伏环孢素有关物质的合成和纯化

麦子丹[1]，姜碧波[2]，刘甲甲[2]，徐圣君[3]，张福利[2]，赵传猛[2*]

（1. 上海工程技术大学，化学化工学院，上海 201203；2. 中国医药工业研究总院有限公司，上海医药工业研究院有限公司，上海 201203；3. 博崤（杭州）生物制药有限公司，浙江杭州 311404）

摘要：制备、分离并纯化了伏环孢素（**1**）的 2 个有关物质（A 和 B），其中有关物质 B 为 **1** 的 *Z* 式异构体，即环[[(6*Z*)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3- 羟基 -4- 甲基 -2-（甲基氨基）-6,8- 壬二烯酰基]-L-2- 氨基丁酰基 -*N*- 甲基 - 甘氨酰基 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 缬氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 丙氨酰 -D- 丙氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -*N*- 甲基 -L- 缬氨酰]。首次报道在三乙胺 / 溴化锂体系下，将 *E* 式乙酰化伏环孢素（**5**）构型翻转并脱除乙酰基，可得到高纯度有关物质 B。另外，在 **1** 的工艺优化过程中，首次发现并制备了过氧化杂质，即有关物质 A，经高分辨质谱和核磁共振光谱分析，确证其结构为乙酰化环孢素 A 酸。上述 2 个化合物可对 **1** 原料药的质量控制提供一定的参考。

关键词：伏环孢素；合成；纯化；有关物质；结构确证；质量控制

中图分类号：TQ460.6；R979.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)07-0871-06

引用：麦子丹，姜碧波，刘甲甲，等. 伏环孢素有关物质的合成和纯化[J]. 中国医药工业杂志，2025, **56**(7): 871-876.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.07.005

Synthesis and Purification of Related Substances of Voclosporin

MAI Zidan[1], JIANG Bibo[2], LIU Jiajia[2], XU Shengjun[3], ZHANG Fuli[2], ZHAO Chuanmeng[2*]

(*1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201203; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. Boxiao (Hangzhou) Biopharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311404*)

ABSTRACT: Herein two related substances (A and B) of voclosporin (**1**) were prepared and purified. Compound B was *Z*-isomer of **1**, named cyclo-[[(6*Z*)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6,8-nonadienoyl]-L-2-aminobutyryl-*N*-methyl-glycyl-*N*-methyl-L-leucyl-L-valyl-*N*-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-*N*-methyl-L-leucyl-*N*-methyl-L-leucyl-*N*-methyl-L-valyl]. *E* configuration of acetylated voclosporin (**5**) was transferred into related substance B via configuration conversion and acetyl group removal under triethylamine/lithium bromide with high-purity, which was reported at the first time. In addition, in the process optimization of **1**, the over-oxidized impurity, related substance A was found and prepared for the first time. Its structure was confirmed as acetylated cyclosporine A acid by high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The above two compounds can be served as the references for the quality control of **1**.

Key Words: voclosporin; purification; related substance; structure elucidation; quality control

伏环孢素（voclosporin，**1**，图 1），又名沃环孢素，化学名称为环[[(6*E*)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3- 羟基 -4- 甲基 -2-（甲基氨基）-6,8- 壬二烯酰基]-L-2- 氨基丁酰基 -*N*- 甲基 - 甘氨酰基 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 缬氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 丙氨酰 -D- 丙氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -N- 甲基 -L- 亮氨酰 -N- 甲基 -L- 缬氨酰]，CAS 登记号为 515814-01-4[1]。**1** 由加拿大 Aurinia 制药公司研发，主要用于治疗成年患者的狼

收稿日期：2024-12-31

作者简介：麦子丹，男，硕士研究生，专业方向：化学工程与技术。

通信作者：赵传猛，男，研究员，从事药物合成工艺的研究。

E-mail：hotcmeng@163.com

疮性肾炎[2]，已于2021年1月经美国FDA批准上市，于2022年9月经欧盟委员会批准上市[3—4]。

1是环孢素A（cyclosporine A，**2**）的类似物，有1个额外的单链延伸，该单链上具有1个双键，可与亲环蛋白A（cyclophilin A）结合形成异二聚体复合物，再结合钙调磷酸酶并抑制其发挥免疫抑制作用[5—7]。**1**与人体亲环蛋白的结合能力与环孢素A相当，但**1**的烯键侧链在结合时可诱导钙调磷酸酶的结构发生变化，导致其免疫抑制活性强于环孢素A[8]。

