(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114874288 A
(43)申请公布日 2022.08.09

(21)申请号 202210654769.X

(22)申请日 2016.07.08

(30)优先权数据
62/190,596 2015.07.09 US

(62)分案原申请数据
201680040450.0 2016.07.08

(71)申请人 米梅奥亨制药公司
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 尚塔尔·德温 田伟 马丁·博林
塞巴斯蒂安·罗基

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 樊英如 张华

(51)Int.Cl.
C07K 5/10(2006.01)
C07K 5/113(2006.01)
C07K 1/30(2006.01)
C07K 1/02(2006.01)
C07K 1/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书20页 附图18页

(54)发明名称

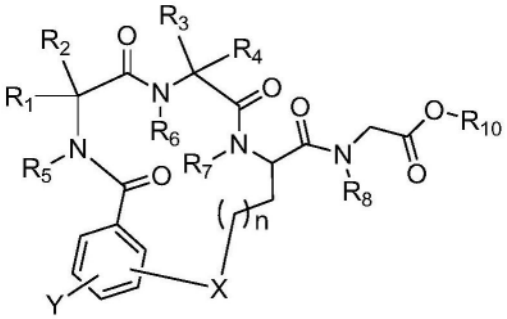
β-转角环状模拟肽盐的溶液相合成和结晶

(57)摘要

本公开涉及式I的β-转角环状模拟肽盐的制备和结晶方法,其中R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、X、Y和n如说明书中所定义。本公开提供β-转角环状模拟肽化合物及其盐的结晶形式的更高效的制备路线。

CN 114874288 A

1.制备式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐的结晶形式的方法，



(I)

其中：

R_1是氢、C_1-C_6烷基、芳基或天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基；

R_3是氢、C_1-C_6烷基、芳基或天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基；

R_2和R_4独立地为氢或C_1-C_6烷基，或者R_1和R_2与它们所连接的碳原子一起形成环丙基、环丁基、环戊基或环己基，或者R_3和R_4与它们所连接的碳原子一起形成环丙基、环丁基、环戊基或环己基；

Y选自氢、-NO_2、-$COOR_{14}$、-$OC(R_{14})_3$、-SO_3R_{14}和-SO_2R_{14}；

R_5、R_6、R_7、R_8和R_9独立地为氢或C_1-C_6烷基；

R_{10}是氢、甲基、叔丁基或保护基；和

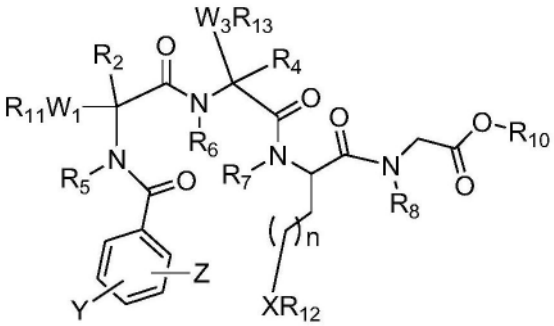
每个R_{14}是氢、烷基或芳基；

X选自O、NR_9、S、P、Se、C_1-C_6亚烷基、SO、SO_2和NH；

n是0、1、2、3、4或5；

该方法包括以下步骤：

(a)提供式(IV)的受保护的线性模拟肽化合物



(IV)

其中：

R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、X、Y和n具有以上定义的含义；

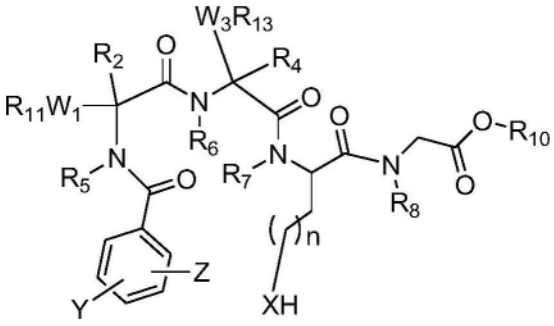
R_{11}和R_{13}独立地为氢或保护基，并且R_{11}和R_{13}至少之一为保护基；

R_{12}是保护基；

W_1和W_3独立地是天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基，分别在与R_{11}和R_{13}的连接点处少一个氢原子；和

Z选自F、Cl、Br和I；

(b)选择性地将式(IV)化合物脱保护以形成式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物

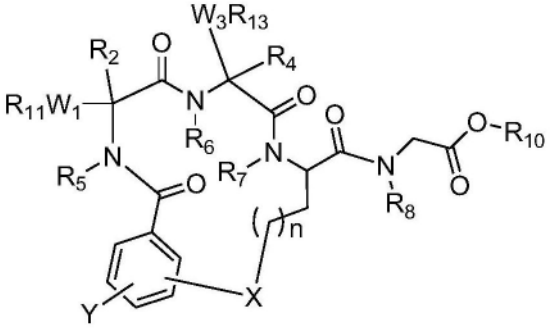


(III)

其中：

R_2、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、R_{11}、R_{13}、W_1、W_3、X、Y、Z、n具有如上定义的含义；

(c)通过分子内芳族亲核取代反应使式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物环化以形成式(II)的化合物



(II)

其中：

R_2、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、R_{11}、R_{13}、W_1、W_3、X、Y和n具有如上定义的含义；

(d)将式(II)化合物中的氨基酸侧链保护基脱保护，得到式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐；和

(e)使式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐结晶，得到结晶形式的式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐。

2.如权利要求1所述的方法，其中式(I)的β-转角环状模拟肽化合物具有14-16个环原子的大环。

3.如权利要求1所述的方法，其中R_1和R_3独立地为两个不同氨基酸的侧链取代基。

4.如权利要求3所述的方法，其中R_1和R_3独立地是赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺、精氨酸或苏氨酸的侧链取代基。

5.如权利要求1所述的方法，其中R_1和R_3独立地为谷氨酸、赖氨酸、异亮氨酸或精氨酸的侧链取代基。

6.如权利要求1所述的方法，其中R_{11}和R_{13}独立地选自三氟乙酰基、甲酰基、乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、环己基氧基羰基、芴基-9-甲氧基-羰基(Fmoc)、苄氧基羰基(Cbz)、Cbz衍生物、三苯基、甲基、苄基、烯丙氧基羰基、叔丁基、烷基硅烷和烯丙基。

7.如权利要求1所述的方法，其中R_{12}是三苯甲基或叔丁基二甲基硅烷(TBDMS)。

8.如权利要求1所述的方法，其中W_1和W_3独立地为赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺、精氨酸或苏氨酸的侧链取代基，在官能团上少一个氢原子。

9.如权利要求1所述的方法，其中X是O、S或NH。

10.如权利要求1所述的方法，其中Y是$-NO_2$。

11.如权利要求1所述的方法，其中所述环化在存在碱的情况下进行，，其中所述碱包含t-BuOK、$CsCO_3$、K_2CO_3或其混合物，进一步其中所述环化在极性非质子性溶剂中进行，其中所述极性非质子性溶剂包含乙腈、四氢呋喃、二氧六环或其混合物。

12.如权利要求1所述的方法，其中所述环化在小于约0.5％的水和小于约0.5％的甲醇中进行。

13.如权利要求1所述的方法，其中所述环化在部分保护的线性模拟肽中间体(III)的浓度低于0.05M下进行。

14.如权利要求1所述的方法，其中所述环化在-20℃至15℃的温度下进行。

15.如权利要求1所述的方法，其中所述盐是HCl盐。

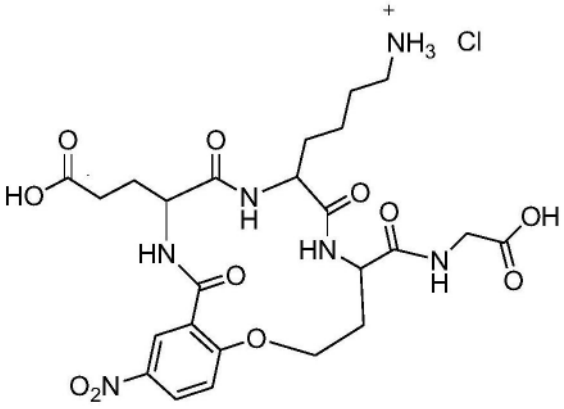
16.如权利要求1所述的方法，其中所述碱性pH为约8至约12。

17.如权利要求1所述的方法，其中通过将具有碱性pH的所述溶液与酸混合以获得酸化溶液来降低所述pH。

18.如权利要求17所述的方法，其中所述酸性pH为约0至约4。

19.如权利要求17所述的方法，其中所述的混合所述溶液在约0℃至约60℃的温度下进行。

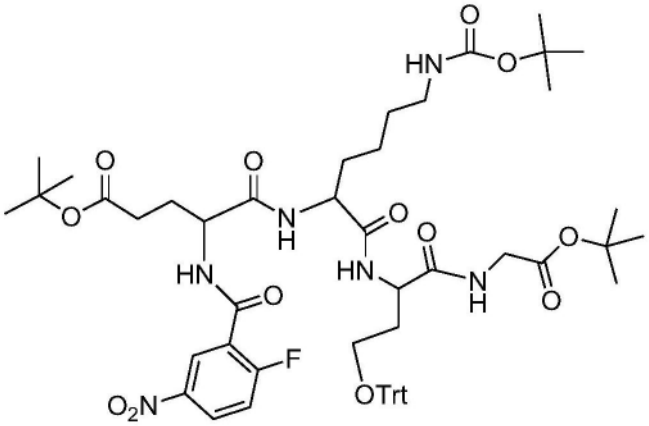
20.制备具有以下结构的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的结晶形式的方法：



D3 的 HCl 盐

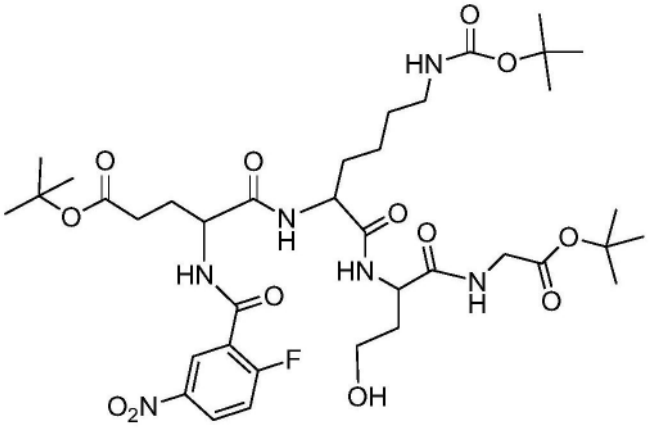
该方法包括以下步骤：

(a)提供式(4a)的受保护的线性模拟肽化合物；



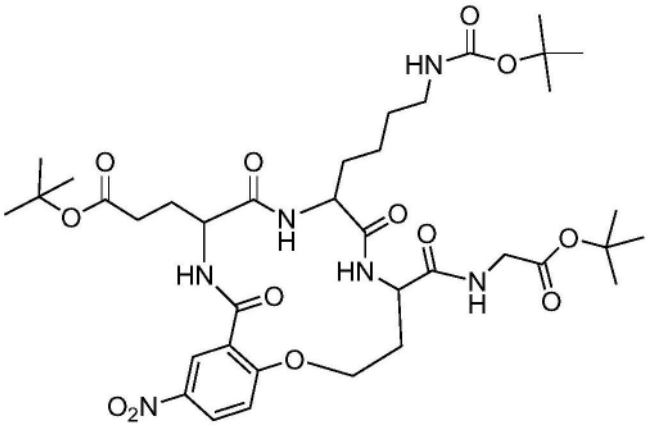
(4a)

(b)选择性脱保护式(4a)化合物以形成式(3a)的部分保护的线性模拟肽化合物；



(3a)

(c)通过分子内芳族亲核取代反应使式(3a)的部分保护的线性模拟肽化合物环化以形成式(2a)的化合物；



(2a)

(d)将式(2a)化合物中的氨基酸侧链保护基脱保护以得到D3的HCl盐；和

(e)使D3的HCl盐结晶以获得结晶形式的D3的HCl盐。

21.如权利要求20所述的方法，进一步包括通过将式(2a)化合物悬浮于HCl溶液和乙腈的混合物中使所述式(2a)化合物脱保护的步骤。

β-转角环状模拟肽盐的溶液相合成和结晶

本申请是申请号为201680040450.0,申请日为2016年7月8日,申请人为米梅奥亨制药公司,发明创造名称为“β-转角环状模拟肽盐的溶液相合成和结晶”的发明专利申请的分案申请。

交叉引用

[0001] 本申请要求于2015年7月9日提交的美国临时专利申请No.62/190,596的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及制备β-转角环状模拟肽盐的结晶形式的方法。

背景技术

[0003] 考虑到β-转角环状模拟肽盐化合物类中一些化合物的有前景的药理学活性,需要开发一种新的合成方法学,其允许进行可放大的生产和/或有成本效益的生产。

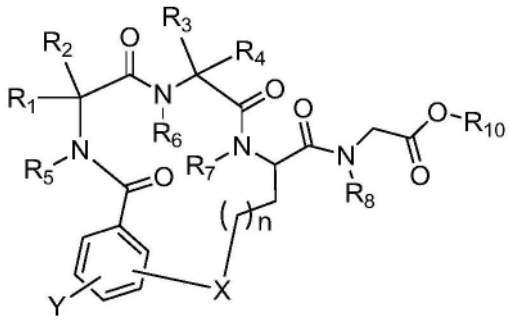
[0004] 因此,本发明的一个方面是提供制备β-转角环状模拟肽化合物的新的合成方法。本发明的另一方面是提供生产这些化合物的商业上可行的方法。

[0005] 开发使β-转角环状模拟肽盐结晶或沉淀的方法以提供改进的纯化这些盐的方法将是有利的。此外,β-转角环状模拟肽盐的结晶形式或高度纯化的沉淀形式可用于配制药物组合物。因此,需要产生结晶的或沉淀的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的方法。

发明内容

[0006] 在各种实施方案中,本发明提供了用于β-转角环状模拟肽盐的合成方法。在图1所示的实施方式中说明了合成方法(方案1)。

[0007] 本公开的某些实施方案提供了制备式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的结晶盐的方法,



(I)

其中:

R_1是氢、C_1-C_6烷基、芳基或天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基;

R_3是氢、C_1-C_6烷基、芳基或天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基;

R_2和R_4独立地为氢或C_1-C_6烷基,或者R_1和R_2与它们所连接的碳原子一起形成环丙

基、环丁基、环戊基或环己基，或者R_1和R_2、R_3和R_4与它们所连接的碳原子一起形成环丙基、环丁基、环戊基或环己基；

Y选自氢、$-NO_2$、$-COOR_{14}$、$-OC(R_{14})_3$、$-SO_3R_{14}$和$-SO_2R_{14}$；

R_5、R_6、R_7、R_8和R_9独立地为氢或C_1-C_6烷基；

R_{10}是氢、甲基、叔丁基或保护基；和

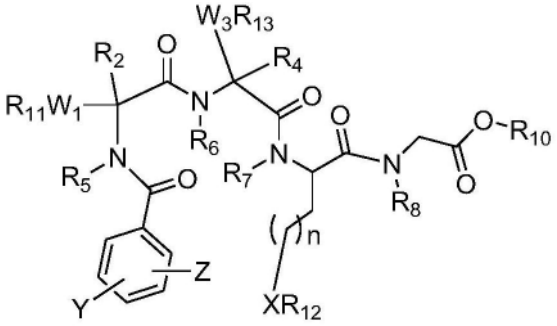
每个R_{14}是氢、烷基或芳基；

X选自O、NR_9、S、P、Se、C_1-C_6亚烷基、SO、SO_2和NH；

n是0、1、2、3、4或5；

该方法包括以下步骤：

(a)提供式(IV)的受保护的线性模拟肽化合物



(IV);

其中：

R_2、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8和R_{10}具有以上定义的含义；

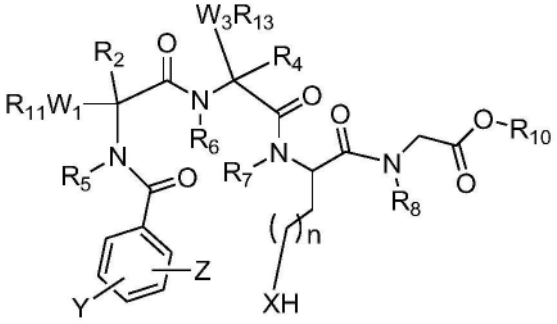
R_{11}和R_{13}独立地为氢或保护基；

R_{12}是保护基；

W_1和W_3独立地是天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基，分别在与R_{11}和R_{13}的连接点处少一个氢原子；和

Z选自F、Cl、Br和I；

(b)选择性地将式(IV)化合物脱保护以形成式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物



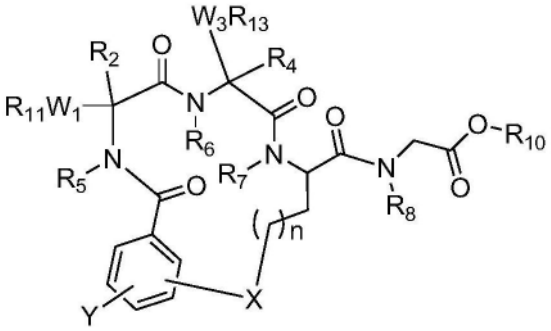
(III)

其中：

R_2、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、R_{11}、R_{13}、W_1、W_3、X、Y、Z和n具有上述定义的含义；

(c)通过分子内芳族亲核取代反应使式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物环

化以形成式(II)的化合物



(II)

其中：

R_2、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{10}、R_{11}、R_{13}、W_1、W_3、X、Y、Z和n具有上述定义的含义；

(d)将式(II)化合物中的氨基酸侧链保护基脱保护，得到式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐；和

(e)使式(I)的β-转角环状模拟肽化合物结晶以获得式(I)的结晶盐。

[0008] 在某些实施方案中，本公开提供了式D3的β-转角环状模拟肽化合物的结晶HCl盐及其制备方法。

附图说明

[0009] 作为示例，附图通常以非限制的方式说明本文中讨论的各种实施方式。

[0010] 图1是根据本公开内容的实施方案制备式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐的结晶形式的合成方法的一般示意图。

[0011] 图2是根据本公开内容的实施方案制备结构式D3的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的结晶形式的示例性反应方案。

[0012] 图3显示了说明D3晶体从在凝胶中呈现的不规则形状到在酸性溶液中呈现的针状晶体的晶体转化的显微镜图像。

[0013] 图4是显示在结晶过程中在不同时间用各种浓度的HCl处理后，根据本公开的实施方案制备的式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐的含量的柱状图。

