DMF, N,N-二甲基甲酰胺。

[0092] DMSO, 二甲基亚砷。

[0093] THF, 四氢呋喃。

[0094] ee%, 对映体过量百分率。

[0095] eq, 摩尔当量。

[0096] 实施例1 (小规模实验)

[0097] 操作步骤

[0098] 1、在氮气氛围保护下, 将化合物A (1.0eq) 和溶剂丙酮 (19ml 丙酮/1g 化合物A) 投入到四口烧瓶中。

[0099] 2、开动搅拌, 加入化合物B (1.3eq) 和 K_2CO_3 (2.0eq) 粉末

[0100] 将反应温度调节至 $25^\circ C \pm 5^\circ C$ 进行搅拌反应, 通过HPLC检测反应进度: 待化合物A 在反应液中含量的检测不到时即判定反应结束。

[0101] 后处理

[0102] 3、过滤反应溶液, 并用丙酮洗涤滤饼 (洗涤用量约为滤饼体积的3-10倍), 收集滤液, 减压蒸发滤液得粗品溶液。

[0103] 粗品溶液使用普通层析柱分离, 流动相为甲醇: 乙酸乙酯体积比为7:93, 并添加0.5% 体积比的三乙胺, 分离后使用手性HPLC测试最终产品的手性纯度。

[0104] 分别进行了9组实验, 最终结果如下表1。

[0105] 表1: 在典型1、2、3操作方法基础上改变条件后的小试实验结果

实验批次	反应变动 (在上述典型1、2、3操作方法基础)	化合物A投料量	反应时长	ee%
1	上述典型1、2、3步骤操作方法	1g	72 ~ 96hours	96.6%
2	添加2.0eq的化合物B和4.0eq K_2CO_3	1.1g	24hours	95.24%
3	使用DMSO作为反应溶剂	1g	1hour	98.3%
4	使用THF作为反应溶剂	1g	72hours	97.02%
5	使用DMSO: 丙酮体积比为1:2的混合溶剂	1g	24hours	94.26%
6	使用DMF作为反应溶剂	1g	24hours	96.1%
7	使用碳酸铯作为碱	2g	48hours	96.18%
8	使用碳酸铯作为碱	2g	24hours	97.58%
9	使用碳酸铯作为碱	25g	36hours	96.96%
10	使用2.4eq Cs_2CO_3 和1.56eq的化合物B	20g	24hours	96.96%

[0107] 反应变动是在上述典型1、2、3操作方法基础上的变动。

[0108] 通过以上实验可知, 反应使用的溶剂、反应使用的碱 (K_2CO_3 或者 Cs_2CO_3)、反应时间等均对反应最后的手性纯度 (ee%) 有影响。

[0109] 基于 K_2CO_3 /DMF、NaH/DMF 与 Cs_2CO_3 /丙酮的实验数据对比, 数据上体现出 Cs_2CO_3 /丙酮的优势, 使用 K_2CO_3 ee值不如使用碳酸铯, 反应时间较长, 碳酸铯做碱反应速度较快; 另一方面, 使用DMF作为溶剂后处理会产生较多废水, 后处理复杂, NaH在反应过程和后处理均会产生大量氢气, 尤其后处理安全隐患较大, 不利于安全生产。

[0110] DMSO虽然也可以得到高手性纯度的产品且时间也比较短, 但DMSO几乎无法从产品中除去, 不适合作为反应溶剂; 而与丙酮混合后, 所得产品的手性纯度过低, 因此排除DMSO作为工艺生产的反应溶剂。

[0111] 为此分别进行单因素实验探索。

[0112] 实施例2

[0113] 进行不同反应时间的实验,考察最终产物的光学纯度(手性HPLC纯度,即在手性HPLC测试中AST-3424与其对映异构体的相对百分比含量,如某批次的AST-3424的手性HPLC纯度使用面积归一法测量为92.61%,则其对映异构体的相对百分比含量为7.39%,此种情况下AST-3424的ee%为85.22%),结果如下表2。

[0114] 表2:反应时间摸索实验结果

批次	投料量	反应时间	手性HPLC 纯度
0013	420g 化合物B的丙酮溶液(含化合物B 20g), 46g碳酸铯, 16g 化合物A	18h	92.61%
[0115] 0016	27.5g 化合物B丙酮溶液(含化合物B 1.7g), 3.91g碳酸铯, 1.36g化合物A	2h	99.29%
		3h	99.18%
		4h	99.06%
		5h	98.94%
		22h	86.70%
0017	290g 化合物B丙酮溶液(含化合物B 15g), 34.05g碳酸铯, 11.25g 化合物A	6h	99.12%

[0116] 结果显示反应时间的延长会导致光学纯度下降,对比可知在不超过8小时的情况下比较合适,考虑到过短的时间将无法使得化合物A反应完全,2-8小时的反应时间是较优的。反应2-8小时后需要立即过滤处理,避免长时间处于碱性环境而导致手性纯度下降。