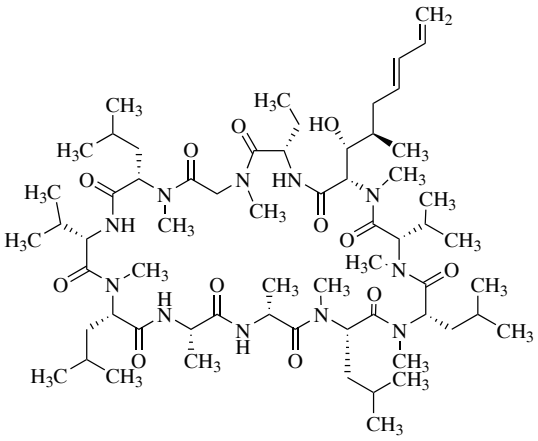


图1　1的化学结构

Fig.1　The Chemical Structure of **1**

杂质是影响药物质量的主要因素。杂质增多，不仅使药物发生理化常数、外观性状变化，还会导致药物含量和活性下降，引起不良反应[9]。目前各国药典均未收录**1**杂质。因此，为了加强质量控制以及保障临床用药安全，对**1**的有关物质进行合成、结构鉴定显得至关重要。

1有多条合成路线，如采用经典Wittig反应构建反式1,3-共轭二烯结构，以及采用烯丙基化-Peterson消除联用策略控制其*E*/*Z*异构体比例[10]等。其中，烯丙基化-Peterson消除联用策略为主流合成策略，本研究在此基础上进行工艺优化，具体如图2所示。该路线较原研路线[11]可更有效地控制并提高**1**的*E*式异构体的比例，同时避免柱色谱分离等烦琐操作。

以**2**为起始物料，经乙酰化、臭氧化、烯丙基化-Peterson消除及水解反应，共计4步得**1**粗品，后经分离、纯化，得目标产物**1**。总收率48.7%（以**2**计），纯度98.5%。该路线操作简单，成本较低。

FDA处方信息指示，**1**原料药中90%～95%为*E*式异构体，含有少量*Z*式异构体，即环[[(6Z)-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-羟基-4-甲基-2-(甲基氨基)-6,8-壬二烯酰基]-L-2-氨基丁酰基-*N*-甲基-甘氨酰基-*N*-甲基-L-亮氨酰-L-缬氨酰-*N*-甲基-L-亮氨酰-L-丙氨酰-D-丙氨酰-*N*-甲基-L-亮氨酰−*N*-甲基-L-亮氨酰-*N*-甲基-L-缬氨酰]。*Z*式异构体是**1**原料药的有关物质之一。此外，第2步臭氧化反应产生的1个未知杂质（本研究中记作有关物质A），较难去除，目前尚无文献报道。因此，本研究主要对该未知杂质及*Z*式异构体进行研究。

在工艺优化过程中发现，采用氧气源和空气源时，有关物质A的含量有较大差异。采用氧气源会导致该杂质含量明显增大，故推测其产生与臭氧密度有关。于是，通过调节臭氧发生器的功率改变臭氧密度，考察不同臭氧密度对该杂质生成的影响。

①将氧气源臭氧功率调至最低时，产生的臭氧密度与空气源臭氧功率调至最高时相当，均为低密度（5～10 g/m³）臭氧，有关物质A会随臭氧密度的增高而增大。②使用空气源臭氧（臭氧密度为5～10 g/m³），有关物质A在通入时间超过5 h的情况下（0.5 h已反应完全），生成量仍低于0.5%。由上述结果推测，有关物质A可能为过度氧化杂质。本研究通过制备液相色谱对其进行分离纯化，通过^{1}H NMR、^{13}C NMR、HRMS等方法进行结构确证，确证其化学结构如图3所示。