[0014] 图5是显示根据本公开的实施方式的在结晶步骤期间随时间推移产生的杂质的含量的图。

[0015] 图6是显示根据本公开实施方式的在结晶步骤期间随时间推移产生的另一种杂质的含量的图。

[0016] 图7是显示根据本公开的实施方式的在结晶步骤期间随时间推移产生的又一种杂质的含量的图。

[0017] 图8是根据本公开的实施例的用于结晶步骤的温度循环概况图。

[0018] 图9显示了说明D3 HCl盐晶体从在凝胶中呈现的不规则形状到在酸性溶液中呈现的针状晶体的外观的显微镜图像。

[0019] 图10显示了说明干燥后D3 HCl盐晶体从晶形V转变成晶形IV的晶体转化的显微镜图像。

[0020] 图11是对在0.1M HCl溶液中的粗制D3 HCl盐浆液进行XRPD(X射线粉末衍射)分析的结果。

[0021] 图12是在0.001M HCl溶液中的粗制D3 HCl盐浆液的XRPD分析结果。

[0022] 图13a是在3周稳定性检查之后在0.1M HCl溶液中的粗制D3 HCl盐浆液的XRPD分析结果(顶部曲线)和参考D3 HCl盐晶形V的XRPD分析结果(底部曲线)。

[0023] 图13b是参考D3 HCl盐晶形V的XRPD分析结果。

[0024] 图14显示了根据本公开的实施方式的D3 HCl盐晶形IV的显微镜图像。

[0025] 图15是D3样品的无定形HCl盐的XRPD分析的结果。

[0026] 图16是D3的无定形HCl盐的差示扫描量热分析(DSC)。

[0027] 图17是D3的无定形HCl盐的热重分析(TGA)。

[0028] 图18是D3的无定形HCl盐的动态水分吸附分析(DVS),显示质量变化百分比-时间的函数关系和目标P/Po(即,设定点相对湿度)-时间的函数关系。

[0029] 图19是D3的无定形HCl盐的动态水分吸附(DVS)等温线图,其显示质量相对于目标P/Po(即,设定点相对湿度)的变化。

[0030] 图20是来自DVS分析的D3材料的无定形HCl盐的热重分析(TGA)。

[0031] 图21是DVS之前和之后D3样品的无定形HCl盐的XRPD分析的结果。

[0032] 图22是在与存在于干燥器中的水蒸气平衡之后,D3的无定形HCl盐的热重分析(TGA)。

[0033] 图23是在与水蒸气平衡之后D3的无定形HCl盐的XRPD分析。

具体实施方式

[0034] 如本文所使用的,术语“一种”或“一个”在专利文件中被常用于包括一个或多于一个,独立于“至少一个”或“一或多个”的任何其它实例或用法。

[0035] 如本文所使用的,术语“约”是指大致、几乎、将近或接近等于或者等于所述量的量。

[0036] 如本文所使用的,术语“粗制的”是指纯度小于90%的化合物或其盐。

[0037] β-转角环状模拟肽化合物或其盐的纯度通过“百分比纯度”来表示。纯度的测定不是结晶制备物(crystalline preparation)的结晶度的测定。可以通过包括核磁共振(NMR)、气相色谱/质谱(GC/MS)、液相色谱/质谱(LC/MS)或高压液相色谱(HPLC)在内的任何手段来测量纯度。

[0038] “晶体”是指β-转角环状模拟肽化合物或其盐的一种或多种晶体。晶体的测定可以通过包括光学显微镜,电子显微镜,X射线粉末衍射,固态核磁共振(SSNMR)或偏振显微镜在内的任何手段来确定。可以使用显微镜来确定晶体的长度,直径,宽度,大小和形状,以及晶体是作为单个颗粒存在的还是多晶的。

[0039] “结晶的”或“结晶形式”是指包含晶体的化合物。在本实施方案中,β-转角环状模拟肽化合物或其盐的结晶或结晶形式包含β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。在一个实施方案中,结晶的β-转角环状模拟肽化合物或其盐可以包含一定量的无定形β-转角环状模拟肽化合物或其盐。在一个实施方案中,结晶的β-转角环状模拟肽化合物或其盐包含超过50wt%的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。在另一个实施方案中,结晶的β-转角

环状模拟肽化合物或其盐包含超过60wt％、70wt％、80wt％、90wt％或95wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。结晶的β-转角环状模拟肽化合物或其盐可以包含50-60wt％、60-70wt％、70-80wt％、80-90wt％或90-95wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。在另一个实施方案中，β-转角环状模拟肽化合物或其盐的结晶包含超过95wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体，例如至少96wt％、97wt％、98wt％或99wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体，或100wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。

[0040] β-转角环状模拟肽化合物或其盐的“无定形”形式是指β-转角环状模拟肽化合物或其盐制备物(preparation)，其包含极少或不含β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。在一个实施方案中，无定形β-转角环状模拟肽化合物或其盐包含少于20wt％、10wt％、5wt％或1wt％的β-转角环状模拟肽化合物或其盐的晶体。

[0041] 如本文所使用的，术语“盐”是指可充当沉淀剂的离子化合物。

[0042] 如本文所使用的，术语“药学上可接受的盐”是指与选自无机酸(如盐酸、氢溴酸)或有机酸(如苯磺酸、马来酸、草酸、富马酸、琥珀酸、对甲苯磺酸和苹果酸)的合适的酸形成的酸加成盐。

[0043] 如本文所使用的，术语“非天然氨基酸”是指不是如上所述的天然氨基酸的所有氨基酸。这样的氨基酸包括上述19种光学活性和甘氨酸天然存在的氨基酸中的任何一种的D-异构体。非天然氨基酸还包括高丝氨酸、高半胱氨酸、瓜氨酸、2,3-二氨基丙酸、羟脯氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸和甲状腺素。另外的非天然氨基酸是本领域普通技术人员所熟知的。非天然氨基酸可以是D-或L-异构体。非天然氨基酸也可以是α氨基酸，β氨基酸或γ氨基酸。非天然氨基酸也可以是翻译后修饰的氨基酸，例如磷酸化的丝氨酸、磷酸化的苏氨酸或磷酸化的酪氨酸，酰化的赖氨酸或烷基化的赖氨酸或烷基化的精氨酸。翻译后修饰的氨基酸的许多形式是已知的。

[0044] 如本文所使用的，术语“保护基”是指特定官能部分(例如O、S或N)被暂时封闭，使得反应可以选择性地在多官能化合物中的另一个反应部位进行。

[0045] 如本文所使用的，术语“质子性溶剂”是指携带连接到如在羟基中的氧上的或者如在氨基中的氮上的氢的溶剂。这种溶剂可以提供H+(质子)。质子性溶剂的实例包括水、乙醇、叔丁醇和二乙胺。

[0046] 如本文所使用的，术语“非质子性溶剂”是指携带少量或不携带连接到如在羟基中的氧上的或者如在氨基中的氮上的氢的溶剂。

[0047] 如本文所使用的，术语“环”是指其原子在结构通式中排列成环状形式的化合物。

[0048] 如本文所使用的，术语“烷基”是指可以是直链、环状、支链或其组合的具有指定碳原子数(即，C_1-C_6意指1至6个碳原子)的烃基。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、戊基、异戊基、己基、辛基、壬基等。如本文所定义，烷基可以任选被取代。本文使用的术语“亚烷基”是指在两个或更多个位置连接的衍生自直链或支链饱和烃的饱和脂肪族基团，例如亚甲基(-CH_2-)。

[0049] 如本文所使用的，术语“烯丙基”是指含有烯丙基的化合物(即CH_2=CH-CH_2-)。

[0050] 如本文所使用的，术语“芳基”是指含有一个、两个或三个环的碳环芳族体系，其中这样的环可以以悬垂方式连接在一起或可以稠合。术语“芳基”包括芳族基团，例如苄基、苯基、萘基、蒽基、菲基、茚满基、茚基、轮烯基(annulenyl)、薁基(azulenyl)、四氢萘基和联苯

基。如本文所定义，芳基可以任选被取代。术语“亚芳基”表示通过夺取氢原子衍生自芳基(例如如上定义)的任何二价基团。

[0051] 当基团被定义为“无”时，这意味着该基团不存在。

[0052] 当基团被取代时，取代基可以包括但不限于一个或多个取代基，其独立地选自单独或组合的以下基团或特定的一组指定的基团：低级烷基，低级烯基，低级炔基，低级烷酰基，低级杂烷基，低级杂环烷基，低级卤代烷基，低级卤代链烯基，低级卤代炔基，低级全卤代烷基，低级全卤代烷氧基，低级环烷基，苯基，芳基，芳氧基，低级烷氧基，低级卤代烷氧基，氧代，低级酰氧基，羰基，羧基，低级烷基羰基，氰基，氢，卤素，羟基，氨基(amino)，低级烷基氨基，芳基氨基，氨基(amido)，硝基，巯基，低级烷硫基，芳硫基，低级烷基亚磺酰，低级烷基磺酰基，芳基亚磺酰基，芳基磺酰基，芳硫基，磺酸酯，磺酸，三取代甲硅烷基，N_3，SH，SCH_3，$C(O)CH_3$，吡啶基，噻吩，呋喃基，低级氨基甲酸酯和低级脲。

[0053] 为了清楚和帮助理解本发明，如本文所公开和要求保护的，以下术语和缩写定义如下：

[0054] AcOH—乙酸

[0055] BAEA—二氨基乙胺(二亚乙基三胺)

[0056] Boc—叔丁氧羰基

[0057] tBu—叔丁基

[0058] Cbz—苄氧羰基

[0059] CTC—氯三苯甲基氯

[0060] DBU—1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯

[0061] DCM—二氯甲烷

[0062] DIC—1,3-二异丙基碳二亚胺

[0063] DIPEA—N,N-二异丙基乙胺

[0064] DIPE—二异丙基醚

[0065] DMF—二甲基甲酰胺

[0066] EDC—N-乙基-N’-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺

[0067] EtOAc—乙酸乙酯

[0068] Fmoc—9-芴基甲氧基羰基

[0069] FNBA—2-氟-5-硝基-苯甲酸

[0070] Glu—谷氨酸

[0071] Gly—甘氨酸

[0072] HBTU—O-苯并三唑-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓六氟磷酸盐

[0073] HSer—高丝氨酸

[0074] HMPB-MBHA—4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸MBHA，或4-(4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基)-丁酰基-对甲基-二苯甲胺

[0075] HOBt—N-羟基苯并三唑

[0076] LPPS—液相肽合成

[0077] Lys—赖氨酸

[0078] MeCN—乙腈

[0079] MeTHF-2-甲基四氢呋喃

[0080] MTBE—甲基-叔丁基醚

[0081] Mtt—甲基三苯甲基

[0082] Pbf—五甲基二氢苯并呋喃磺酰基

[0083] SPPS—固相肽合成

[0084] TBAF—四丁基氟化铵

[0085] TBDMS—叔丁基二甲基硅烷

[0086] tBu—叔丁酯

[0087] TFA—三氟乙酸

[0088] THF—四氢呋喃

[0089] TIS—三异丙基硅烷

[0090] TMG—四甲基胍

[0091] Trt—三苯甲基

[0092] 图1显示方案1,其描绘制备式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐的结晶形式的一般路线,所述路线包括以下步骤:(a)提供式(IV)的受保护的线性模拟肽化合物;(b)将式(IV)化合物选择性地脱保护以形成式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物;和(c)通过分子内芳香族亲核取代反应使式(III)的部分保护的线性模拟肽化合物环化形成式(II)的化合物;(d)使式(II)化合物中的氨基酸侧链保护基脱保护,得到式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐;和(e)使式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的盐结晶,得到结晶形式的式(I)化合物。

[0093] 在某些实施方案中,本发明提供制备具有14至16个环原子的大环的式(I)的结晶的β-转角环状模拟肽盐的方法。

[0094] 在某些实施方案中,该方法提供了其中R_1和R_3是氨基酸侧链取代基的化合物。通常,R_1和R_3独立地衍生自天然或非天然氨基酸。例如,R_1和R_3可以独立地衍生自任何对映体构型的二十种天然存在的蛋白质氨基酸(天然的)或修饰的氨基酸(非天然的)。二十种天然氨基酸是包括甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、半胱氨酸(Cys)和甲硫氨酸(Met)的α-氨基酸。α-氨基酸的一般结构由通式A:$H_2NCH(R^*)COOH$表示。R*表示氨基酸的侧链取代基,其指在本公开中的R_1或R_3。

[0095] 非天然氨基酸通常是具有式A的任何结构,其中R*基团是除了在二十种天然氨基酸中使用的任何取代基之外的任何取代基。参见例如Biochemistry,L.Stryer,31(1ed.1988),Freeman and Company,New York,的二十种天然氨基酸的结构。非天然氨基酸也可以是除上述二十种α-氨基酸以外的天然存在的化合物。

[0096] 这样的非天然氨基酸包括上述19种光学活性和甘氨酸天然存在的氨基酸中的任何一种的D-异构体。非天然氨基酸还包括高丝氨酸、高半胱氨酸、2,3-二氨基丙酸、瓜氨酸、羟脯氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸和甲状腺素。另外的非天然氨基酸是本领域普通技术人员所熟知的。非天然氨基酸可以是D-或L-异构体。非天然氨基酸也可以是具有式B:$H_2N(CH)_n(R^*)COOH$的β氨基酸或γ氨基酸,其中n等于2或3且R*表示二十种蛋白氨基酸任一种的侧链取代

基或除在二十种天然氨基酸中所用的任何取代基以外的任何取代基。非天然氨基酸也可以是翻译后修饰的氨基酸，例如磷酸化的丝氨酸、磷酸化的苏氨酸或磷酸化的酪氨酸、酰化的赖氨酸或烷基化的赖氨酸或烷基化的精氨酸。翻译后修饰的氨基酸的许多形式是已知的。

[0097] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中R_1和R_3独立地为两个不同氨基酸的侧链取代基的化合物。在某些这样的实施方案中，R_1和R_3独立地是赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺、精氨酸或苏氨酸的侧链取代基。在某些实施方案中，R_1和R_3独立地为谷氨酸、赖氨酸、异亮氨酸或精氨酸的侧链取代基。在一个实施方案中，R_1和R_3独立地为谷氨酸或赖氨酸的侧链取代基。在另一个实施方案中，R_1和R_3独立地为异亮氨酸或精氨酸的侧链取代基。

[0098] 通常，在本发明的制备β-转角环状模拟肽化合物的方法中的环化步骤之前，氨基酸侧链取代基(R_1和R_3)分别被合适的保护基团(R_{11}和R_{13})保护。当氨基酸侧链取代基(R_1和R_3)被保护时，它们分别表示为W_1R_{11}和W_3R_{33}，其中W_1和W_3独立地是天然或非天然氨基酸的氨基酸侧链取代基，分别在与R_{11}和R_{13}的连接点处少一个氢原子。所述一个氢原子通常存在于氨基酸侧链取代基的官能团，例如羧酸、胺、巯基、酰胺、羟基和胍中。

[0099] 参与本公开所述的方法的任何步骤的合成的任何分子的任何其它敏感反应基团的氨基酸侧链保护可以通过常规保护基团实现，常规保护基团例如由T.W.Greene&P.G.M.Wuts(Protective Groups In Organic Synthesis 1991,John Wiley and Sons,New-York)；和由Sewald和Jakubke(Peptides:chemistry and Biology,2002,Wiley-VCH,Wheinheim p.142)所描述的那些。例如，α氨基保护基包括但不限于酰基型保护基(例如三氟乙酰基、甲酰基、乙酰基)，脂族氨基甲酸酯保护基(例如叔丁氧羰基(Boc)、环己氧羰基)，芳族氨基甲酸酯型保护基(例如芴基-9-甲氧基-羰基(Fmoc)、苄氧基羰基(Cbz)、Cbz衍生物)和烷基型保护基团(例如三苯基甲基、苄基)。

[0100] 氨基酸侧链保护基团可以包括用于丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的叔丁基醚；用于赖氨酸、色氨酸和组氨酸的Boc；用于丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸和组氨酸的三苯甲基；用于天冬氨酸和谷氨酸的叔丁基或烯丙基酯，用于精氨酸的Pbf；用于苏氨酸和丝氨酸的苄基；用于酪氨酸、苏氨酸、丝氨酸、精氨酸和赖氨酸的Cbz；用于丝氨酸和苏氨酸的烷基硅烷；和本领域已知的所有其它保护基团。

[0101] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中R_{11}和R_{13}独立地选自以下的化合物：三氟乙酰基、甲酰基、乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、环己基氧基羰基、芴基-9-甲氧基-羰基(Fmoc)、苄氧基羰基(Cbz)、Cbz衍生物、三苯基、甲基、苄基、烯丙氧基羰基、叔丁基、烷基硅烷和烯丙基。

[0102] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中R_1是谷氨酸的侧链取代基且R_{11}是烯丙基或叔丁基的化合物。在某些这样的实施方案中，R_1是谷氨酸的侧链取代基，并且R_{11}是叔丁基。

[0103] 在某些实施方案中，所述方法提供其中R_3是赖氨酸的侧链取代基且R_{13}是苄氧基羰基、烯丙氧基羰基或叔丁氧基羰基(BOC)的化合物。在某些这样的实施方案中，R_3是赖氨酸的侧链取代基并且R_{13}是叔丁氧基羰基(BOC)。

[0104] 可以使用本领域已知的方法在合宜的后续阶段脱除保护基团。在某些实施方案中，氨基酸侧链R_1和R_3的保护基团在用于从固体载体切割所述模拟肽化合物的相同条件下

不被去除。在某些这样的实施方案中，氨基酸侧链R_1和R_3的保护基团在用于从固体载体切割所述模拟肽化合物的相同酸性条件下不被去除。

[0105] 在某些实施方案中，所述方法提供其中R_2和R_4独立地为氢或C_1-C_6烷基的化合物。

[0106] 在某些实施方案中，该方法提供了其中R_5、R_6和R_7是氢的化合物。

[0107] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中W_1和W_3独立地为两个不同氨基酸的侧链取代基，在官能团上少一个氢原子的化合物。在某些实施方案中，W_1和W_3独立地为赖氨酸、谷氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺、精氨酸或苏氨酸的侧链取代基，在官能团上少一个氢原子。在某些实施方案中，W_1和W_3独立地为谷氨酸或赖氨酸的侧链取代基。在某些实施方案中，W_1和W_3独立地为异亮氨酸或精氨酸的侧链取代基。在某些实施方案中，W_1是谷氨酸的侧链取代基，在官能团上少一个氢原子，且R_{11}是烯丙基或叔丁基。在某些实施方案中，W_3是赖氨酸的侧链取代基并且R_{13}是苄氧羰基、烯丙氧羰基或叔丁氧羰基(BOC)。

[0108] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中Y连接至所述通式的苯环上相对于酰胺基团的连接点的间位处的化合物。在某些实施方案中，Y是-NO_2。

[0109] 在某些实施方案中，所述方法提供了其中Z连接至所述通式的苯环上相对于酰胺基团的连接点的邻位处的化合物。在某些实施方案中，Z是F。

[0110] 在某些实施方案中，该方法提供了其中n是1的化合物。

[0111] 在某些实施方案中，末端官能团X可以被保护(即，当R_{12}是保护基时)。在某些实施方案中，当X是O时，R_{12}是三苯甲基(Trt)、叔丁基二甲基硅烷(TBDMS)或可以在不引起在通式中存在的其它保护基脱保护的条件(例如温和的酸性条件)下被去除的任何保护基。在某些这样的实施方案中，当X是O时，R_{12}是三苯甲基(Trt)或叔丁基二甲基硅烷(TBDMS)时。在某些实施方案中，X是S且R_{12}是三苯甲基。在某些实施方案中，X是NH且R_{12}是4-甲基三苯甲基(Mtt)。