[0117] 实施例3

[0118] 进行不同碳酸铯用量的实验,考察最终产物的光学纯度,结果如下表3。

[0119] 表3:碳酸铯用量摸索实验结果

实验 批次	化合物 A 投料量	反应变动	ee%
[0120] 7573	20g	使用碳酸铯作为碱, 1.56eq 化合物 B, 2.4eq CS_2CO_3 , 反应 24 小时	96.96%
0106	10g	使用碳酸铯作为碱, 1.43eq 化合物 B, 2.2eq CS_2CO_3 , 反应 24 小时	97.08%

[0121] 结果显示过多的碳酸铯用量会导致手性纯度下降,过量不能太多。

[0122] 实施例4

[0123] 进行不同溶剂的实验,考察最终产物的光学纯度,结果如下表4。

[0124] 表4:不同反应溶剂摸索实验结果

实验 批次	化合物 A 投料量	反应变动	ee%
[0125] 7503	1g	上述典型 1、2、3 步骤操作方法	99.85%
		使用 DMSO 作为反应溶剂	98.36%
		使用 THF 作为反应溶剂	97.02%

[0126]	7561	1g	使用 DMSO: 丙酮体积比为 1: 2 的混合溶剂剂	94.26%
	7566	2g	使用 DMF 作为反应溶剂	96.10

[0127] 小试对比来看,使用丙酮ee值接近100%,使用其他溶剂ee均低于丙酮。

[0128] 使用DMSO和DMF会使用大量水淬灭,产生较多废水,另外还需要有机溶剂萃取产物,工艺过程较复杂,这些溶剂都没有丙酮合适。

[0129] 实施例5

[0130] 考察了反应混合物的ee%,结果表明,在较低的温度时,随着反应时间的延长,ee%下降缓慢;当反应温度升高到45~50℃时,外消旋反应明显加快,ee%下降较快。结果如下表5。

[0131] 表5:不同反应温度实验结果

[0132]	实验批次	反应条件	Ee%	变化
	7535-17	20-30℃反应 72 小时(正常反应)	97.28%	搅拌 3 天, ee%由 98.44%降至 97.28%。
	7535-20	反应在 20-30℃反应 72 小时, 再加热到 45-50℃反应 6 小时	95.77%	反应温度为 45-50℃, 反应时间为 6 h 时, ee%由 ee%值由 97.28%降至 95.77%。

[0133] 实施例6

[0134] 新改进后使用Cs₂CO₃/丙酮进行反应,具体工艺操作如下:

[0135] 投料

[0136] 向80L玻璃反应釜中加入化合物A丙酮溶液15.76kg(折算后含有化合物A 0.65kg)。开动搅拌。开启控温并在15~25℃向上述80L釜中加入化合物B(0.50kg)。在15~25℃向上述80L釜加入碳酸铯(1.52kg),并用丙酮(0.26kg)淋洗釜壁将壁上撒的碳酸铯冲洗干净。

[0137] 反应

[0138] 将体系调温至10~20℃保温反应,1~2h后开始取样,每1~4h取样一次,HPLC跟踪检测至化合物含量≤1%。反应约2至8小时后即完成。

[0139] 后处理

[0140] 白钢压滤罐控温在10~20℃时过滤反应液。滤液转移至容器中。滤饼用丙酮淋洗并用薄层色谱检测淋洗液至检测不到产物AST-3424为止,将淋洗液收集并合并到容器中。

[0141] 浓缩

[0142] 将滤液和淋洗液转移到夹套反应釜中,控温夹套T≤35℃,向体系中加入乙酸乙酯,在P≤-0.08MPa下浓缩至剩余1.95~2.60L。

[0143] 降温得粗品

[0144] 将体系降温至15~25℃,搅拌10~30min,最后得棕红色液体2.59kg,定量检测其中AST-3424质量百分比为39.04%,即折合纯的AST-3424质量为1.01kg,HPLC纯度为80.50%。

[0145] 实施例7

[0146] 动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化工艺实验。

[0147] 通过摸索实验最终发明人确认的最优工艺条件如下:

[0148] 色谱柱名称:动态轴向压缩柱DAC-150。

- [0149] 填料型号:球形硅胶(球形度90%以上) 10-50 μ m 60Å
- [0150] 色谱柱长:320mm,柱内直径:150mm
- [0151] 填料量:3kg
- [0152] 上样量:1/30填料量,标准值:0.1kg,实际:0.288kg(乙酸乙酯溶液,含量:39.04%)
- [0153] 匀浆溶剂:乙酸乙酯
- [0154] 匀浆比例要求:1:2.5-3(kg/L)
- [0155] 匀浆搅拌时间: ≥ 30 min
- [0156] 装柱压力(要求柱内压力):5MPa
- [0157] 保压时间:1h以上
- [0158] 检测波长:230nm检测,285nm监控
- [0159] 洗脱剂流速:550mL/min
- [0160] 流动相配比:分为A、B和C,A为100%乙酸乙酯,B为乙酸乙酯/无水乙醇93:7(质量比),C为乙酸乙酯/无水乙醇11:89(质量比)
- [0161] 球型硅胶重复使用次数:3次,有冲洗硅胶柱的操作。
- [0162] 洗脱程序如下表7。
- [0163] 表7:洗脱程序