^{1}H NMR谱图显示，有关物质A结构中有108个氢原子，且^{1}H NMR图谱中峰的化学位移与结构对应；其中，87号位羧基氢未显示。如图4所示：在乙酰化环孢素A醛（**4**）的^{1}H NMR图中，δ 9.52处可见醛基上的氢原子；而在有关物质A的^{1}H NMR图中，醛基上氢原子的峰消失。通过与化合物**4**对比，并根据样品的核磁谱图分析，结合高分辨质谱数据（*m*/*z*=1 248.816 7），确定有关物质A为乙酰化环孢素A酸。

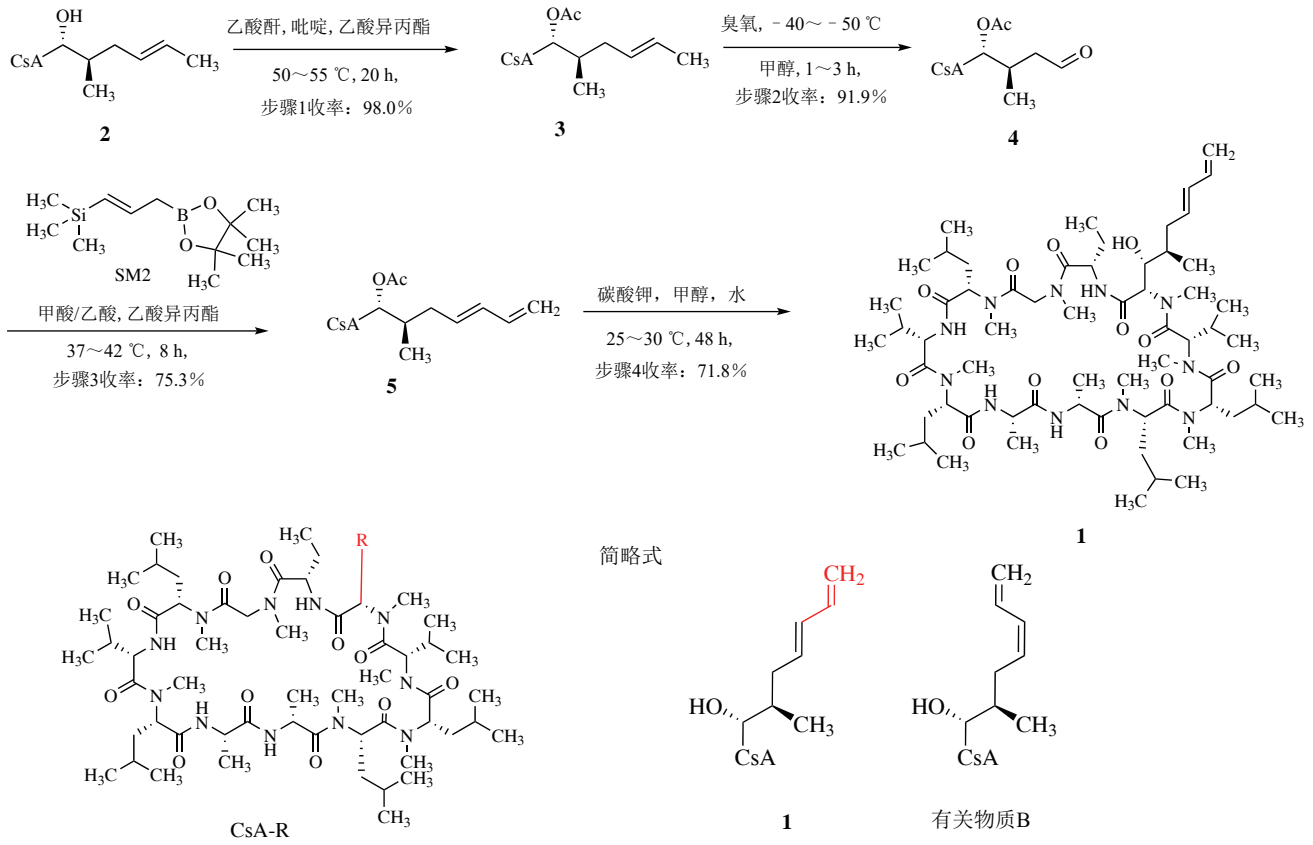


图 2　1 的合成路线

Fig.2　The Synthetic Route of **1**

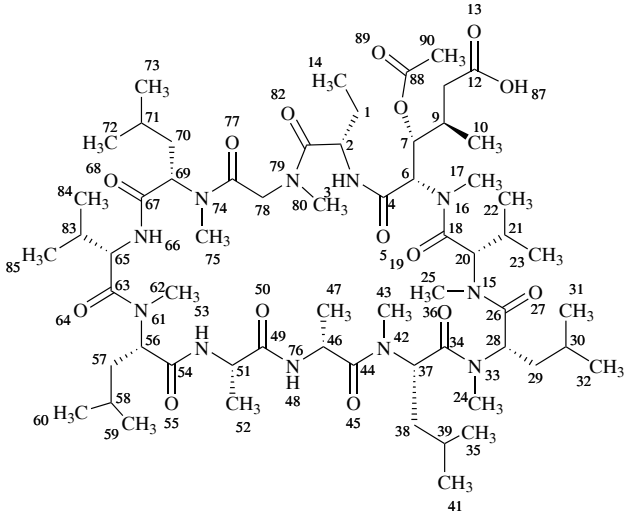


图 3　有关物质 A 的结构

Fig.3　The Chemical Structure of Related Substance A

^{13}C NMR 谱图显示，有关物质 A 结构中有 62 个碳原子；其中，δ 173.8 处为羧基碳，其归属为 12 位碳。δ 173.0、172.9、172.9、172.7、171.4、171.3、170.9、170.3、170.2、170.1、169.7、167.4 处均为羰基碳，分别归属为 4、18、26、35、44、49、54、63、67、76、81、88 位碳；δ 72.4 处的峰归属为 7 号位连接乙酰基的碳；δ 9.9 处的峰归属为 14 号位的甲基碳；由于其他位置的碳原子化学位移相近，较难区分，将之归属为其他位置的 47 个碳原子。根据有关物质 A 的核磁谱图分析，有关物质 A 与目标化合物乙酰化环孢素 A 酸的化学结构相符合。

在合成 **1** 的最后 1 步水解反应中，产生 **1** 的 *Z* 式异构体，即有关物质 B。在不同碱性条件下，产生比例会有明显差异。

有关物质 B 合成对于 **1** 的质量标准及杂质研究十分重要。据文献[12]报道，环孢素 A-β- 三甲基甲硅烷基醇在低温环境下与叔丁醇钾进行反应，得到产物后于盐酸水中脱甲硅基，最终得到 **1** 的