[0112] 部分脱保护

[0113] 可以通过用温和的酸性溶液(例如含有约0.01％至约50％(v/v)、0.1％至10％(v/v)、0.5％至5％(v/v)或2％至5％(v/v)的酸(如三氟乙酸(TFA))的溶液)或乙酸(例如50％-95％或60％-90％(v/v))处理所述式(IV)的保护的线性模拟肽化合物，去除保护基R_{12}。官能性氨基酸侧链使用更稳定的保护基团进行保护，所述保护基团在这种温和的酸性条件下不被切割或脱保护。这种官能性氨基酸侧链可以通过官能团上的强酸不稳定保护基来保护。本文描述了在官能性氨基酸侧链上使用的保护基。因此，保护基团R_{12}的脱除不会引起式(IV)中存在的任何保护的官能团R_{11}和R_{13}的显著脱保护。

[0114] 保护基R_{12}的去除可以在不同的溶剂体系中进行。溶剂体系是有机溶剂或有机溶剂的混合物。溶剂体系可以包含极性非质子性溶剂，例如二氯甲烷、乙腈或四氢呋喃及其混合物。

[0115] 清除剂可以加入到温和的酸性溶液中以防止由反应过程中形成的烷基-碳正离子对X基团的烷基化。合适的清除剂包括但不限于三异丙基硅烷(TIS)，茴香硫醚，三烷基硅烷(例如三甲基硅烷、三乙基硅烷)或其混合物。在一个实施方案中，清除剂是三异丙基硅烷(TIS)。

[0116] 在某些实施方案中，温和的酸性溶液含有少于10％、5％或3％的酸和清除剂的混合物。用于脱除保护基团R_{12}的温和酸性溶液中酸性物质与清除剂的相对体积比可以为约1：

1至约1:5,约1:1至约1:3,或约1:2。在一个实施方案中,保护基团R_{12}的去除在包含小于10%的TFA和TIS(体积比为约1:1至约1:5)的混合物的溶液中进行。

[0117] 环化反应

[0118] 环化反应可以通过亲核试剂X经由芳香族亲核取代反应来进行。

[0119] 环化反应可以在极性非质子性溶剂(如乙腈、四氢呋喃(THF)、二氧六环或其混合物)中进行。在一个实施方案中,环化反应在THF中进行。应避免显著量的溶剂(如水和甲醇),因为它们可以作为亲核试剂并干扰环化。在一个实施方案中,环化反应在少于约0.5%的水中进行,或在没有水的情况下进行。在一个实施方案中,环化反应在少于约0.5%的甲醇中进行,或在不存在甲醇的情况下进行。在一个实施方案中,环化反应在少于约0.5%的水和少于约0.5%的甲醇中进行。

[0120] 在某些实施方案中,环化反应是碱催化的环化反应。环化反应中碱的作用是增加官能团X的亲核性。可以使用的碱的实例是t-BuOK、$CsCO_3$、K_2CO_3或其混合物。

[0121] 环化步骤的一个重要方面是在反应过程中控制部分保护的线性模拟肽中间体(III)的浓度以避免形成二聚副产物。当环化反应在较高浓度(例如大于0.05M)的部分受保护的线性模拟肽中间体(III)下进行时,分子间反应速率增加,因此加速了二聚副产物形成的速率。因此,为了避免形成二聚体,环化反应可以以低于0.05M的浓度,特别是在低于0.03M的浓度或低于0.02M的浓度进行。这样的低浓度(即高度稀释)可以是通过使用大量的溶剂实现。或者,环化反应可以通过将部分保护的线性模拟肽中间体(III)缓慢加入到反应介质中来进行,这可以避免使用大量的溶剂。

[0122] 环化反应可以在-20℃至15℃、-10℃至5℃或-8℃至-1℃的温度下进行。根据环大小、反应中所涉及的亲核试剂、碱和溶剂,室温下的反应时间可以在5分钟至5小时之间变化。在某些实施方案中,室温下的环化反应时间为约5分钟至约1小时,约5分钟至约30分钟或约15分钟至约20分钟。

[0123] 因为部分保护的线性模拟肽中间体(III)和式(I)的β-转角环状模拟肽化合物具有不同的保留时间、质量和UV分布,可通过分析型HPLC、LC-MS或UV监测反应。

[0124] 一旦环化完成,可将酸溶液加入到反应混合物中以中和反应混合物。合适的酸包括HCl、$KHSO_4$、AcOH。例如,可以使用酸的水溶液。酸溶液的浓度可以在约0.1M到约1M之间变化或在约0.05N到约0.2N之间变化。随后,可以例如通过蒸发除去有机溶剂,以获得粗制残余物浆液。

[0125] 或者,可将粗制残余物浆液过滤以收集粗品。残余物或过滤器可以用溶剂(例如DIPE或其混合物)洗涤。

[0126] 粗产物可以在40℃在EtOAc中浆化30-40分钟,冷却至0℃,并过滤以收集产物。

[0127] 脱保护

[0128] 为了氨基酸侧链保护基的最终脱保护,根据所述通式中存在的保护基的类型,用合适的试剂处理式(IV)的经保护的β-转角环状模拟肽化合物。在某些实施方案中,使用酸性溶液。在一些实施方案中,酸性溶液包含浓度为10%至60%、20%至50%或30%至40%的HCl溶液。HCl可溶于水或有机溶剂(如乙腈)中。在一个实施方案中,酸性溶液包括浓HCl溶液(例如30-40%)和乙腈。

[0129] 最终的脱保护可以在约5℃至约25℃、约10℃至约20℃或约12℃至约17℃的温度

下进行。在某些实施方案中，式(IV)的受保护的β-转角环状模拟肽化合物可以在约5℃至约25℃、约10℃至约20℃或约12℃至约17℃(例如在约15℃)的温度下悬浮于酸性溶液中。

[0130] 结晶

[0131] 在某些实施方案中，式(I)的β-转角环状模拟肽化合物可以通过碱化-酸化方法结晶或沉淀。碱化-酸化方法包括以下步骤：使式(I)的化合物或盐与在水中的具有碱性pH的碱性溶液接触，降低pH以获得酸性pH，以沉淀或结晶所述式(I)的化合物或盐。

[0132] 式(I)化合物可以用含有无机碱(如NaOH，LiOH，KOH，$Mg(OH)_2$或其混合物)的碱性水溶液处理。碱性溶液可被加热至约30℃至约70℃、或约40℃至约60℃的温度。碱性溶液的浓度可以为约0.1M至约5M，约1M至约3M或约1.5M至约2M。通常，可使用相对于粗制最终产物(即，式(I))的约2至约8当量、约3至约7当量、或约3至约5当量的无机碱。碱性pH可以为约9至约12，约9至约11，约8至约12。

[0133] 该方法还可以包括在降低碱性溶液的pH之前过滤含有式(I)化合物的碱性溶液的步骤。过滤的目的是去除任何不溶物质。过滤可以在高于室温(例如约40℃至约70℃，或约45℃至约60℃)的温度下进行。

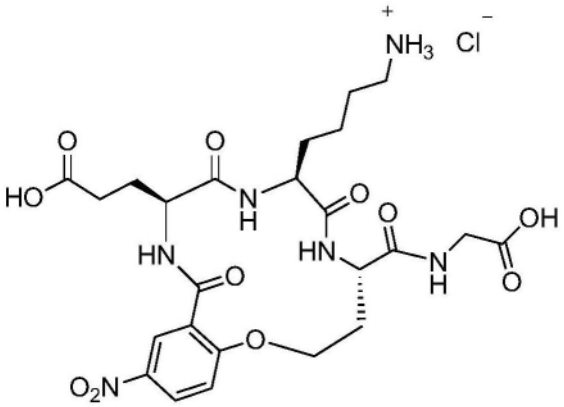
[0134] 可通过将碱性溶液与酸混合来酸化所述滤液或碱性溶液混合物，以获得约0至约4、约0至约3或约0至约2的酸性pH值。无机酸可用于酸化碱性溶液。无机酸的实例包括但不限于HCl、HBr、硝酸、硫酸、磷酸或其混合物。通常可以使用相对于式(I)的粗制最终产物约3至约9当量、约4至约8当量或约5至约7当量的酸。

[0135] 式(V)的盐的晶体可以从所述酸化的溶液中形成或沉淀。酸性pH可以促进凝胶的形成，随后转变成含有晶体的浆液/浑浊溶液。酸过少可能会减缓从凝胶到浆液的转变。通常，可以使用相对于粗制最终产物(即式(I))约3至7当量、约4至6当量或约5当量的酸。在某些实施方案中，需要相对于碱过量至少2当量的酸来促进式(IV)化合物的结晶。一旦形成针状晶体(形式V)，它们在浆液中稳定并且可以在室温下储存至少3周。

[0136] 为了促进晶体的生长或沉淀并形成最少量的杂质，可将所述酸化溶液搅拌或搅动一段时间和/或保持在约0℃至约60℃的温度下。在结晶过程中，可以从所述酸化的溶液中取样并通过显微镜检查监测晶体或沉淀的形成，并且可以用分光光度法(例如HPLC)跟踪产率。为了在晶体形成过程中避免形成杂质并促进晶体生长或沉淀，可以在结晶过程中使用温度分布(temperature profile)。也就是说，所述酸化溶液可以在一个或多个温度范围内各自搅拌一段特定的时间。例如，所述一个或多个温度可以包括第一温度，第二温度，第三温度等，并且每个温度可以独立地选自以下温度范围中任何一个：约0℃至约30℃，约0℃至约20℃，约0℃至约10℃，约10℃至约40℃，约10℃至约30℃，约10℃至约20℃，约20℃至约50℃，约20℃至约40℃，约20℃至约30℃，约30℃至约60℃，约30℃至约50℃，约30℃至约40℃，约40℃至约70℃，约40℃至约60℃，约40℃至约50℃，约50℃至约70℃，约50℃至约60℃等。所述酸化溶液可以在各温度范围内搅拌一段时间，并且每段时间可以独立地选自以下时间范围中的任一个：至少5分钟、10分钟、15分钟或60分钟，或持续1小时、2小时、3小时等等，最长1个月。在某些实施方案中，搅拌时间段可以是约5分钟至约20小时，约15分钟至约15小时，约30分钟至约10小时，约1小时至约5小时，约2小时至约4小时等。

[0137] 本公开的方法的产率可以是至少约30摩尔％，或约35至约45摩尔％。这些收率基于限制反应物的摩尔数，例如HSer化合物的摩尔数。

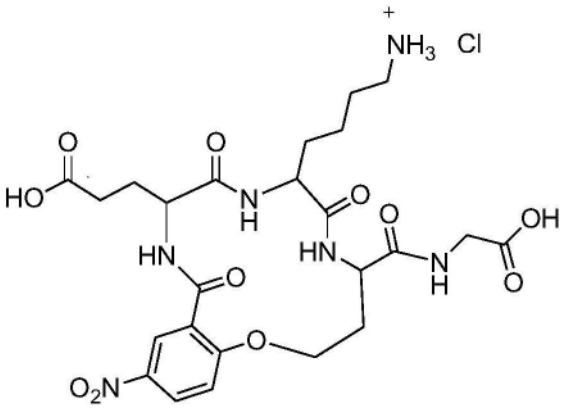
[0138] 在一个具体的方面，本公开提供了式D3的β-转角环状模拟肽化合物的结晶的HCl盐，(在本文中也简称为“D3”)及其制备方法。D3的HCl盐的结构如下所示：



D3 的 HCl 盐 。

[0139] 图2显示了示例性反应方案(方案2)，其描述了制备式D3的β-转角环状模拟肽化合物的结晶的HCl盐的路线。

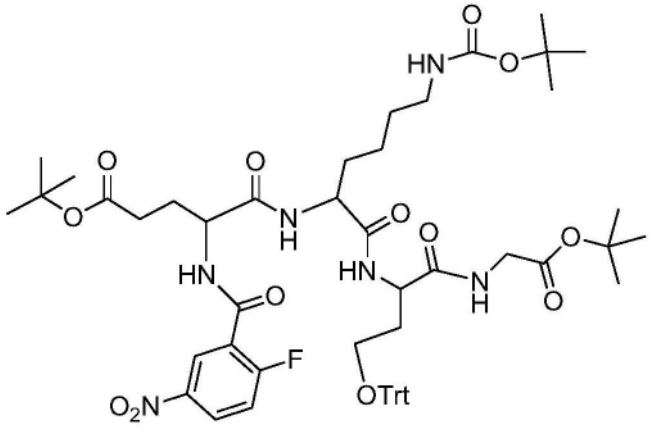
[0140] 在实施方案中，本公开提供了制备具有以下结构的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的结晶形式的方法：



D3 的 HCl 盐

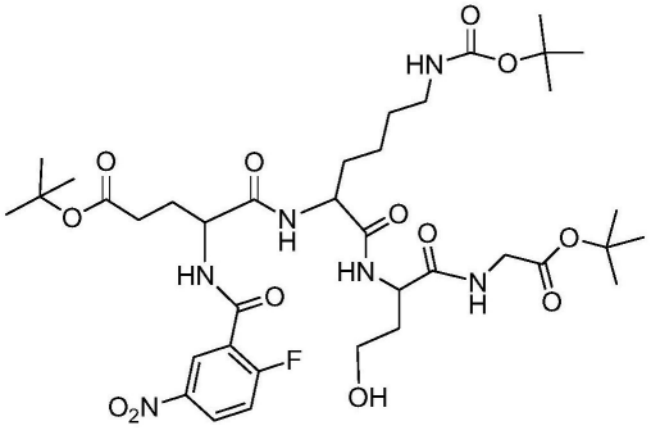
该方法包括以下步骤：

(a)提供式(4a)的受保护的线性模拟肽化合物；



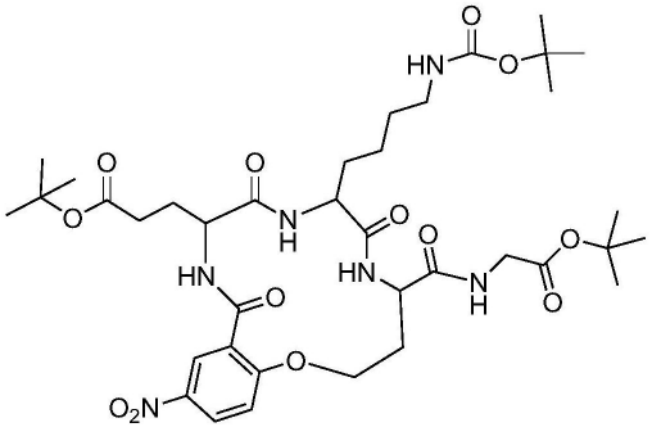
(4a)

(b)选择性脱保护式(4a)化合物以形成式(3a)的部分保护的线性模拟肽化合物；



(3a)

(c)通过分子内芳族亲核取代反应使式(3a)的部分保护的线性模拟肽化合物环化以形成式(2a)的化合物；



(2a)

(d)将式(II)化合物中的氨基酸侧链保护基脱保护，得到D3的HCl盐；和

(e)使D3的HCl盐结晶以获得结晶形式的D3的HCl盐。

[0141] 在实施方案中，式(4a)的受保护的线性模拟肽化合物可以从液相肽合成工艺获得，所述工艺包括将Fmoc-Hser(Trt)-OH与H-Gly-OtBu.HCl偶联从而形成二肽Fmoc-Hser(Trt)-Gly-OtBu的步骤。该工艺可进一步包括使二肽H-Hser(Trt)-Gly-OtBu与Fmoc-Lys(Boc)-OH偶联从而形成三肽Fmoc-Lys(Boc)-Hser(Trt)-Gly-OtBu的步骤。该工艺可以进一步包括使三肽H-Lys(Boc)-Hser(Trt)-Gly-OtBu与Fmoc＝Glu(Otbu)-OH偶联从而形成四肽Fmoc-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Hser(Trt)-Gly-OtBu的步骤。

[0142] 一个或多个偶联步骤可以在二异丙胺(DIPEA)和缩合试剂的存在下进行，缩合试剂为例如O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓-四氟硼酸盐(HATU)，1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)，O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲鎓-六氟磷酸盐(HBTU)，1-羟基苯并三唑(HOBt)，苯并三唑-1-基-氧基-三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyBOP)，1-羟基-7-氮杂苯并三唑，TBTU((苯并三唑基)四甲基脲鎓四氟硼酸盐)，TATU((7-氮杂苯并三唑基)四甲基脲鎓四氟硼酸盐)和COMU((1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亚

乙基氨基氧基)二甲基氨基-吗啉代-碳鎓六氟磷酸盐),Oxyma[2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯],K-Oxyma((2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯,钾盐)或其混合物。在一个实施方案中,缩合剂是EDC.HCl/HOBt。Fmoc-Hser(Trt)-OH与H-Gly-OtBu.HCl的偶联步骤可以在DIPEA和EDC.HCl/HOBt存在下进行。二肽H-Hser(Trt)-Gly-OtBu与Fmoc-Lys(Boc)-OH的偶联步骤可以在DIPEA和EDC.HCl/HOBt存在下进行。三肽H-Lys(Boc)-Hser(Trt)-Gly-OtBu与Fmoc-Glu(Otbu)-OH的偶联步骤可以在DIPEA和EDC.HCl/HOBt存在下进行。

[0143] 去除任何肽的N-末端Fmoc保护基的步骤可以在BAEA存在下进行以提供N-末端游离氨基。

[0144] 在某些实施方案中,本公开的结晶形式包含晶形IV、晶形V或其混合物。这些结晶形式可以通过本文所述的方法制备,并且基本上不含其它结晶形式(即,不同于晶形IV或晶形V的)。术语"基本上不含"是指10%或更少的量的另一种结晶形式,例如8%或更少的,5%或更少的,4%或更少的,3%或更少的,2%或更少的,1%或更少的,0.5%或更少的量的另一种结晶形式。通过X射线粉末衍射(XRPD),差示扫描量热仪(DSC)和热重量分析(TGA)的热数据,动态水分吸附分析(DVS)和/或重力蒸气吸附分析(GVS)来表征本公开的晶形。

[0145] 在一个实施方案中,本公开提供了式D3的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的晶形IV。在一个实施方案中,本公开提供式D3的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的晶形V。在一个实施方案中,本公开提供了结晶形式,其包含式D3的β-转角环状模拟肽化合物的HCl盐的晶形IV和晶形V的混合物。

[0146] 在某些实施方案中,晶形IV是吸湿性的。在某些实施方案中,晶形IV可在相对湿度(RH)为60%至100%时具有约10%至约30%的重量增加,其中重量增加是由于水含量的增加。在某些实施方案中,在所述结晶形式中水吸收或解吸的过程可以是可逆的。在某些实施方案中,晶形IV具有不规则形状。在某些实施方案中,晶形V是针状形式。