Stage/ 阶段	Balance stage / 平衡阶段	进样	Elution/洗脱				Wash/冲柱	
Time/时间 (min)	15	Inject samples with a flow rate of 50~100 mL/min through the injection pump 通过 进样泵用 50~100 mL/min 的 流速进样	0	30	30.1	170	170.1	200
A%	100		100	100	0	0	0	0
B%	0		0	0	100	100	0	0
C%	0		0	0	0	0	100	100
流速 (mL/min)	550		550	550	550	550	550	550

- [0165] 纯化操作流程:
- [0166] 1、配制流动相。
- [0167] 按照流动相配比
- [0168] A为100%乙酸乙酯,
- [0169] B为乙酸乙酯/无水乙醇93:7(质量比),
- [0170] C为乙酸乙酯/无水乙醇11:89(质量比)
- [0171] 配制A、B、C三组流动相并储存备用。
- [0172] 2、拌硅胶、装柱。
- [0173] 通过蠕动泵向匀浆罐中加入适量的乙酸乙酯。向匀浆罐中加入计算量的球形硅胶,用适量乙酸乙酯淋洗匀浆罐,将匀浆罐中体系搅拌 $T \geq 0.5$ h后待用。最终的匀浆比例即硅胶与乙酸乙酯的配比为1kg硅胶:2.5-3L的乙酸乙酯。
- [0174] 用适量乙酸乙酯对制备柱进行加压测试密封性。测试通过后,将匀浆罐内搅拌均匀后的填料浆液压入至制备柱中,压入完毕后用适量乙酸乙酯淋洗匀浆罐,淋洗液经过管

路转移至制备柱中,将制备柱加压至5MPa后保压 ≥ 0.5 h后待用。

[0175] 3、连接管路和流量泵、进样并配置洗脱程序进行柱层析纯化操作。

[0176] 确认泵A与制备色谱仪已正确连接:流动相A $\rightarrow$ 泵A $\rightarrow$ 制备色谱仪

[0177] 确认泵B与制备色谱仪已正确连接:流动相B $\rightarrow$ 泵B $\rightarrow$ 制备色谱仪

[0178] 按照

[0179] 检测波长:230nm检测,285nm监控

[0180] 洗脱剂流速:550mL/min

[0181] 进行洗脱程序。

[0182] 开动A泵15分钟进行平衡。

[0183] 平衡完毕后进样进行洗脱。

[0184] 每针进样量为0.288kg (乙酸乙酯溶液,含量:39.04%,折合AST-3424为0.1Kg),样品需过滤,预计1~2针为预实验,预实验收集5~10份组分,每份收集1~30min,单独检测HPLC根据预实验结果决定收集计划,后续每2~3针合并为一批,对应组分合并后分别进行HPLC检测。

[0185] 进样时使用进样泵用50~100mL/min的流速进样。

[0186] 进样完毕后,继续开动泵A洗脱30分钟后关闭泵A,将泵A管道与流动相C连接。

[0187] 确认泵A与制备色谱仪已正确连接:流动相C $\rightarrow$ 泵A $\rightarrow$ 制备色谱仪。

[0188] 开动泵B继续进行洗脱。从30.1分钟至170分钟一直开动泵B进行洗脱。

[0189] 洗脱程序结束,关闭泵B。

[0190] 开动泵A泵入流动相C进行柱冲洗。从170.1分钟至200分钟一直开动泵A进行柱冲洗,冲柱的流动相C的体积约为层析柱填料体积的2.8-3.2倍体积。

[0191] 柱冲洗完成后进行下一次进样纯化,无需重复2的拌硅胶、装柱操作,直接重复3的所有操作。

[0192] 制备3针后需重新装柱,重复2、3的拌硅胶、装柱操作以及连接管路和流量泵、进样并配置洗脱程序进行柱层析纯化操作。

[0193] 在已经得到了粗品的基础上进行上述纯化。

[0194] 使用动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化。

[0195] 下表8提供四批次的包括产率、HPLC纯度、ee%值4个GMP批次生产数据。

[0196] 表8:四个批次的GMP产品生产数据

批号	化合物 A 投料量 (Kg)	AST-3424 产量		纯度%	Ee%值	收率%
		理论量(kg)	实际产量(kg)			
03-02	0.49	0.72	0.32	99.5	97.4	44.0
03-03	0.55	0.80	0.35	99.6	97.5	43.9
03-04	0.45	0.65	0.30	99.6	97.8	46.3
03-03P	0.65	1.01	0.779	99.5	97.2	77.1