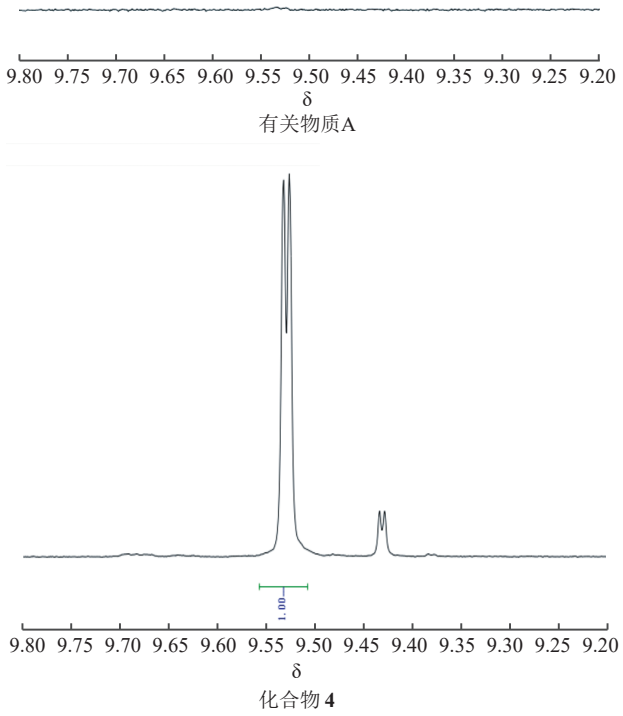


图 4　有关物质 A 和化合物 4 的 ^{1}H NMR 图对比

Fig.4　Comparison of Related Substance A and Compound **4** by ^{1}H NMR

Z 式和 *E* 式双键异构体混合物（94 ∶ 6）。该路线较烦琐，且难以进一步纯化。本研究以乙酰化伏环孢素（**5**）为原料（图 5），乙腈 / 水为溶剂，在三乙胺和溴化锂的作用下进行水解反应，脱除乙酰基的同时将 *E* 式构型翻转为 *Z* 式构型，得到 **1** 的 *Z* 式和 *E* 式双键异构体混合物（99 ∶ 1）。收率 73.2%，纯度 98.72%。该路线简单，且有关物质 B 比例较高。

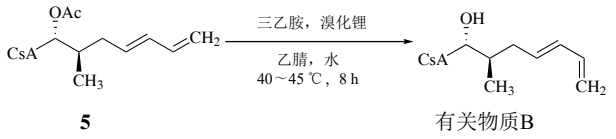


图 5　有关物质 B 的合成路线

Fig.5　Synthesis Route of Related Substance B

最后通过 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、HRMS 等表征方法对有关物质 B 进行结构确证，结果如图 6 所示。

有关物质 B 结构中共含有 111 个氢原子，其

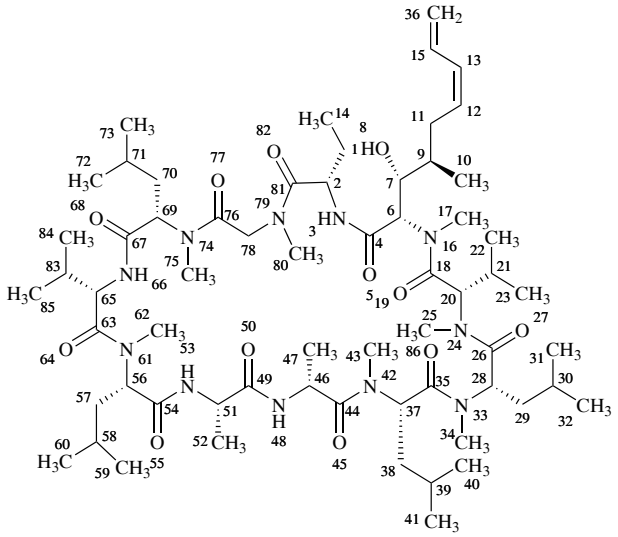


图 6　有关物质 B 的化学结构

Fig.6　The Chemical Structure of Related Substance B

^{1}H NMR 图谱中各峰的化学位移与结构对应。δ 6.20 ～ 6.70、6.00、5.57 ～ 5.67、5.49 ～ 5.55 处的 5 个氢分别归属为 1,3- 共轭二烯双键位上的 15、13、36 和 12 位氢原子，其中 δ 6.20 ～ 6.70 处的峰出现裂分（图 7），与 **1** 有明显区别，且 13 位碳氢发生耦合，耦合常数为 11.5 Hz，说明 12 和 13 位的双键为顺式结构，与文献 [12] 数据一致。

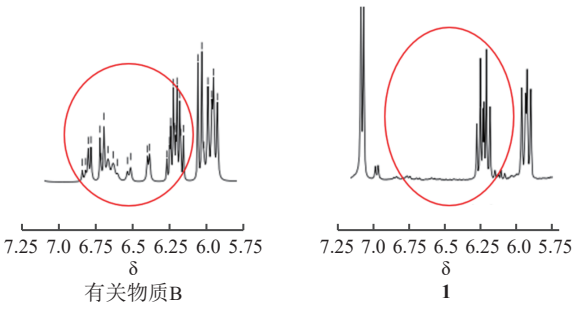


图 7　有关物质 B 和 1 的 ^{1}H NMR 图谱对比

Fig.7　Comparison of Related Substance B and **1** by ^{1}H NMR

有关物质 B 结构中有 63 个碳原子，其中 δ 172.7、172.3、171.8、170.6、170.4、170.3、170.0、169.4、169.4、169.3、166.7 为羰基碳，分别归属为 4、18、26、35、44、49、54、63、67、76、81 位碳；δ 137.2、135.9、132.2、114.5 则归属为 12、13、15、