[0147] 当改变RH时,发生本公开的晶形(在晶形IV和晶形V之间)转变。例如,当暴露于高相对湿度(例如75%至100%,85%至100%或95%至100%RH)时,晶形IV可以转化为晶形V。当用酸性溶液例如盐酸水溶液处理时,晶形IV可以转化成晶形V,其中盐酸的浓度为约0.001M至约0.5M、约0.01M至约0.2M、约0.05M至约0.1M。当在非常稀(例如,浓度低于0.001M)的酸性溶液或纯水(即在不存在酸或碱的情况下)中处理时,晶形IV可以转化成晶形V和一些其它结晶形式的混合物。晶形V可以在干燥后转变回晶形IV。转化率可能取决于酸性溶液的浓度。通常,当用较高浓度的酸性溶液处理晶形V时,从晶形V转变为晶形IV的速率更快。

[0148] 在某些实施方案中,式D3的β-转角环状模拟肽化合物的结晶盐含有针状晶体。

[0149] 在某些实施方案中,式D3的β-转角环状模拟肽化合物的盐的结晶形式由含有至少60%的水的溶液获得。

[0150] 在某些实施方案中,式D3的β-转角环状模拟肽化合物的盐的结晶形式是水合物。

[0151] 在某些实施方案中,D3的HCl盐的结晶形式由在衍射角(°2θ)为6.7±0.2和9.1±0.2处具有特征峰的XRPD图表征。在一个实施方案中,D3的HCl盐的结晶形式由在衍射角(°2θ)为6.7±0.2、9.1±0.2、4.4±0.2、5.1±0.2和2.6±0.2处具有特征峰的XRPD图表征。

[0152] 在一个实施方案中,D3的HCl盐的结晶形式由XRPD图表征,所述XRPD图在选自以下的衍射角(°2θ)处具有两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、或五个或更多个特征

峰:6.7±0.2,9.1±0.2,4.4±0.2,5.1±0.2,2.6±0.2,11.5±0.2,15.3±0.2,16.6±0.2,17.7±0.2,18.2±0.2,20.2±0.2,21.6±0.2,22.1±0.2,22.5±0.2,23.2±0.2,24.1±0.2。

[0153] 在该方面的一个实施方案中,提供了具有基本上如图13b所示的粉末X射线衍射图的晶形。

实施例

[0154] 以下实施例仅仅是对本公开的说明,而不应被认为以任何方式限制本发明的范围,因为根据本公开内容和所附权利要求书,这些实施例和其他等同实施方式对于本领域技术人员而言将变得显而易见。除非另有说明,否则本申请中使用的所有百分数均为重量百分比(w/w)。

实施例1

[0155] 图2(方案2)说明了D3的HCl盐的合成,其是式(I)的β-转角环状模拟肽化合物的一个实施方案。

[0156] 化合物4a的合成可以通过标准的逐步LPPS(液相肽合成)程序来进行。参见例如L.A.Carpino et al.,Organic Process Research&Development 2003,7,28-37)。

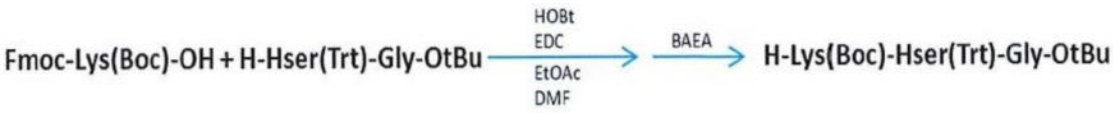
[0157] (a)二肽H-Hser(Trt)-Gly-OtBu的合成



[0158] 向包含有Fmoc-Hser(Trt)OH(37.5g),HCl xH-GlyOtBu(12g)和HOBt(10.8g)的容器中加入EtOAc(227ml)和DMF(45ml)。在5℃搅拌该混合物。加入DIPEA(12.5ml)和EDC×HCl(15g)。在20℃搅拌该混合物以完成转化(通常<2小时)。完成后,反应混合物用NaCl(23%,113ml)洗涤两次。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后没有部分有机层被丢弃。

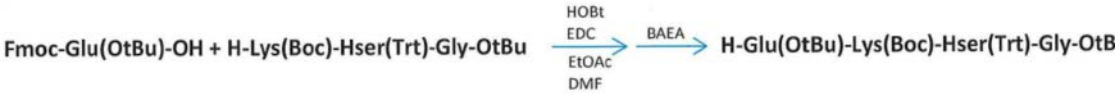
[0159] 向所述有机溶液中加入DMF(45ml)和BAEA(34.5ml)。将混合物在20℃下搅拌30分钟以完全除去Fmoc基团。完成后,将反应混合物用NaCl(23%,113ml)萃取一次,并用$NaHCO_3$(4.8%,113ml)萃取两次。所述有机溶液准备进行下一次偶联。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后有机层部分都没有被丢弃。

[0160] (b)三肽H-Lys(Boc)-Hser(Trt)-GlyOtBu的合成



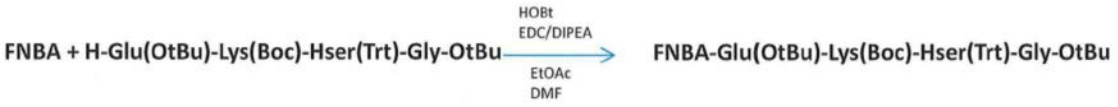
[0161] 含有所述二肽的有机溶液用DMF(227ml)稀释并在5℃下搅拌。向该溶液中加入Fmoc-Lys(Boc)OH(30g)、HOBt(10.8g)和EDC xHCl(15g)和EtOAc(45ml)。在20℃搅拌该混合物以完成转化(通常<1小时)。完成后,加入BAEA(34.5ml),搅拌混合物30分钟以完全除去Fmoc基团。完成后,将反应混合物用NaCl(23%,170ml)和水(150ml)的混合物洗涤一次,并用$NaHCO_3$(4.8%,113ml)洗涤两次。有机层用EtOAc(30ml)稀释,准备下一次偶联。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后没有部分有机层被丢弃。

[0162] (c)四肽H-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Hser(Trt)-GlyOtBu的合成



[0163] 含有所述三肽的有机溶液用DMF(227ml)稀释并在5℃下搅拌。向该溶液中加入Fmoc-Glu(OtBu)OH(28.5g)、HOBt(10.8g)和EDC x HCl(15g)。在20℃搅拌该混合物以完成转化(通常<2小时)。完成后,加入BAEA(34.5ml),搅拌混合物30分钟以完全除去Fmoc基团。完成后,反应混合物用NaCl(23%,113ml)和水(49ml)的混合物洗涤。有机溶液用DMF(169ml)和EtOAc(113ml)稀释,然后加热至40℃。该溶液在40℃下用NaCl(23%,113ml)和水(38ml)的混合物洗涤。相分离后,将有机层在40℃下用NaCl(23%,56ml)和水(56ml)的混合物洗涤。用$KHSO_4$(1M)将水层的pH值调节至pH 5-5.5(指示棒),并分离各相。有机溶液准备进行下一次偶联。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后有机层部分都没有被丢弃。

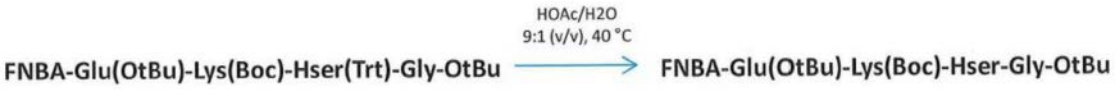
[0164] (d)合成四肽FNBA-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-HSer(Trt)-Gly-OtBu,化合物4a



[0165] 含有所述四肽的有机溶液用DMF(227ml)稀释并在5℃下搅拌。向该溶液中加入FNBA(14.3g)、EDC×HCl(15g)和DIPEA(13.4ml)。在20℃搅拌混合物以完成转化(通常<5小时)。完成后,将反应混合物与MeTHF(450ml)、NaCl(23%,113ml)和$NaHCO_3$(4.8%,113ml)一起搅拌。分层,将有机层加热至40℃,随后在该温度下用$NaHCO_3$(4.8%,226ml)洗涤,最后用水(226ml)洗涤。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后有机层部分都没有被丢弃。

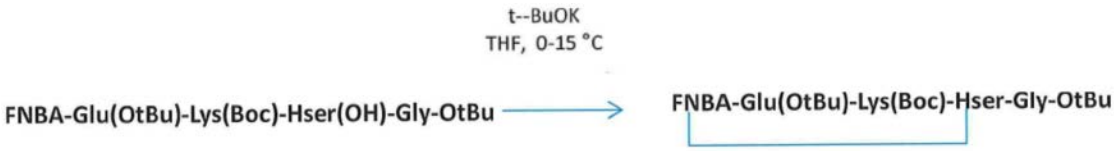
[0166] 将有机层在40℃下真空浓缩至约226ml。向残余物中加入MeTHF(226ml),然后重复浓缩至约226ml。向残余物中加入MeTHF(226ml)和MTBE(450ml),将浆液在20℃下搅拌5小时。在过滤器上收集固体产物并用MTBE(226ml)洗涤两次,在20℃下真空干燥。得到干燥的产物,化合物4a(55.6g),收率:85.5%,经测定校正。HPLC:90.6%,二苯并富烯(dibenzofulvene):9%。

[0167] (e)将化合物3a五肽(去三苯甲基化)部分脱保护



[0168] 将所述五肽(55.2g)以5-7份在40℃加入到乙酸(450ml)和水(50ml)的混合物中。加完后,将白色悬浮液搅拌7-9小时以完成转化(>98%)。完成后,将反应混合物冷却至20℃,然后用MTBE(552ml)、NaCl(23%,276ml)和水(110ml)的混合物萃取。有机层在20℃下用$KHSO_4$(1M,276ml)萃取两次,在40℃下用$NaHCO_3$(4.8%,276ml)萃取三次,用水(276ml)萃取一次。确保反应器中没有留下水相,并且在洗涤之后有机层部分都没有被丢弃。将有机层冷却至20℃并搅拌过夜以使产物沉淀。将庚烷(552ml)加入到浆液中,搅拌1小时(更多产物沉淀)。在过滤器上收集固体产物并用庚烷(2×276ml)洗涤两次,用DIPE(2×414ml)洗涤两次。在真空中干燥(52℃,4小时)之后,得到39.4g所期望的部分脱保护的线性肽,化合物3a,产率:93%,未经测定校正。

[0169] (f)环化



[0170] 将t-BuOK(8.13g)在THF(196ml)中的浆液添加到部分脱保护的线性肽(39.4g)在THF(1560ml)中的冷(-8至-1℃)溶液中。搅拌混合物15-20分钟(内部温度升至4℃)以获得完全转化。完成后,向反应混合物中加入HCl水溶液(0.1N,189ml)。在40℃下通过真空蒸发除去THF。残余物用水(200ml)稀释并搅拌约3分钟。在过滤器上收集固体粗产物,用水(2×200ml)洗涤两次,用DIPE(2×200ml)洗涤两次,并在45℃下真空干燥2小时。将干燥的粗产物(36.1g)悬浮于EtOAc(788ml)中。悬浮液在40℃搅拌约40分钟。然后冷却至0℃并保持搅拌2小时。在过滤器上收集固体产物,化合物2a,并在过滤器上用DIPE(2×200ml)洗涤两次。干燥后,得到34.6g纯化的环状肽,收率:78.6%,经测定校正;HPLC为96.8%。

[0171] (g)最终脱保护

[0172] 将从环化步骤获得的纯化环肽(33.3g)悬浮于MeCN(330ml)和浓HCl(37%,54ml)的混合物中。将悬浮液在15℃搅拌1小时。悬浮液变成溶液,然后再次变成浆液。完成后,加入MeCN(330ml),将混合物搅拌1小时。在过滤器上收集粗产物,D3的HCl盐,用MeCN(2×330ml)洗涤两次,并在20℃下真空干燥。产量:24.5g。

[0173] (H)结晶

[0174] 碱化-酸化方法:

[0175] 将粗产物(24.5g)悬浮于水(245ml)中并加热至50℃。向该悬浮液(可以以凝胶形式出现)中加入NaOH(2M,47.6ml)。将混合物在50℃下搅拌1小时直至获得溶液(可能是混浊的)。将该溶液热过滤除去任何不溶物。将容器用水(74ml)冲洗,冲洗液通过过滤器,合并滤液。合并的滤液转移到另一容器中,在高效搅拌下加热到50℃。向该温热溶液中加入HCl(4M,47.6ml)。最初形成凝胶。在50℃继续搅拌40分钟,在40℃继续搅拌50分钟,在30℃继续搅拌约14小时,并在1℃下继续搅拌8小时以获得白色浆液。在过滤器上收集纯化的最终产物(白色针状物),用HCl(1M,50ml)洗涤并在20℃下真空干燥。产量:21g,测定:85.66%。HPLC:98.9%。总收率:从Fmoc-Hser(Trt)OH开始,为53.6%,经测定校正。

[0176] 最终产品倾向于在pH 2-8形成凝胶,但在pH>9时形成适合澄清过滤(clear filtration)的稳定溶液。将澄清溶液用37%HCl酸化至pH≤0后,最终产物HCl盐首先形成凝胶,然后凝胶转化为高纯度的细针状(参见图3)。

实施例2

[0177] 结晶过程的优化

[0178] 进行一系列实验以避免在结晶过程中形成杂质并获得更大规模的稳健工艺。HCl的温度和强度是变化的,并总结在下面的表1中。在每个实验中在一定时间:2小时、4小时、8小时和22小时取出样品。用HPLC监测样品中最终产物和三种主要杂质的含量(图4-7)。

表1

	40℃	50℃	60℃
5当量HCl	A	B	C
7当量HCl	D	E	F

[0179] 图4是显示在结晶期间在不同条件下(即,在各种温度和浓度的HCl(标记为A、B、C、

D、E和F)下)在2小时、4小时、8小时和22小时的最终产物的HPLC面积百分比的柱状图。起始纯度为96.2%。

[0180] 图5是显示在22小时的时间段内随着时间的推移在结晶期间杂质Des-Gly的形成的图。可以得出以下结论:(a)在40℃下,最终产物在5和7当量的HCl的存在下是稳定的,持续22小时;(b)在50℃下,最终产物在5和7当量的HCl的存在下是稳定的,持续4小时;(c)在60℃下,最终产物在2小时后开始降解。

[0181] 图6是显示在12小时的时间段内随着时间的推移在结晶过程中未知的杂质的形成的图。通过HPLC测量,在0.93的相对保留时间(RRT0.93)时,杂质被洗脱。可以得出如下结论:(a)在40℃时,不管是添加5当量还是7当量的HCl,RT0.93的形成都是非常缓慢的;(b)在50℃时,RT0.93的形成在8小时内略高于在40℃的形成。在8小时后加速,相比使用5当量的HCl,用7当量的HCl生成更多的RT0.93;(c)在60℃时,RT0.93的形成迅速增加。

[0182] 图7是显示在12小时的时间段内随着时间的推移在结晶期间未知的杂质的形成的图。通过HPLC测量,在1.11的相对保留时间(RRT1.11)处,杂质被洗脱。可以得出如下结论:(a)在40℃时,不管是添加5当量还是7当量的HCl,RRT1.11的形成是非常缓慢的;(b)在50℃,RRT1.11的形成在4小时内略高于在40℃的形成。在4小时后加速,相比使用5当量的HCl,用7当量的HCl产生更多的所述未知杂质;(c)在60℃时,RRT1.11的形成迅速增加。

实施例3

[0183] 结晶过程中的温度循环

[0184] 为了理解结晶过程,通过将结晶过程中的温度从50℃降低至20℃,然后将其升高至50℃并再次降低至20℃来使温度循环。温度循环图如图8所示。每隔一段时间从浆液中取出样品并用显微镜分析。图9显示了在显微镜分析下最终产物的晶体转变。

[0185] 在40℃下14小时后,凝胶转化成结晶(针状)浆液。这些针状物在总共47小时的温度循环过程中没有被损坏,包括在5℃长时间冷却。这意味着这种结晶形式在这些条件下是稳定的,并且转化需要很长时间。在整个结晶方法的发展过程中,一些实验表明粗制最终产物的纯度影响从凝胶到结晶物质的转化率。结晶后,结晶产物的纯度通过HPLC测得为高于97%(例如97.2%-99.1%)。尽管过滤时间相对较长,但结晶产物比凝胶更容易过滤。干燥后,针状物转变成不规则的固体,具有一定的结晶度。图10显示了显微镜分析的在过滤器上的晶体转变。

实例4

[0186] 晶形转化的研究

[0187] 将粗制批次的D3样品在0.1M HCl溶液、0.001M HCl溶液中浆化以研究可能的转化。将大约60mg的粗制D3样品在0.6ml溶液中浆化。在室温下将浆液磁力搅拌。在0.1M HCl浆液中,在1-2天后观察到针状物。在多孔板上通过XRPD分析浆液,参见图11。结晶形式对应于晶形V,即发生从晶形IV到晶形V的快速转变。在纯净水中,转化速度更慢,在2周后进行分析。浆料主要包括晶形V,但有一些额外的峰,可能表明存在其他结晶形式。应该注意的是,粗物质可能含有过量的影响pH值的HCl。纯水浆液中的pH为约3。

[0188] 在0.001M HCl溶液中,转化也是缓慢的,在2周后进行分析。参见图12,XRPD显示结晶物质已经形成。与纯水(即100%水)浆液有许多相似之处,即它似乎是晶形V和一些其它结晶形式的混合物。

[0189] 在3周后第二次分析该0.1M HCl浆液。参见图13a。它仍然对应于晶形V,即浆液在多晶形方面看起来非常稳定。

实施例5

[0190] D3的无定形形式的表征

[0191] 图14显示了D3的无定形HCl盐的干燥样品的显微镜照片,其在结晶之前获得结晶但在干燥后失去其结晶性。

[0192] D3样品的无定形HCl盐通过XRPD分析,参见图15。可以得出结论,该材料是晶形IV,尽管它主要是无定形的。在2θ=32°处的峰对应于该材料中的氯化钠。

[0193] D3的无定形HCl盐的DSC显示在图16中。在约60℃有小的吸热,在约180-190℃有一周的放热事件,接着在约220℃有吸热。由于晶形IV主要是无定形的,所以预计热事件(events)较小且不明确。

[0194] D3的无定形HCl盐的热重分析(TGA)显示在图17中,其显示高达100-110℃的约1.7%的重量损失。

[0195] 通过动态水分吸附法(DVS)分析D3样品的无定形HCl盐,参见图18。高达95%的相对湿度下有持续的水吸收,对应于32%的重量增加。在20%RH(相对湿度)下,质量变化为4%,在40%RH下为约7%。尽管水的吸收量很大,但这个过程似乎是完全可逆的,并且几乎没有滞后效应,即吸收和损失的重量几乎是相同的,参见图19。注意的是,两个循环几乎是相同的。