[0198] 通过4批GMP条件下的数据可知新的工艺完全可行,产品质量符合要求。

[0199] 实施例8

[0200] 动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化工艺摸索实验。

[0201] 实施例7中使用的工艺参数经过以下的摸索过程得到。

[0202] 通过实验探究乙醇+乙酸乙酯混合溶剂作为流动相的合适乙醇含量。

[0203] 第一组实验(球形硅胶复用4次)

[0204] 直接上样5g样品(乙酸乙酯溶液),按照含量折算AST-3424含量为1.1g。

[0205] 填料为球形硅胶10-50um 60Å共120g。使用乙酸乙酯匀浆,比例要求:1:2.5-3(kg/L),即1kg硅胶使用2.5-3L的乙酸乙酯。

[0206] 实验使用流动相:A:乙酸乙酯

[0207] B:5%乙醇:95%乙酸乙酯(体积比)

[0208] 流速为60ml/min,检测波长:230nm检测,285nm监控。

[0209] 洗脱程序如下表9:

[0210] 表9:动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化小试第一组实验的洗脱程序表

[0211]	时间	0	30	30.1	220
	流动相B	0	0	100	100
	流动相A	100	100	0	0

[0212] 洗脱图谱如图1所示(其中上部的曲线为230nm检测曲线,下部的曲线为285nm监控曲线,其余图形也是如此)。从图谱中标记的1和7这段时间内收集洗脱液,得到7份洗脱液,分别按流出先后标记为1-7,其HPLC测试纯度结果如下表10。

[0213] 表10:第一组实验层析柱第一次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0214]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6	7
	HPLC纯度%	97.85	99.56	99.89	99.93	100	100	100

[0215] 同样的洗脱程序,同样的上样量和工艺参数,冲洗层析柱后进行复用,收集6份洗脱液,别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表11。

[0216] 表11:第一组实验层析柱第二次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0217]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	97.81	99.02	99.73	99.89	99.91	100

[0218] 流动相采用乙酸乙酯冲洗30min,5%无水乙醇:95%乙酸乙酯冲洗190min,重复两针,结果显示杂质分离较好。但制备时间较长,成本太高。

[0219] 需要对梯度继续优化和增加进样量,降低成本。同时重复进样,考察填料耐用性。

[0220] 提高流动相中乙醇含量,使用流动相:A:乙酸乙酯

[0221] B:8%乙醇:92%乙酸乙酯(体积比)

[0222] 冲洗层析柱后进行复用,继续第三次使用,同样的洗脱程序(只是时间缩短为200分钟),同样的上样量和工艺参数,收集5份洗脱液,分别按流出先后标记为1-5,其HPLC测试纯度结果如下表12。

[0223] 表12:第一组实验层析柱第三次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0224]	洗脱液编号	1	2	3	4	5
	HPLC纯度%	98.65	99.89	99.97	99.98	99.63
	RRT=1.25杂质	/	/	/	/	0.37

[0225] /表示未检出,下同。

[0226] 提高流动相中乙醇含量,使用流动相:A:乙酸乙酯

[0227] B:8%乙醇:92%乙酸乙酯(体积比)

[0228] 并增加100%的上样量即上样为10g样品的乙酸乙酯溶液,按照含量折算AST-3424含量为2.2g。

[0229] 冲洗层析柱后进行复用,继续第四次使用,同样的洗脱程序(只是总时间缩短为200分钟),同样的上样量和工艺参数,收集5份洗脱液,分别按流出先后标记为1-5,其HPLC测试纯度结果如下表13。

[0230] 表13:第一组实验层析柱第四次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0231]	洗脱液编号	1	2	3	4	5
	HPLC纯度%	98.06	99.91	99.72	99.67	98.18
	RRT=1.25杂质	/	/	/	0.25	1.65

[0232] 第一组实验装填的硅胶层析柱使用四次后分离得到的样品质量已经出现下降:第5份洗脱液中RRT=1.25的杂质已高达1.65%,不再使用。

[0233] 在后续的乙醇或乙醇-乙酸乙酯混合溶剂冲洗实验中,将RRT=1.25处的杂质冲洗收集,发现该物质颜色为黄色,为填料吸附杂质,该杂质在AST-3424后出峰,连续3针,就易出现在洗脱液中。

[0234] 第二组实验(球形硅胶复用3次)

[0235] 使用第一组实验的参数进行装柱,填料为球形硅胶20-35um 120g 60Å。使用乙酸乙酯匀浆,比例要求:1:2.5-3(kg/L),即1kg硅胶使用2.5-3L的乙酸乙酯。

[0236] 实验使用流动相:A:乙酸乙酯

[0237] B:8%乙醇:92%乙酸乙酯(体积比)

[0238] 流速为60ml/min,检测波长:230nm检测,285nm监控。

[0239] 进样量为11ml(样品量10g),按照含量折算AST-3424含量为2.2g。

[0240] 洗脱程序如下表14:

[0241] 表14:动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化小试第二组实验的洗脱程序表

[0242]	时间	0	30	30.1	180
	流动相B	0	0	100	100
	流动相A	100	100	0	0

[0243] 开启机器,收集洗脱液,得到6份洗脱液,分别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表15。

[0244] 表15:第二组实验层析柱第一次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0245]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	98.02	99.79	99.89	99.82	99.05	97.78
	RRT=1.25杂质	/	/	/	0.091	0.78	2.1

[0246] 并增加100%的上样量20g样品(22ml乙酸乙酯溶液),按照含量折算AST-3424含量为4.4g。

[0247] 冲洗层析柱后进行复用,继续第二次使用,同样的洗脱程序和工艺参数,收集5份洗脱液,分别按流出先后标记为1-5,其HPLC测试纯度结果如下表16。

[0248] 表16:第二组实验层析柱第二次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0249]	洗脱液编号	1	2	3	4	5
	HPLC纯度%	98.26	99.83	99.92	99.48	98.57
	RRT=1.25杂质	/	/	/	0.52	1.08

[0250] 使用流动相:A:10%乙醇:90%乙酸乙酯

[0251] B:5%乙醇:95%乙酸乙酯(体积比)

[0252] 上样量不变,冲洗层析柱后进行复用,继续第三次使用,同样的洗脱程序(只是总时间缩短为160分钟),收集6份洗脱液,分别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表17。

[0253] 表17:第二组实验层析柱第三次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0254]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	95.67	99.67	99.75	99.84	99.90	99.86

[0255] 第三次进样洗脱液在第6分洗脱液中未检出RRT=1.25杂质说明该杂质在AST-3424洗脱完后即被洗脱,通过缩短洗脱时间或不收集尾部洗脱液即可以避免该杂质混入其中。

[0256] 结合制备条件和分析结果,洗脱时使用8%乙醇:92%乙酸乙酯(体积比),能够较好的分离纯化。最大进样量按投料量计算4.4g,进样品20g,分离较好。

[0257] 但连续进样三针,发现已出现其他杂质残留,尤其是RRT=1.25杂质较多,因此选择层析柱使用3次。

[0258] 使用纯乙醇冲洗柱子不如90%乙醇-10%乙酸乙酯(体积比)效果好。

[0259] 第三组实验(球形硅胶复用5次)

[0260] 重新制备一批AST-3424粗品,浓缩后得325ml,共计296g,经检测含AST-3424约62.92g。第三组纯化实验使用这批次样品进行纯化分离。

[0261] 制备柱:球形硅胶20-35um 60Å共300g,使用乙酸乙酯匀浆,比例要求:1:2.5-3(kg/L),即1kg硅胶使用2.5-3L的乙酸乙酯,装柱压力5mpa。

[0262] 实验使用流动相:A:乙酸乙酯

[0263] B:8%乙醇:92%乙酸乙酯

[0264] 洗脱程序如下表18:

[0265] 表18:动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化小试第三组实验的洗脱程序表

[0266]	时间	0	30	30.1	180
	流动相B	0	0	100	100
	流动相A	100	100	0	0

[0267] 流速为60ml/min,检测波长:230nm检测,285nm监控。

[0268] 第一次进样25ml乙酸乙酯溶液,折合AST-3424为4.84g。

[0269] 平衡过程约0.8mpa。

[0270] 洗脱图谱如图2所示,收集6份洗脱液,分别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表19。

[0271] 表19:第三组实验层析柱第一次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0272]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	95.67	99.67	99.75	99.84	99.90	99.86
	RRT=1.25杂质	/	/	/	/	0.089	0.4

[0273] 冲洗层析柱后进行复用,第二次进样52ml(折合AST-3424为10g,则对应的上样量为硅胶质量的3.33%),洗脱图谱如图3所示,收集6份洗脱液,分别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表20。

[0274] 表20:第三组实验层析柱第二次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0275]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	97.55	99.66	99.67	99.72	98.91	98.16
	RRT=1.25杂质	/	/	/	0.11	0.63	1.23

[0276] 冲洗层析柱后进行复用,第三次进样39ml(折合AST-3424为7.6g),洗脱图谱如图4所示,收集6份洗脱液,分别按流出先后标记为1-6,其HPLC测试纯度结果如下表21。

[0277] 表21:第三组实验层析柱第三次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0278]	洗脱液编号	1	2	3	4	5	6
	HPLC纯度%	97.08	99.76	99.88	99.85	98.49	99.15
	RRT=1.25杂质	/	/	/	0.049	1.33	0.7

[0279] 分析结果显示:进样量为52ml时(第三组实验第二次进样),HPLC纯度检测中对应的RRT(相对保留时间)=1.10杂质分离较差,RRT=1.25杂质也变大;第5份、第6份的RRT=1.25杂质分别为1.33%、0.7%因此上样量不应过高,在上样量为硅胶质量的2%-5%比较合适。