36 位的 4 个碳原子；δ 76.3 归属为 7 号位的羟基碳；δ 9.4 归属为 14 号位的甲基碳。根据有关物质 B 的核磁谱图分析，结合高分辨质谱数据（*m*/*z*=1 214.848 6），有关物质 B 与目标化合物 **1** 的 *Z* 式异构体的化学结构相符合。

实验部分

乙酰化环孢素 A 酸（有关物质 A）

将乙酰化环孢素 A（**3**，95 g，76.4 mmol，广东态森德制药有限公司）和甲醇（1 055 mL）加至 2 L 反应瓶中，降温至 －40 ℃以下，通入臭氧（使密度达 50 ～ 60 g/m^3）15 h 后，加二甲硫醚（38.9 g，625.8 mmol），于 20 ～ 25 ℃搅拌反应 8 h，得含有关物质 A 的反应液（1.5 L）。

取上述反应液（10 mL），经制备液相色谱［色谱柱 ChromCore 120 C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3 μm）；流动相 A 为 0.1%乙酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—20 min，A 45%—15%；20—24 min，A 15%；24—25 min，A 15%—45%；25—32 min，A 45%）；柱温 60 ℃；检测波长 210 nm；进样量 10.0 μL；洗脱液 甲醇和水（体积比 9 ∶ 1）］分离、纯化，制备液富集后减压浓缩，过滤后得类白色固体，即有关物质 A（100 mg，31.5%）。纯度 93%［HPLC 归一化法：色谱柱 NanoChrom 120 C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3 μm），流动相 A 为 0.1%磷酸水溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—20 min，A 45%—15%；20—24 min，A 15%；24—25 min，A 15%—45%；25—32 min，A 45%）；柱温 60 ℃；检测波长 210 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 5 μL。保留时间为 10.8 min，相对保留时间 0.73］。^{1}H NMR（400 MHz, $CHCl_3$-*d*）δ: 8.20（d, *J*=9.5 Hz, 1H），7.96（d, *J*=7.0 Hz, 1H），7.58（d, *J*=8.9 Hz, 1H），7.32（d, *J*=7.7 Hz, 1H），5.64 ～ 5.58（m, 1H），5.51 ～ 5.46（m, 1H），5.27（dd, *J*=11.4、4.1 Hz, 2H），5.05 ～ 5.09（m, 2H），4.88 ～ 4.93（m, 2H），4.77 ～ 4.82（m, 2H），4.70 ～ 4.74（m, 1H），4.39（dt, *J*=17.1、7.4 Hz, 2H），3.38（s, 3H），3.15（s, 6H），3.00（s, 3H），2.85（s, 3H），2.63（s, 3H），2.59（s, 3H），2.37 ～ 2.43（m, 2H），2.25 ～ 2.28（m, 1H），2.09 ～ 2.13（m, 1H），1.95（s, 4H），1.78 ～ 1.84（m, 2H），1.64 ～ 1.68（m, 2H），1.49 ～ 1.54（m, 2H），1.35 ～ 1.41（m, 4H），1.21 ～ 1.28（m, 10H），0.77 ～ 0.92（m, 42H）。HR-MS（*m*/*z*）: 1 248.817 7［M+H］$^+$。

环［［（6*Z*）-（2*S*,3*R*,4*R*）-3- 羟基 -4- 甲基 -2-（甲基氨基）-6,8- 壬二烯酰基］-L-2- 氨基丁酰基 -*N*- 甲基 - 甘氨酰基 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 缬氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -L- 丙氨酰 -D- 丙氨酰 −*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -*N*- 甲基 -L- 亮氨酰 -*N*- 甲基 -L- 缬氨酰］（有关物质 B）