[0196] DVS分析之后的D3样品的无定形HCl盐用TGA分析,参见图20。重量减轻3.9%,这与在RH=20%时的吸收的水相当。

[0197] 通过XRPD再次分析D3样品的无定形HCl盐,参见图21,其显示该材料仍然非常类似于起始材料。

[0198] 为了研究在非常高的RH(接近100%)下的行为,将D3样品的无定形HCl盐加入到显微镜载玻片上并放入用水蒸气饱和的干燥器中。将样品放置过夜,然后通过TGA快速分析,参见图22。TGA分析显示水分损失约为30%。应该注意到样品仍然是固体形式,即没有潮解。样品也用XRPD分析,参见图23。分析表明样品比起始材料更具结晶性(图21),并且与晶形V有很大的相似性。参考晶形V的峰朝向更小的2θ值移动,即朝向更大的d值移动。当水被添加到该结构中时,指示有溶胀。注意的是,XRPD分析是在ZBH上进行的,因此在多孔基底上的在2θ=26、35和38处的强峰缺失。

实施例6

[0199] 方法

[0200] DSC和TGA

[0201] DSC分析在Mettler Toledo DSC型号822上进行。TGA分析在Mettler Toledo TGA/SDTA 851上进行。

[0202] DVS分析

[0203] 在DVS AdVantage(Surface Measurement Systems)上进行DVS分析。

[0204] XRPD

[0205] 在使用铜辐射的配有PIXcel检测器、自动发散狭缝和防散射狭缝、索勒狭缝和Ni-过滤器的PANalytical X'Pert PRO衍射仪上采集X射线粉末衍射图。使用XRPD的标准技术

将干燥的样品应用于ZBH。通过使用多孔Al_2O_3板来分析湿样品以消除一些溶剂效应。

[0206] 显微镜

[0207] 在显微镜下拍摄照片以与Malvern结果进行比较。将干样品施加在显微镜载玻片上，并加入一些Miglyol。原样分析浆液样品或用一滴Miglyol分析。

[0208] 设备

[0209] 使用磁力搅拌在4ml小瓶中进行浆液实验。

[0210] 虽然已经参照其操作性实施例进行了详细描述和指出本发明，但是本领域技术人员将会理解，可以进行各种改变、修改、替换和省略而不脱离本发明的精神。因此，意图是本发明包含在所附权利要求的范围内的那些等同方案。

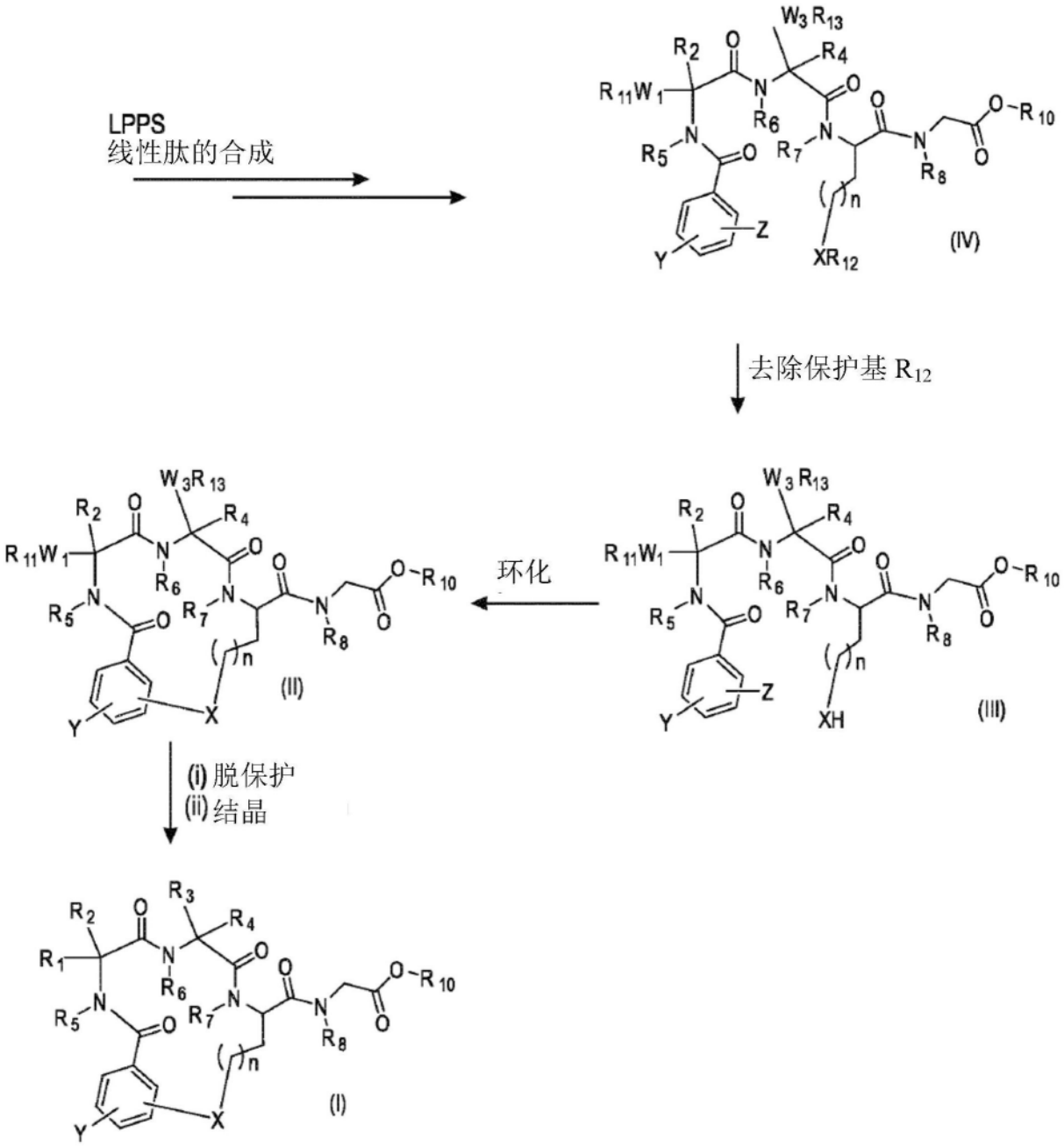


图1

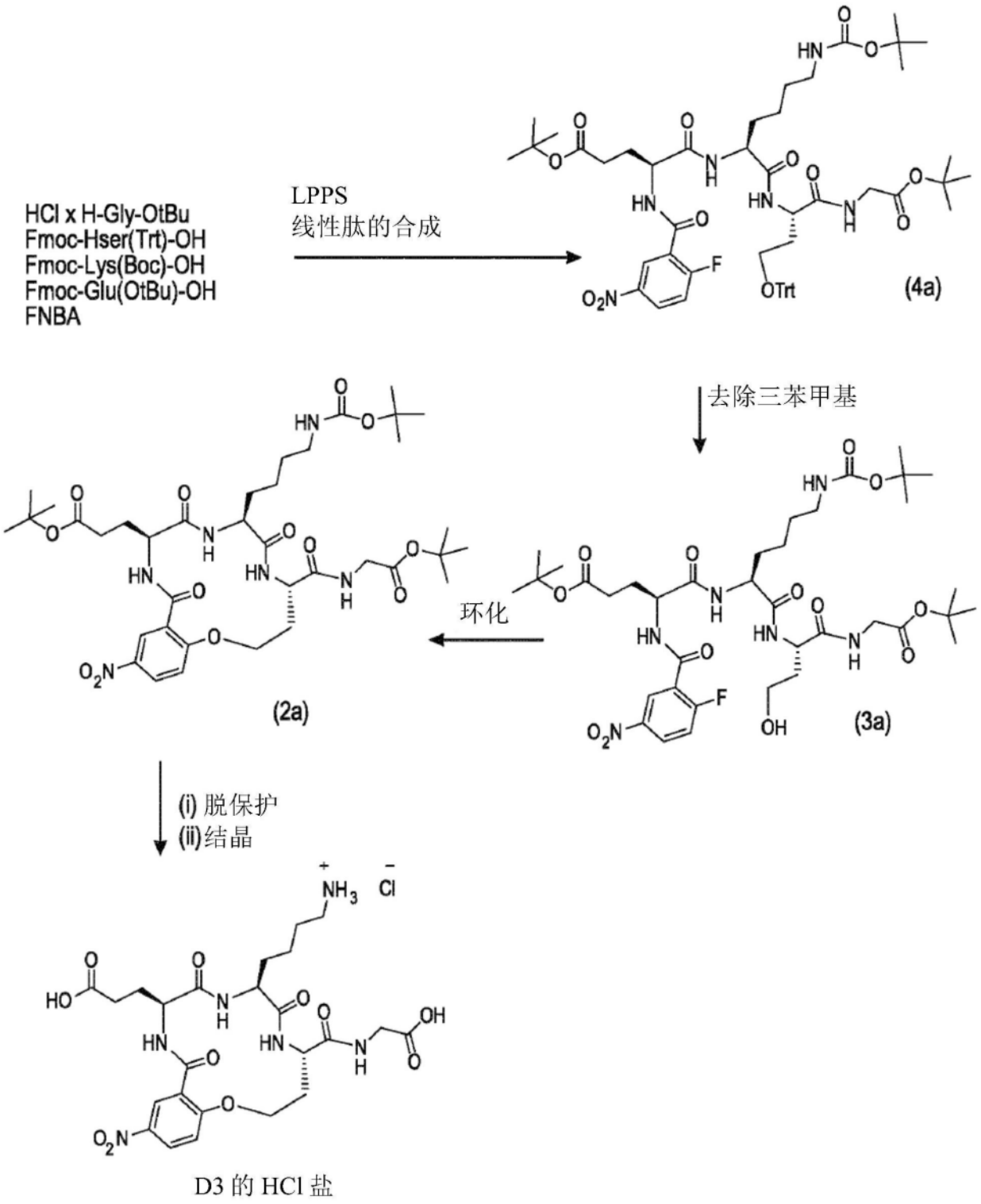

HCl x H-Gly-OtBu
Fmoc-Hser(Trt)-OH
Fmoc-Lys(Boc)-OH
Fmoc-Glu(OtBu)-OH
FNBA
LPPS
线性肽的合成
(4a)
去除三苯甲基
(3a)
环化
(2a)
(i) 脱保护
(ii)结晶
D3 的 HCl 盐

图2

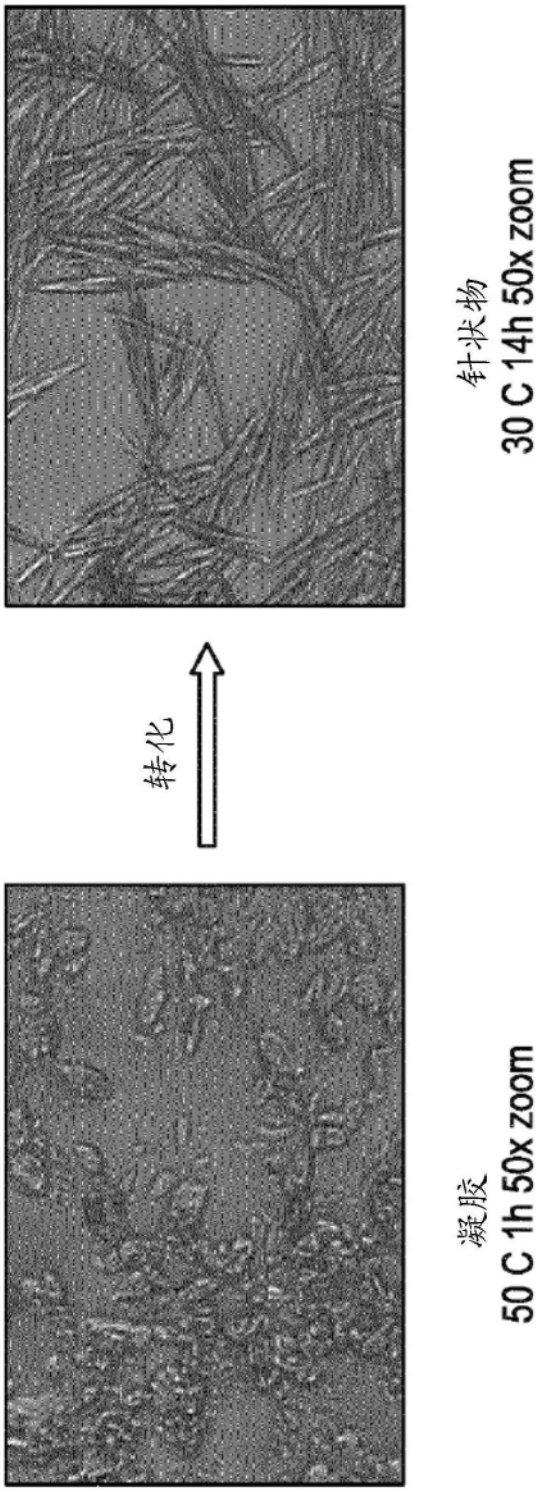


图3

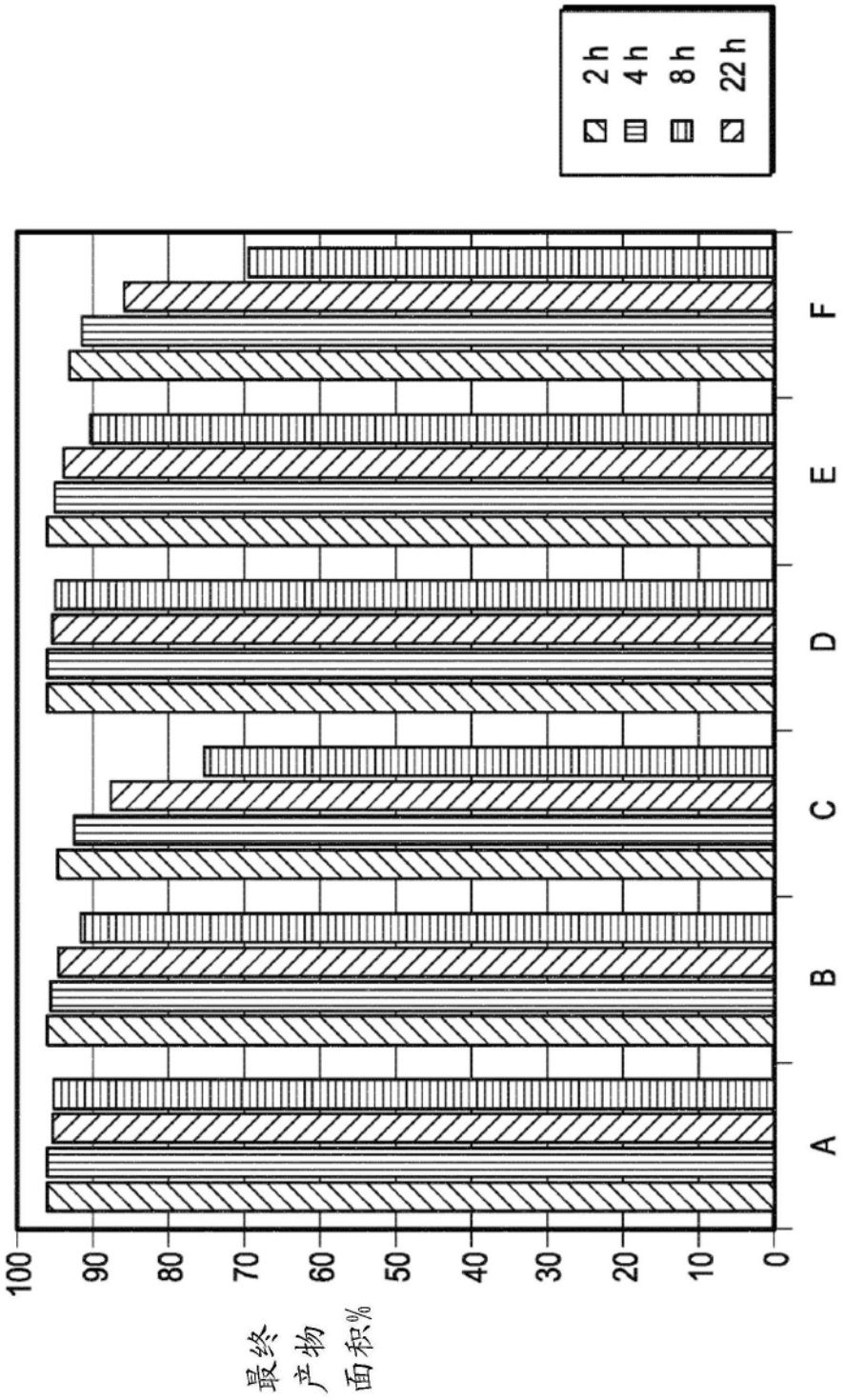


图4

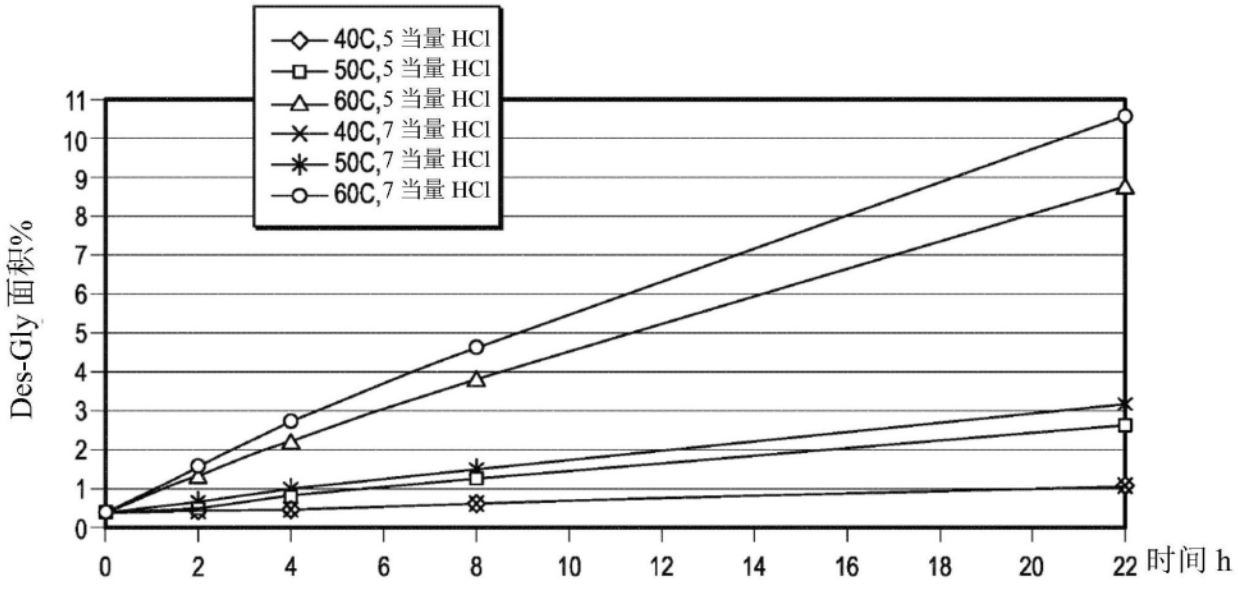

40C,5 当量 HCl
50C,5 当量 HCl
60C,5 当量 HCl
40C,7 当量 HCl
50C,7 当量 HCl
60C,7 当量 HCl
Des-Gly 面积%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
时间 h