[0280] 本次填料使用第四次,90%乙醇-10%乙酸乙酯(体积比)冲洗制备柱后进样,进样25ml乙酸乙酯溶液(折算AST-3424为3.2g),运行压力:7.2mpa。洗脱图谱如图5所示,收集5份洗脱液,分别按流出先后标记为1-5,其HPLC测试纯度结果如下表22。

[0281] 表22:第三组实验层析柱第四次进样纯化洗脱液HPLC纯度数据

[0282]	洗脱液编号	1	2	3	4	5
	HPLC纯度%	98.44	99.83	99.99	99.86	99.60

[0283] 使用DAC50制备柱可以达到制备方法开发的分离效果,制备柱油压5.0mpa,运行压力1.2mpa。

[0284] 由于样品杂质和析出物较多,建议过滤,以保持制备柱稳定性和寿命。

[0285] 使用90%乙醇-10%乙酸乙酯(体积比)冲洗层析柱后,分离效果得到了提升。

[0286] 使用90%乙醇-10%乙酸乙酯(体积比)冲洗制备柱后,减压干燥,按照上述方法使用乙酸乙酯匀浆并重新装填制备柱,本次填料使用第五次,运行压力:1.2mpa。进样量为50ml乙酸乙酯溶液(折合AST-3424为6.4g),同样的洗脱程序进行洗脱,洗脱图谱如图6所示,收集5份洗脱液,分别按流出先后标记为1-5,其HPLC测试纯度结果和第四次近似(未检测HPLC纯度)。

[0287] 动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化工艺摸索实验总结

[0288] 1、填料,选用球形硅胶,粒径分布为20-35um,孔径为60Å;当然粒径可以是单一的,也可以是混合粒径的;

[0289] 2、上样量为硅胶质量的2%-5%，即1kg硅胶对应的AST-3424净含量为20-50g，上样过多将使得纯化效果变差；

[0290] 3、洗脱过程包括使用流动相为乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱并收集洗脱液；

[0291] 4、为了既能达到较好的纯化效果，又能尽量降低成本，层析柱可以复用3-5次，复用时在重新进样前洗脱过程结束后，使用乙醇体积比85-95%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂冲洗制备柱，通过冲洗将上一次进样中的杂质冲洗干净，冲洗至TLC无法检出为止（约使用2.8-3.2倍层析柱体积的冲洗溶剂）；

[0292] 5、进一步的，层析柱复用3-4次较好，在复用第4次后，如要再使用应在冲洗后进行干燥重新装柱，重新装柱后即成为新的层析柱可以再次复用；

[0293] 6、进一步，为了将样品中的小极性杂质除去，在洗脱过程中还包括使用乙酸乙酯冲洗，且乙酸乙酯冲洗在乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱之前进行。

[0294] 7、洗脱过程中使用乙酸乙酯冲洗的量为2.8倍以上的层析柱填料体积，优选为2.8-8.2倍，以第一组、第二组、第三组实验为例，其层析柱填料体积分别为226ml、226ml以及565ml，其冲洗的时间均为30分钟对应1800ml（流速为60ml/min），则对应的乙酸乙酯冲洗的量分别为7.96倍、7.96倍以及3.18倍，当然多冲洗一段时间更好，但考虑到效率和成本，3倍比较合适，推荐使用2.8-8.2倍的层析柱填料体积的乙酸乙酯进行冲洗；

[0295] 8、同样的使用乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱的体积推荐为13倍以上的层析柱填料体积，优选为13至55倍。以下通过表格的形式列出探索实验和GMP批次实验使用的体积比例。

[0296] 表23：探索实验和GMP批次纯化层析柱的乙酸乙酯冲洗和洗脱液洗脱的体积比数据

实验批次	GMP	1-1	1-2	1-3	1-4	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
层析柱体积ml	5652	226	226	226	226	226	226	226	565	565	565	565	565
乙酸乙酯冲洗量ml	16500	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800
乙酸乙酯冲洗倍数	2.919	7.965	7.965	7.965	7.965	7.965	7.965	7.965	3.186	3.186	3.186	3.186	3.186
洗脱液冲洗量ml	77000	11400	11400	10200	10200	9000	9000	7800	9000	9000	9000	9000	9000
洗脱液冲洗倍数	13.623	50.442	50.442	50.442	50.442	39.823	39.823	34.513	15.929	15.929	15.929	15.929	15.929

[0297] 1-1表示动态轴向压缩柱系统进行柱层析纯化工艺摸索实验第一组第一次，其余类推。

[0298] 收集AST-3424大约在乙醇体积百分比为4%-10%的乙醇-乙酸乙酯混合溶剂进行等梯度洗脱的洗脱液体积的40-90%部分，即从洗脱液总体积的40%至总体积的90%进行收集。