将 **5**（照文献[11]自制，10.00 g，7.96 mmol）、乙腈（200 mL）、溴化锂（4.84 g，5.57 mmol）加至 500 mL 反应瓶中，搅拌溶清，室温下缓慢滴加三乙胺（2.04 g，20.16 mmol），控温于 40 ～ 45 ℃搅拌反应 8 h，HPLC（条件同有关物质 A。保留时间为 16.2 min，相对保留时间为 1.02）监测反应。反应液减压浓缩后，加乙酸乙酯（40 mL）和 10%氯化铵水溶液（40 mL），搅拌 10 min 后静置分层，有机相经无水硫酸钠干燥后，过滤，滤液减压浓缩，剩余物经柱色谱［洗脱剂：甲醇和二氯甲烷，梯度洗脱（体积比 1 ∶ 99 至 8 ∶ 92）］分离、纯化，得类白色固体，即有关物质 B（5.12 g，53.0%）。mp 133 ～ 141 ℃。纯度 98.79%（条件同有关物质 A）。^{1}H NMR（400 MHz, $CHCl_3$-*d*）δ: 8.32（d, *J*=9.9 Hz, 1H），7.78（d, *J*=7.1 Hz, 1H），7.23（d, *J*=7.6 Hz，1H），7.17（d, *J*=8.1 Hz, 1H），6.20 ～ 6.70（m, 1H），6.00（d, *J*=11.5 Hz, 1H），5.57 ～ 5.67（m, 2H），5.49 ～ 5.55（m, 1H），5.28（dd, *J*=11.3、4.2 Hz, 1H），4.97 ～ 5.09（m, 6H），4.88 ～ 4.90（m, 2H），4.74 ～ 4.78（m, 2H），4.59 ～ 4.64（m, 1H），4.34 ～ 4.41（m, 2H），3.45（s, 3H），3.21（s, 3H），3.13（s, 3H），3.09（s, 3H），3.05（s, 3H），2.98（s, 3H），2.91（s, 3H），2.73（d, *J*=3.8 Hz, 2H），2.27 ～ 2.32（m, 2H），2.02 ～ 2.06（m, 2H），1.88 ～ 1.93（m, 2H），1.67 ～ 1.71（m, 2H），1.55 ～ 1.58（m, 2H），1.41 ～ 1.44（m, 2H），1.15 ～ 1.21（m, 11H），0.79 ～ 0.87（m, 42H）。HR-MS（*m*/*z*）: 1 214.864 6［M+H］$^+$。

参考文献：

[1] 刘甲甲, 潘海波, 冯　磊, 等. 伏环孢素合成路线图解 [J]. 中国药物化学杂志, 2023, **33**(9): 712-716.

[2] MEJÍA-VILET J M, ROMERO-DÍAZ J. Voclosporin: a novel calcineurin inhibitor for the management of lupus nephritis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2021, **17**(9): 937-945.

[3] 张　冰, 王绍杰. 伏环孢素 [J]. 中国药物化学杂志, 2022, **32**(1): 80.

[4] HEO Y. Voclosporin: first approval [J]. *Drugs*, 2021, **81**(5): 605-610.

[5] 夏光涛, 王　霞, 吴　倩, 等. 环孢素用于类风湿关节炎的治疗研究 [J]. 世界临床药物, 2016, **37**(3): 148-150.

[6] GELDER T V, LERMA E, ENGELKE K, *et al*. Voclosporin: a novel calcineurin inhibitor for the treatment of lupus nephritis [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol, 2022,* **15**(5): 515-529.

[7] 杜平中. 两种新型大环内酯类免疫抑制剂 [J]. 中国医药工业杂志, 1995, (7): 330-333.

[8] KUGLSTATTER A, MUELLER F, KUSZNIR E, *et al*. Structural basis for the cyclophilin A binding affinity and immunosuppressive potency of E-ISA247 (voclosporin) [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011, **67**(Pt 2): 119-123.

[9] 许润娟. 药物的杂质及杂质检查 [J]. 中医药学刊, 2005, (7): 1323-1325.

[10] JIANG B, LIU J, LI Y, *et al*. Synthesis and crystallization research of voclosporin [J]. *Org Process Res Dev*, 2024, **28**(4): 1151-1158.

[11] ADAM J M, ABEL M, JAYARAMAN S. Process for preparation of cyclosporin an analog [P]. WO, 2004089960. 2005-01-06.

[12] 帕拉丁实验室有限公司, 伊索泰克尼卡制药股份有限公司, 697937 艾尔伯塔有限公司, 等. 环孢菌素类似物的合成: 中国, 100334106C [P]. 2007-08-29.