图5

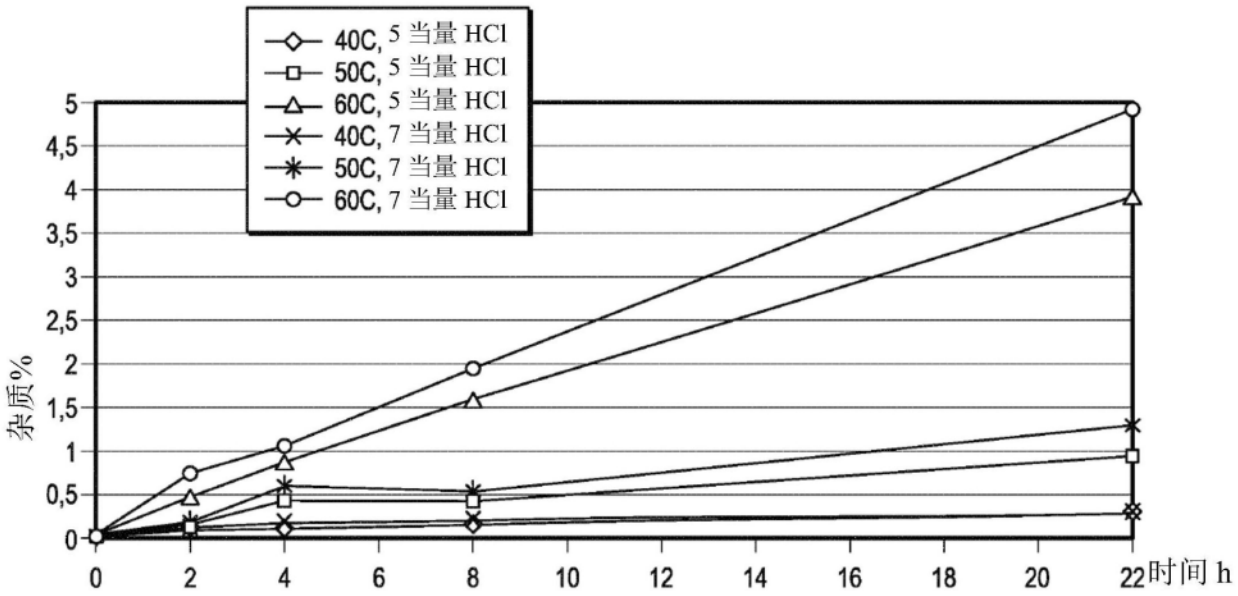

40C, 5 当量 HCl
50C, 5 当量 HCl
60C, 5 当量 HCl
40C, 7 当量 HCl
50C, 7 当量 HCl
60C, 7 当量 HCl
杂质%
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
4,5
5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
时间 h

图6

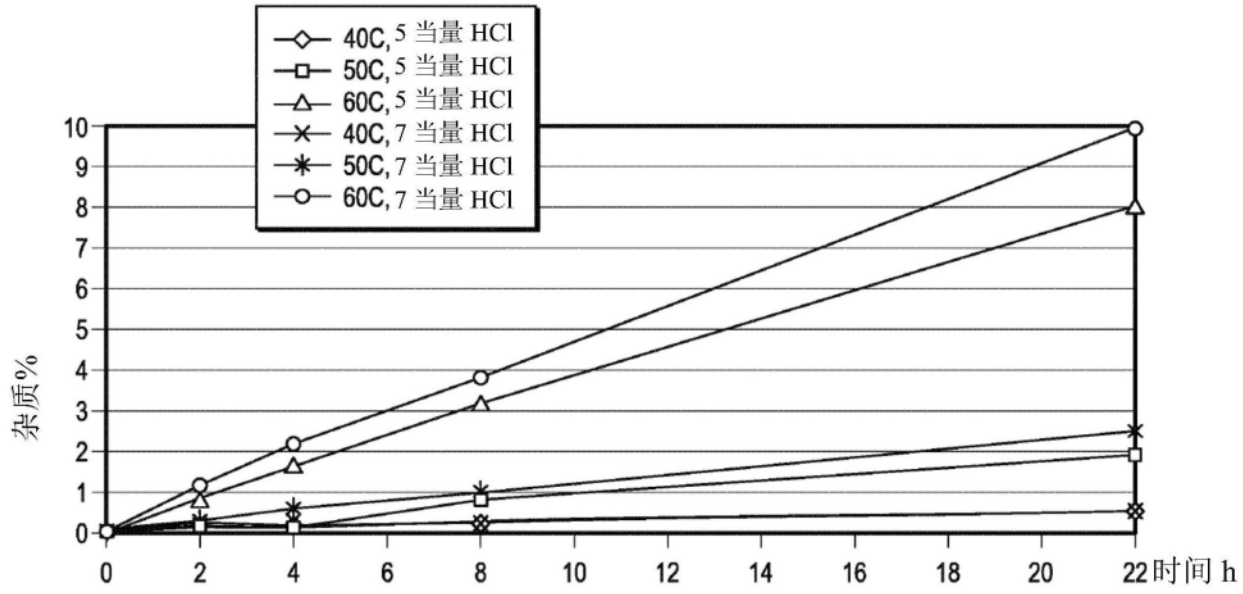

40C,5 当量 HCl
50C,5 当量 HCl
60C,5 当量 HCl
40C,7 当量 HCl
50C,7 当量 HCl
60C,7 当量 HCl
杂质%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
时间 h

图7

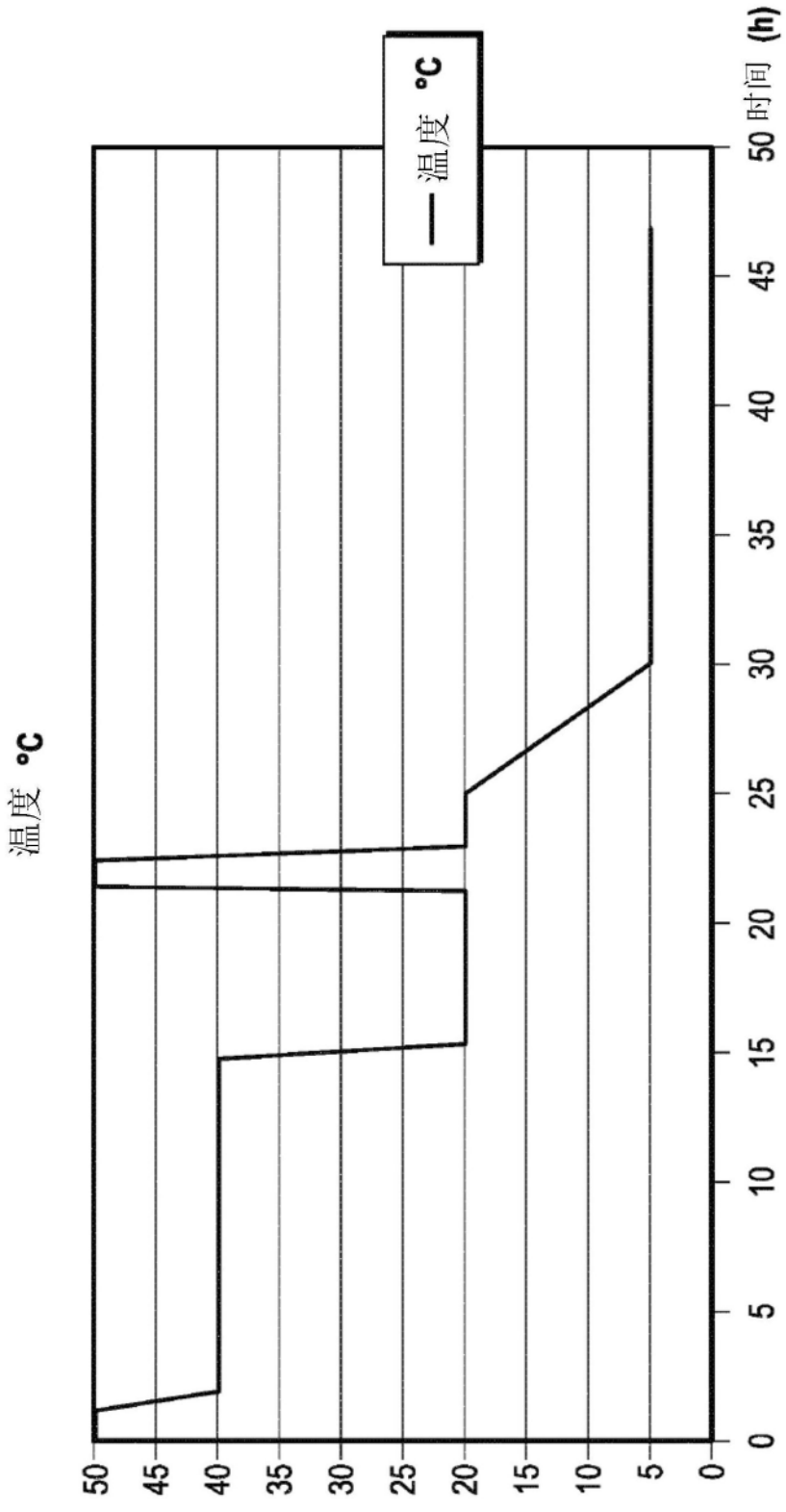


图8

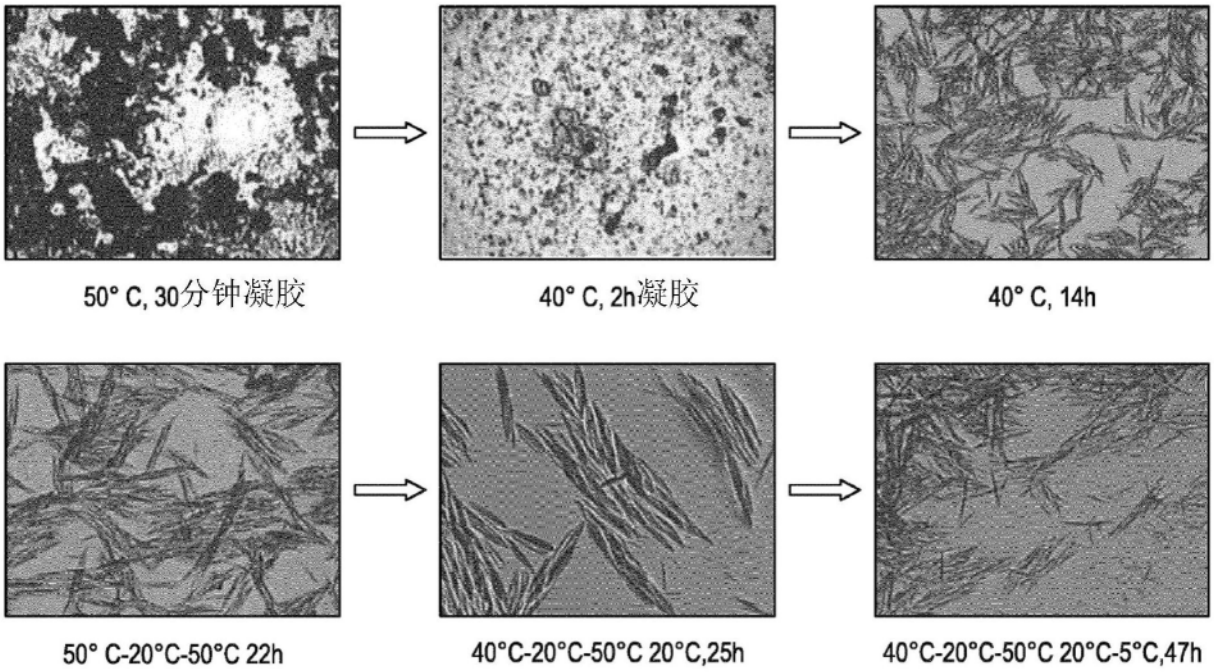

50° C, 30分钟凝胶
40° C, 2h凝胶
40° C, 14h
50° C-20°C-50°C 22h
40°C-20°C-50°C 20°C,25h
40°C-20°C-50°C 20°C-5°C,47h

图9

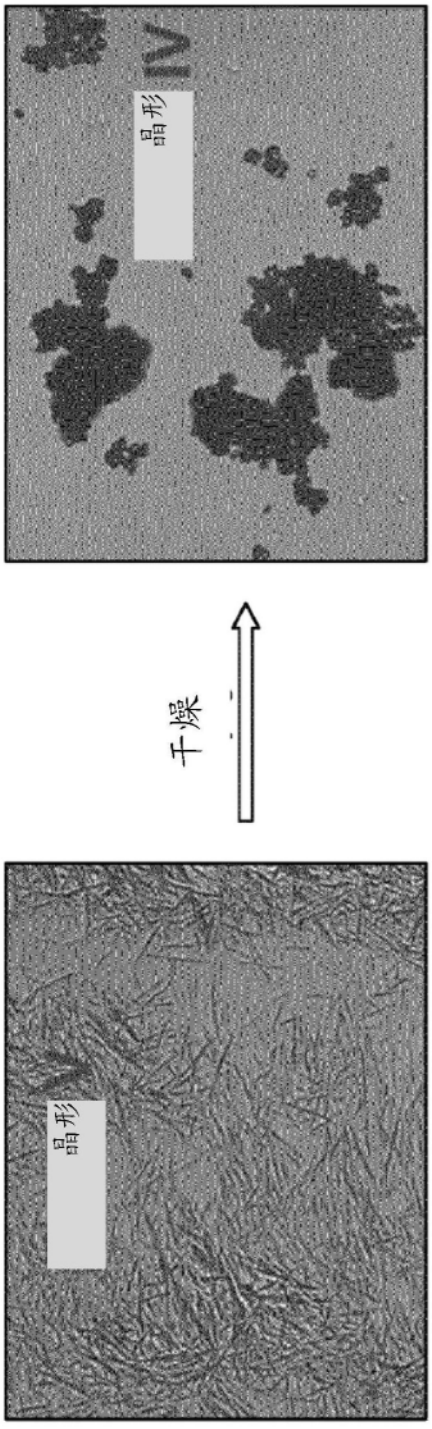


图10

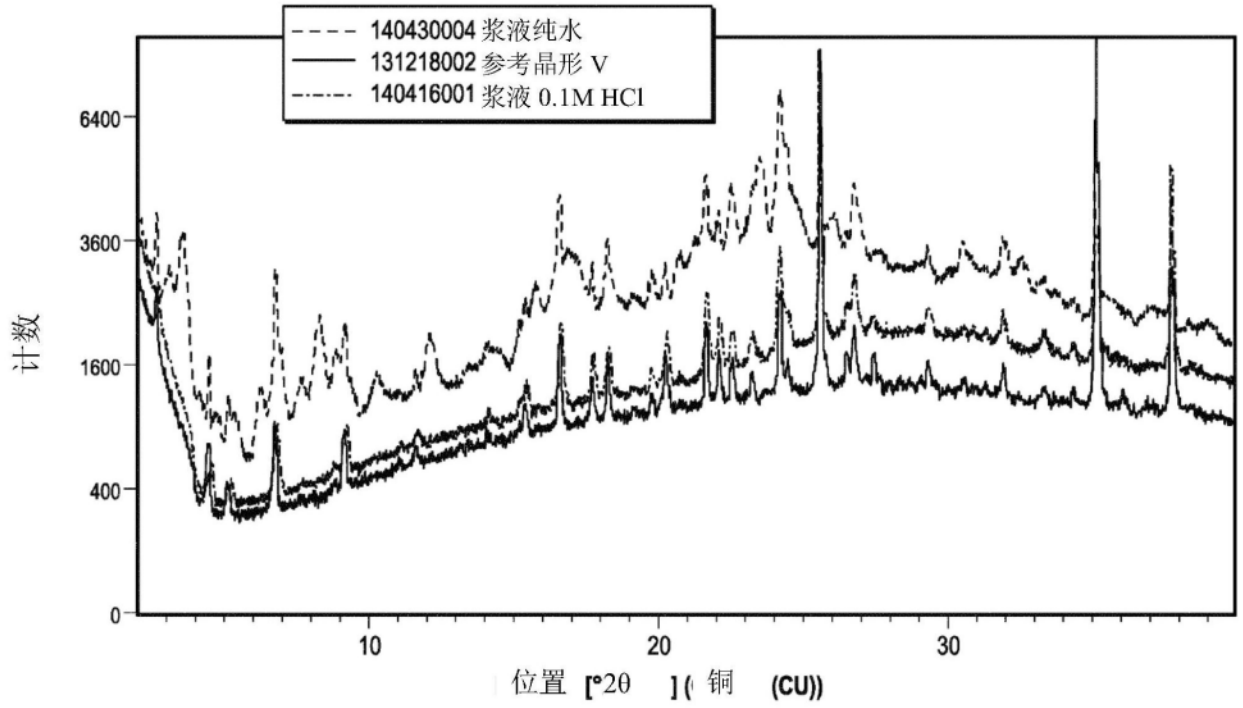

140430004 浆液纯水
131218002 参考晶形 V
140416001 浆液 0.1M HCl
计数
6400
3600
1600
400
0
10
20
30
位置 [°2θ] (铜 (CU))

图11

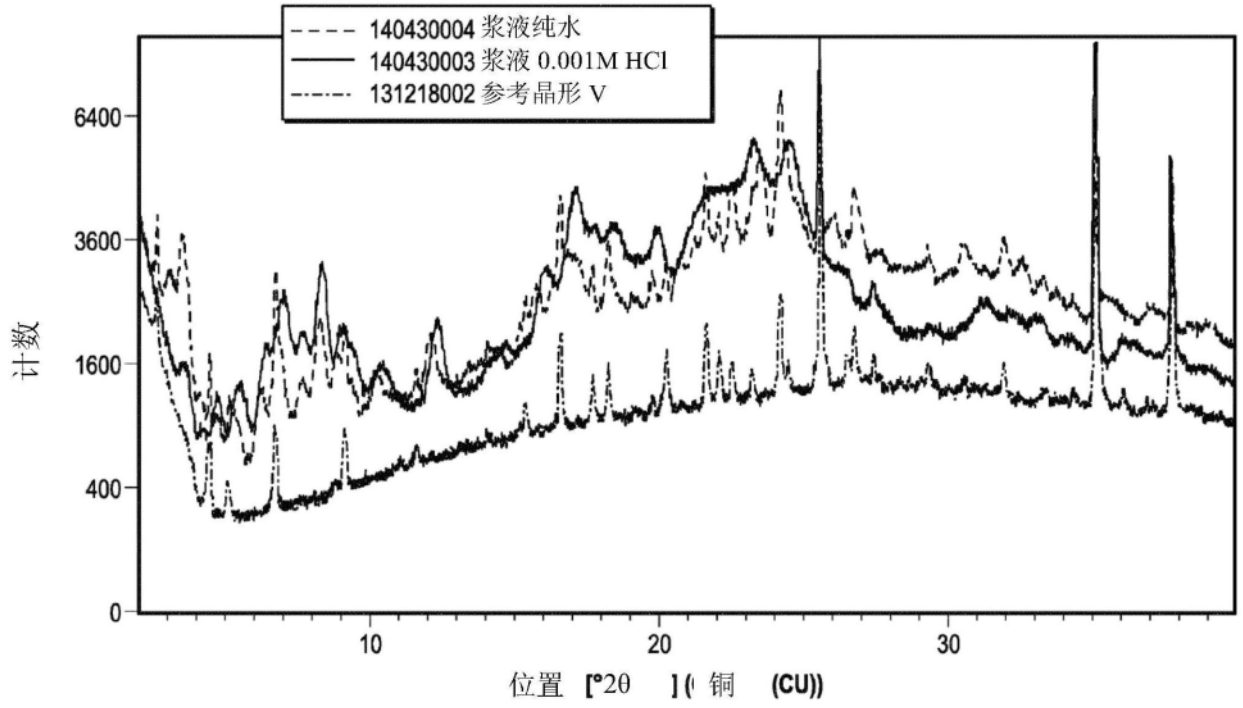

140430004 浆液纯水
140430003 浆液 0.001M HCl
131218002 参考晶形 V
计数
6400
3600
1600
400
0
10
20
30
位置 [°2θ] (铜 (CU))