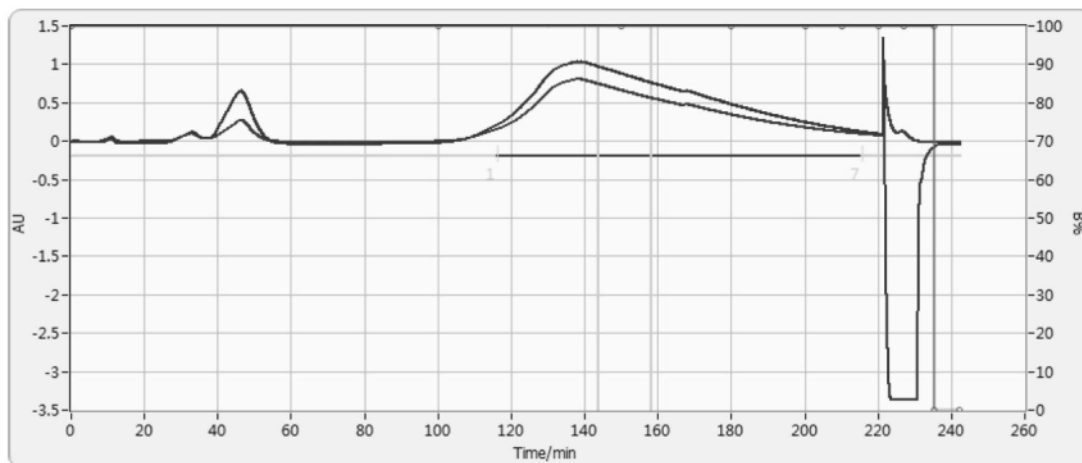


图1

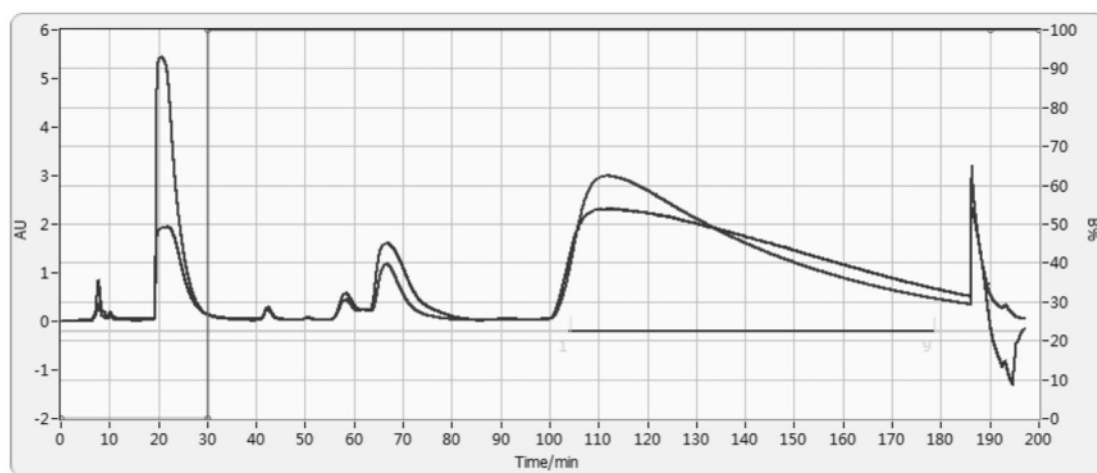


图2

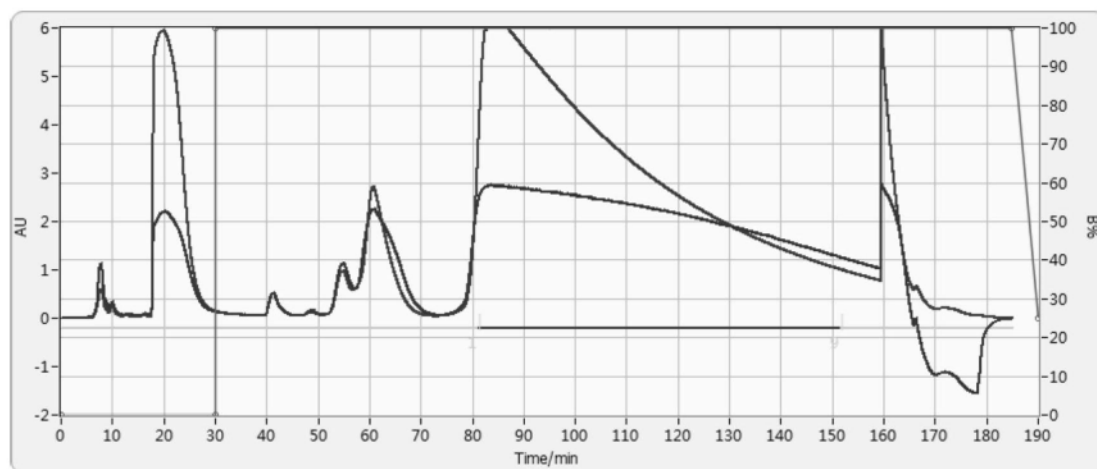


图3