图12

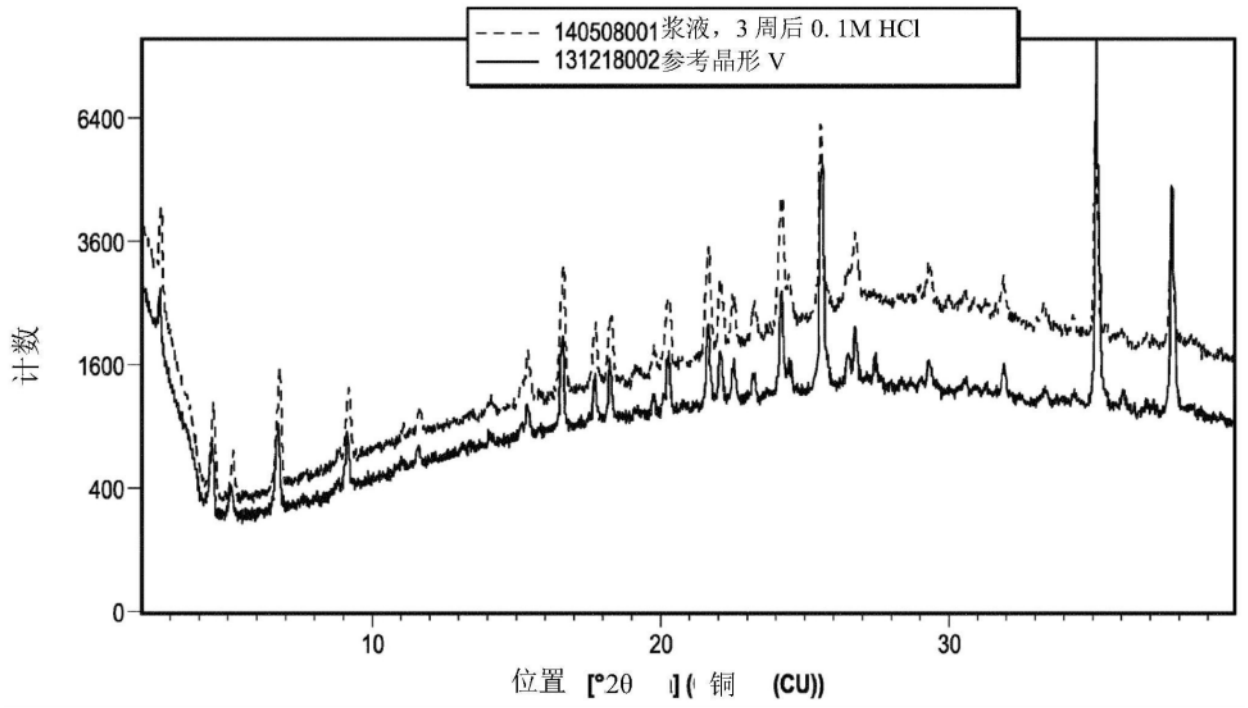

140508001浆液，3 周后 0. 1M HCl
131218002参考晶形 V
6400
3600
1600
400
0
计数
10
20
30
位置 [°2θ
铜
(CU))

图13A

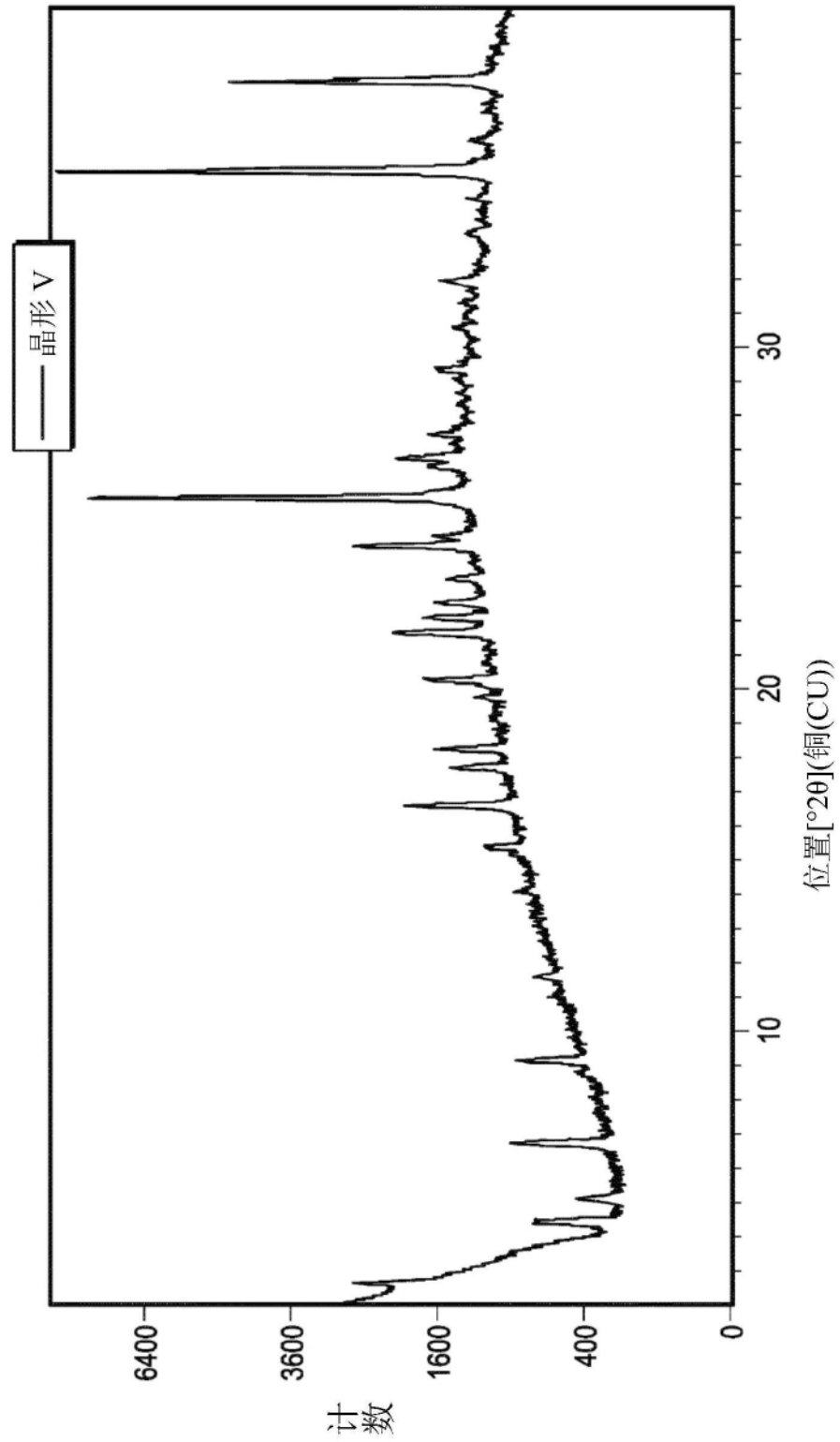


图13B

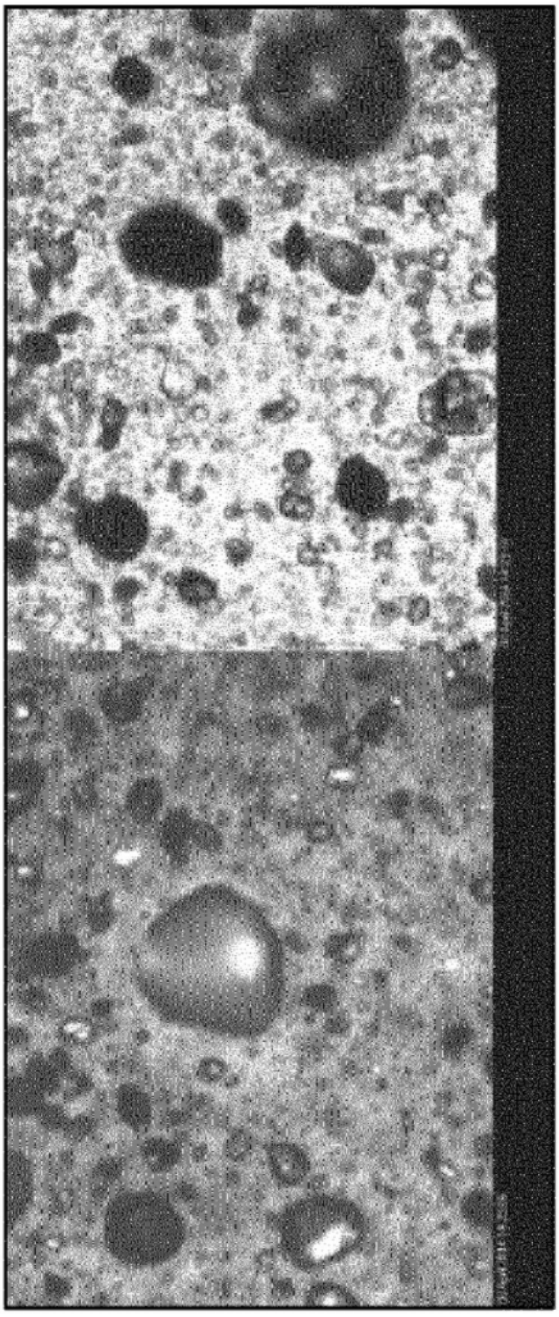


图14

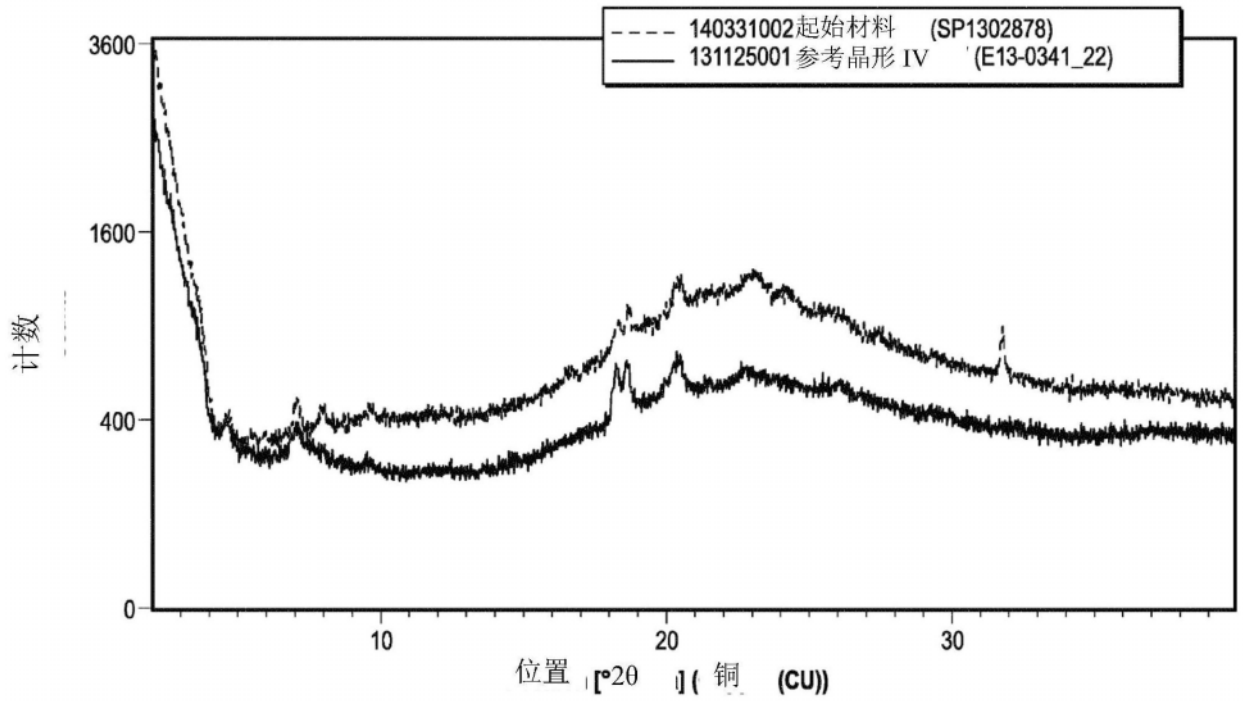

140331002起始材料 (SP1302878)
131125001参考晶形 IV (E13-0341_22)
3600
1600
400
0
计数
10
20
30
位置 [°2θ] (铜 (CU))

图15

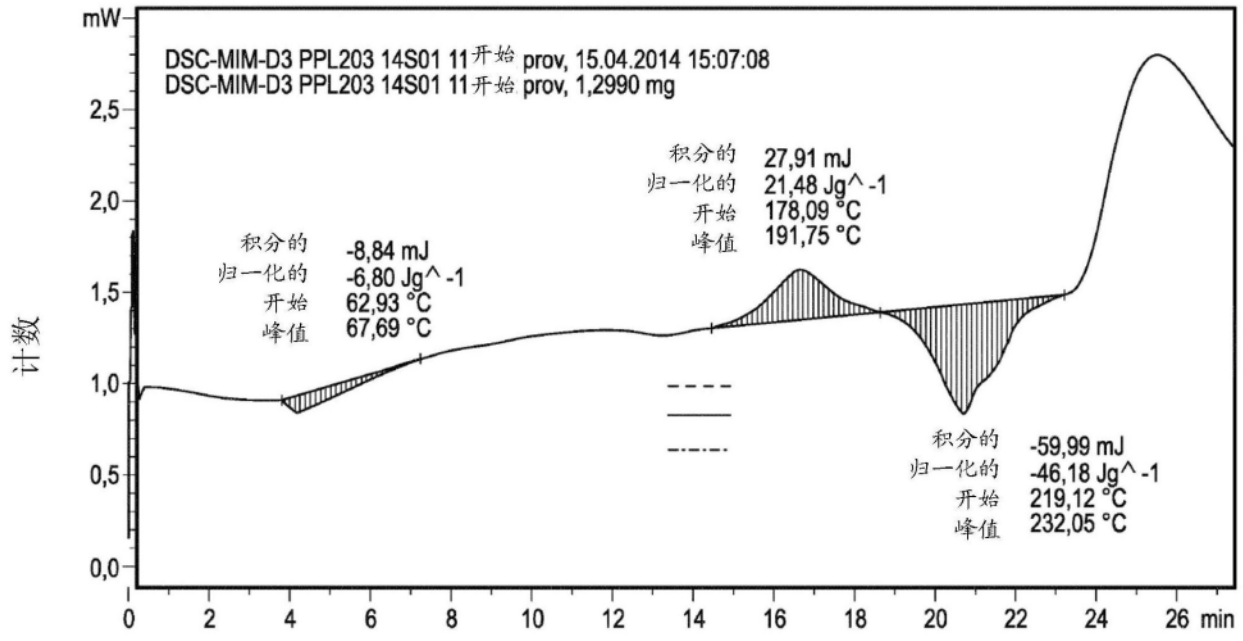

mW
DSC-MIM-D3 PPL203 14S01 11开始 prov, 15.04.2014 15:07:08
DSC-MIM-D3 PPL203 14S01 11开始 prov, 1,2990 mg
积分的 -8,84 mJ
归一化的 -6,80 Jg^ -1
开始 62,93 °C
峰值 67,69 °C
积分的 27,91 mJ
归一化的 21,48 Jg^ -1
开始 178,09 °C
峰值 191,75 °C
积分的 -59,99 mJ
归一化的 -46,18 Jg^ -1
开始 219,12 °C
峰值 232,05 °C
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
计数
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26 min

图16

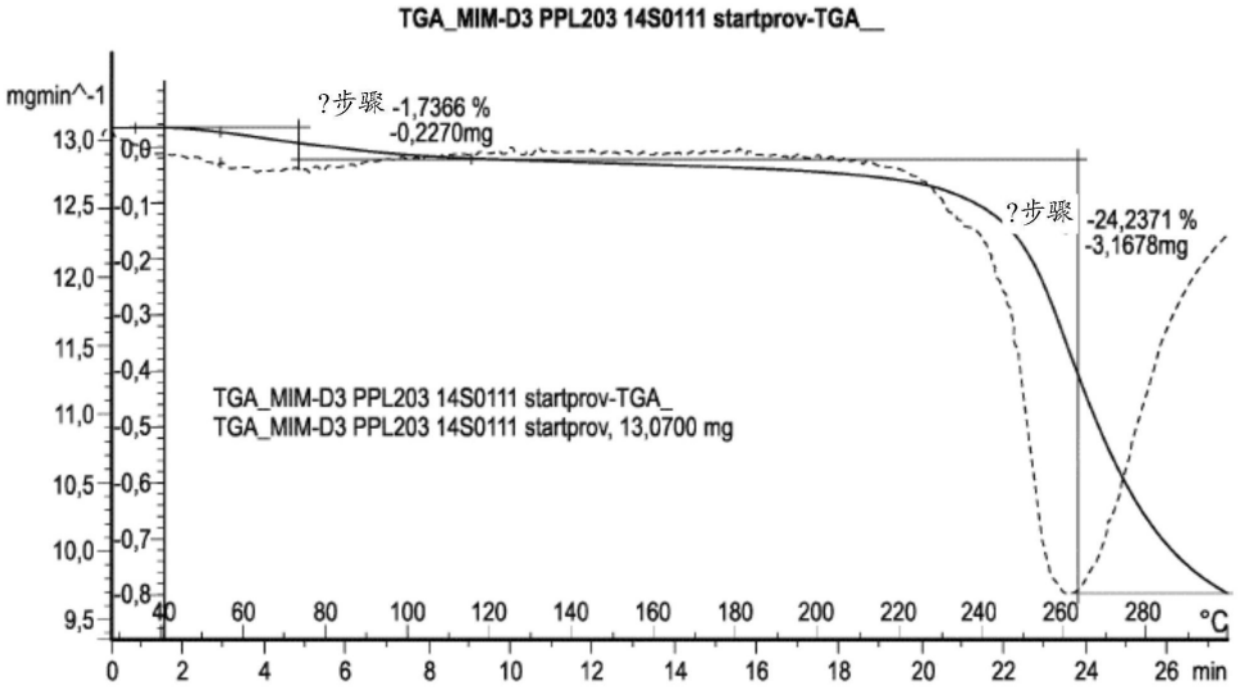

TGA_MIM-D3 PPL203 14S0111 startprov-TGA__
mgmin^-1
?步骤 -1,7366 %
-0,2270mg
?步骤 -24,2371 %
-3,1678mg
TGA_MIM-D3 PPL203 14S0111 startprov-TGA_
TGA_MIM-D3 PPL203 14S0111 startprov, 13,0700 mg
°C
min

图17

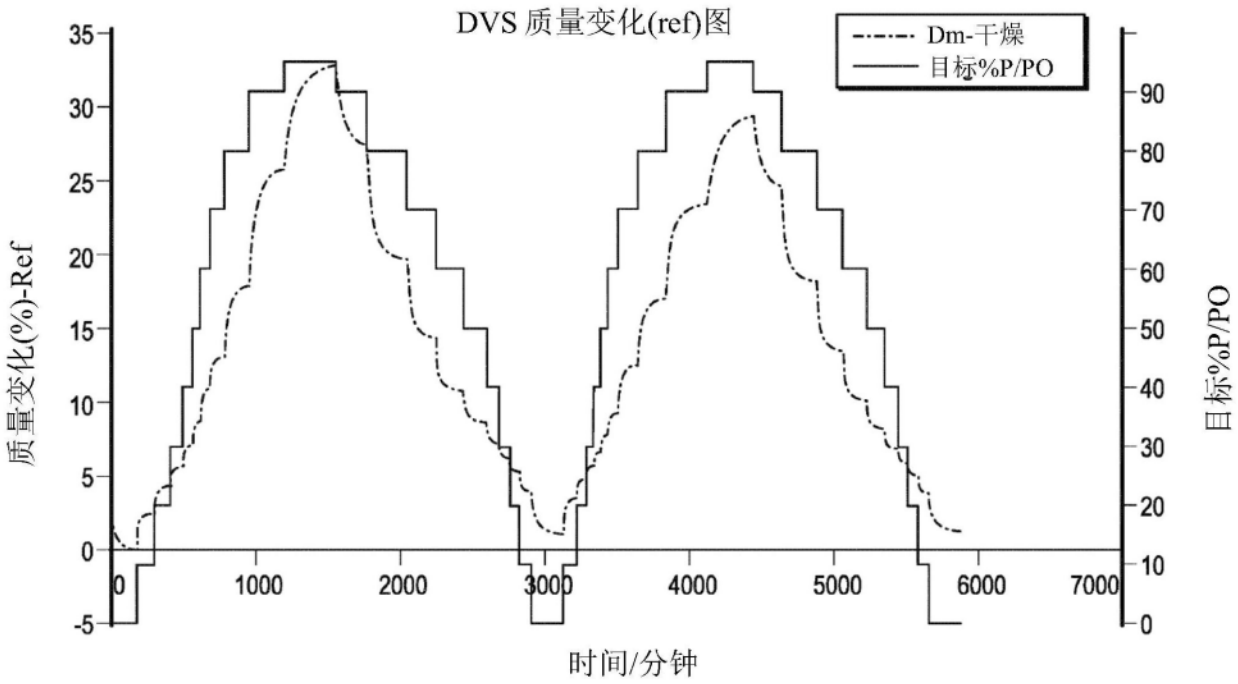

DVS 质量变化(ref)图
Dm-干燥
目标%P/PO
质量变化(%)-Ref
目标%P/PO
时间/分钟

图18

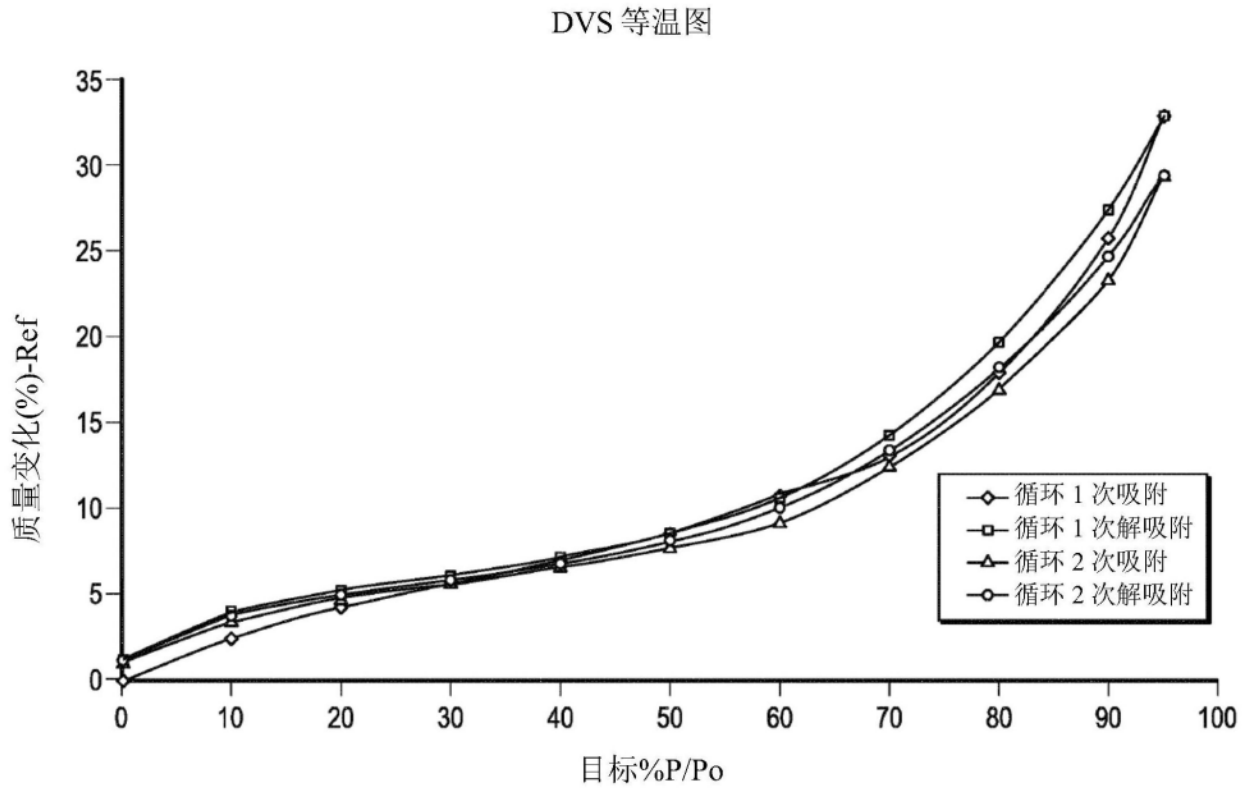

DVS 等温图
质量变化(%)-Ref
目标%P/Po
循环 1 次吸附
循环 1 次解吸附
循环 2 次吸附
循环 2 次解吸附

图19

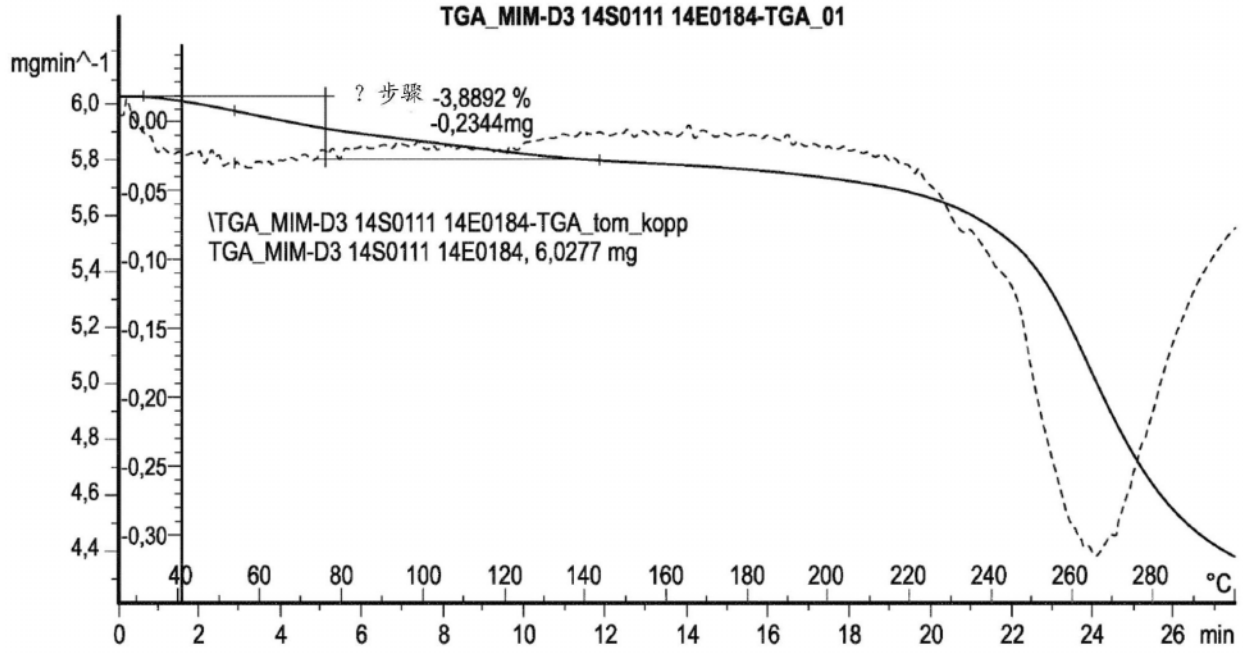

TGA_MIM-D3 14S0111 14E0184-TGA_01
mgmin^-1
? 步骤 -3,8892 %
-0,2344mg
\TGA_MIM-D3 14S0111 14E0184-TGA_tom_kopp
TGA_MIM-D3 14S0111 14E0184, 6,0277 mg
°C
min

图20

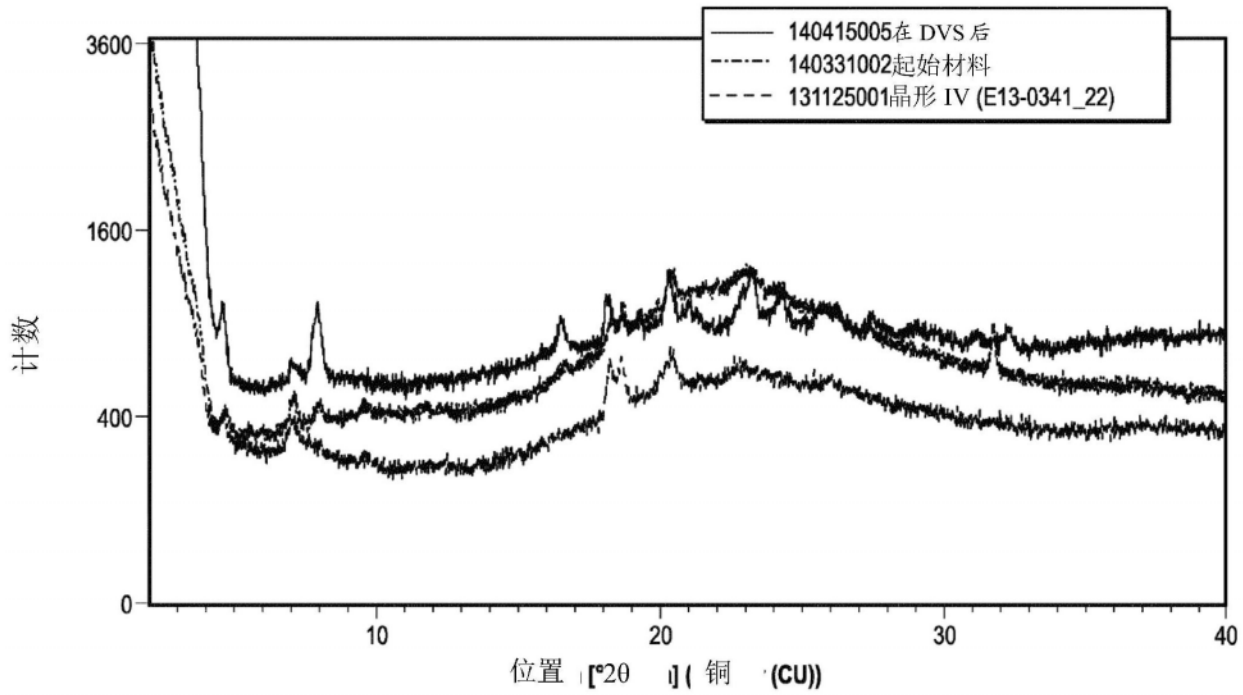

140415005在 DVS 后
140331002起始材料
131125001晶形 IV (E13-0341_22)
计数
3600
1600
400
0
10
20
30
40
位置 [°2θ] (铜 (CU))

图21

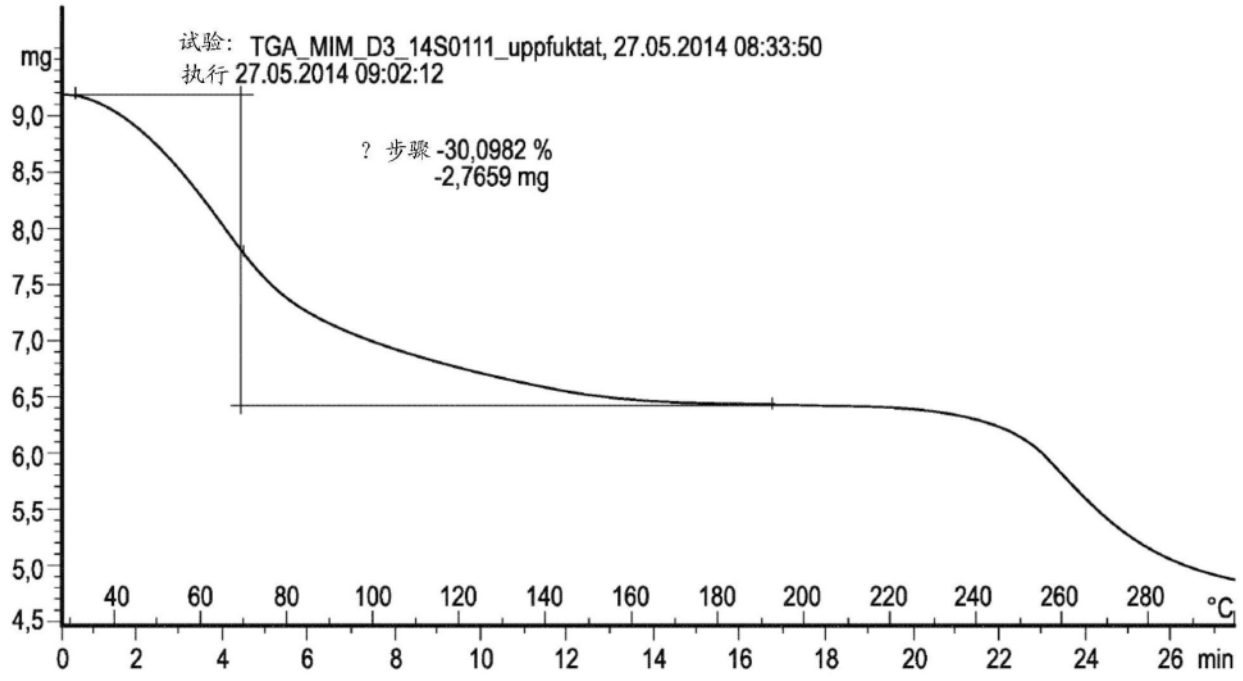

试验: TGA_MIM_D3_14S0111_uppfuktat, 27.05.2014 08:33:50
执行 27.05.2014 09:02:12
? 步骤 -30,0982 %
-2,7659 mg
mg
9,0
8,5
8,0
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 °C
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 min

图22

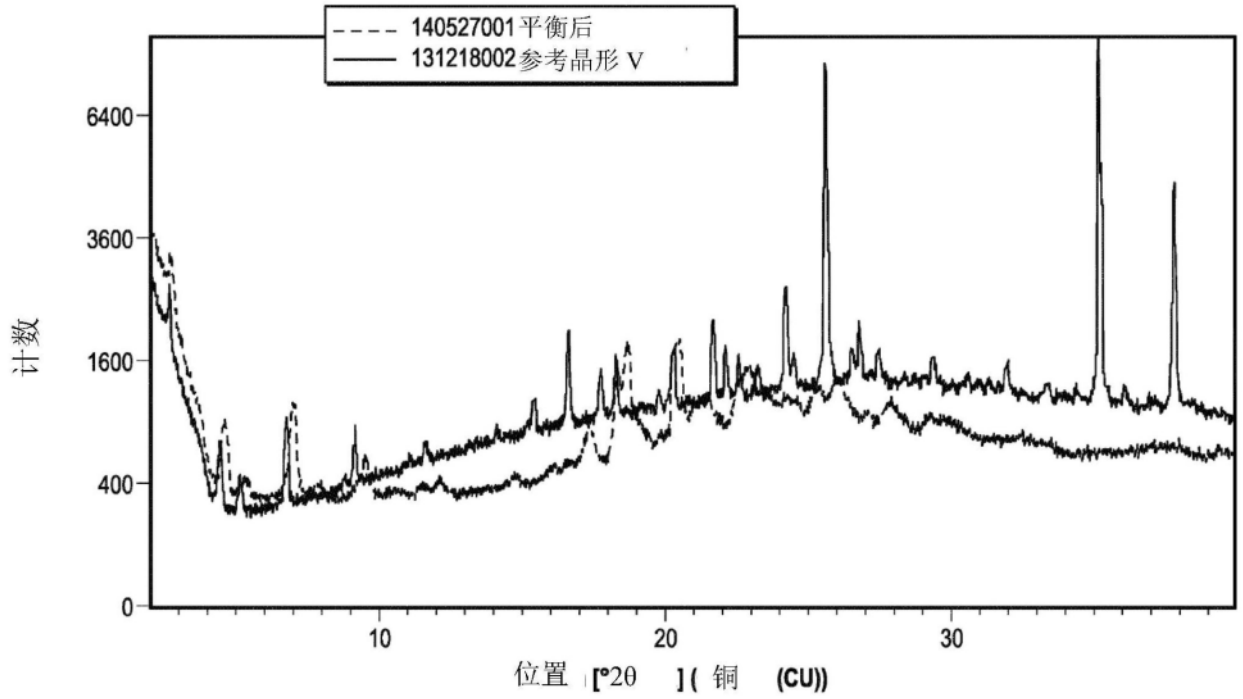

140527001平衡后
131218002参考晶形 V
6400
3600
1600
400
0
计数
10
20
30
位置 [°2θ] (铜 (CU))

图23