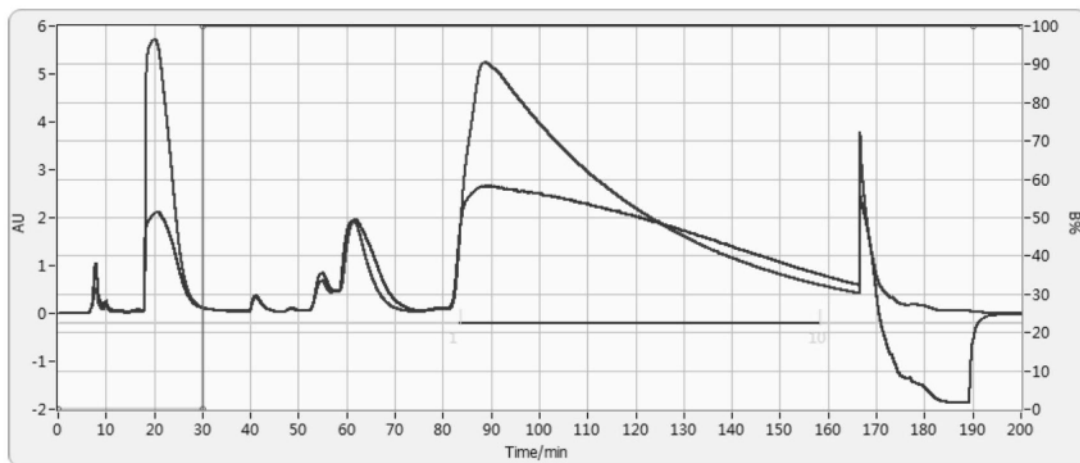


图4

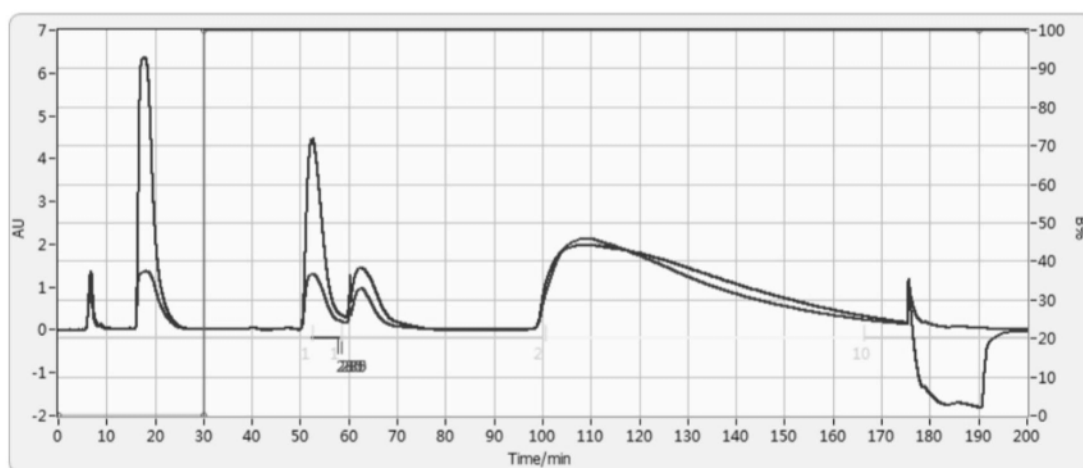


图5

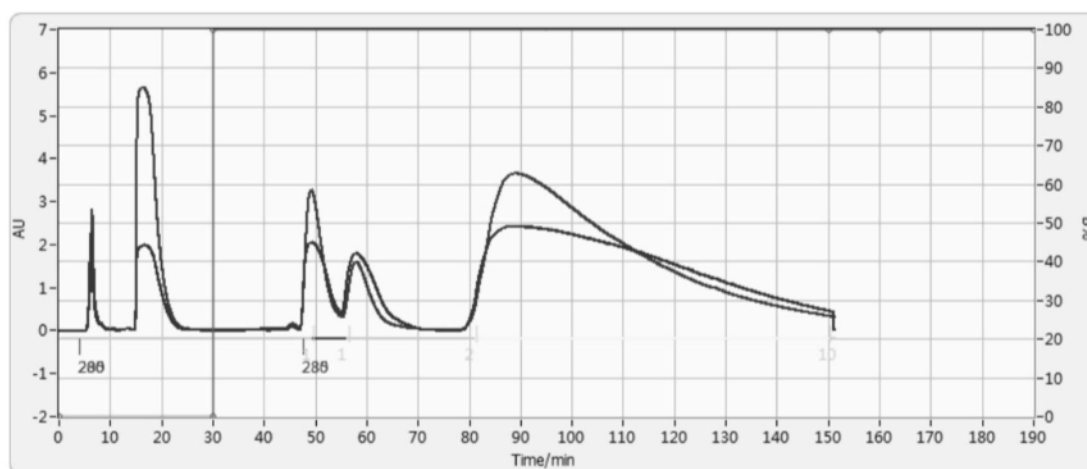


图6