一种抗体药物偶联物中间体的制备工艺

技术领域

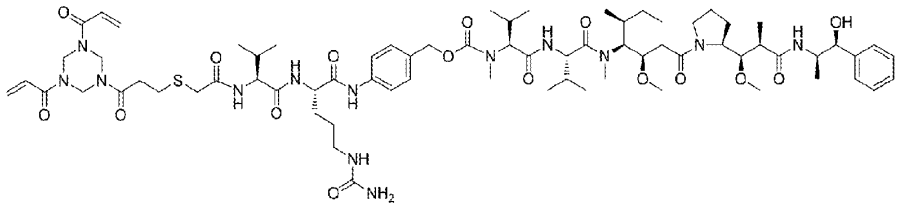
[01] 本发明涉及药物制备领域，具体涉及一种抗体药物偶联物中间体的制备工艺。

背景技术

[02] 抗体药物偶联物（Antibody drug comjugate，简称 ADC）是一类抗肿瘤药物，其包括三个组成部分：抗体部分（Antibody）、连接子部分（Linker）和药物部分（Drug），抗体上连接的药物的个数（Drug-antibody Ratio， DAR）决定了抗体药物偶联物的均一性，连接的药物个数过高会导致药理动力性不稳定、药物代谢速度增加、半衰期减少和全身毒性的增加。

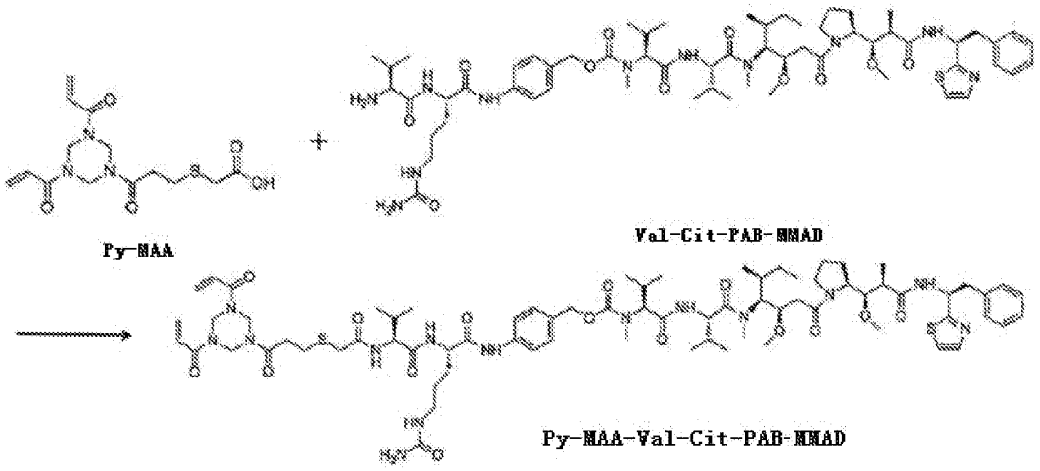
[03] DAR 值的高低主要由连接子决定，经典的 ADC 有两种偶联方式，一种是氨基偶联，一种是巯基偶联，这也是目前最常用的偶联方式。氨基偶联是将药物通过连接子偶联在抗体的赖氨酸（Lys）残基上，由于一个抗体上有 80 个赖氨酸，这 80 个赖氨酸中有大约 30 个可供连接，通过赖氨酸偶联而形成的 ADC，其 DAR 值为 0-30，产物均一性极差。巯基偶联是先将抗体中的链间二硫键打开形成游离的半胱氨酸（Cys）残基，再和能与半胱氨酸残基配对的连接子-药物复合物进行偶联，由于一个抗体上只有 4 对链间二硫键，链间二硫键被全部打开后会形成 8 个游离的半胱氨酸残基，因此通过半胱氨酸残基偶联而形成的 ADC，其 DAR 值为 0-8，尽管巯基偶联能够较好地控制每个抗体上连接的数量，但是链间二硫键的断去会极大的降低抗体的稳定性。

[04] 目前，除经典的氨基偶联和巯基偶联外，还有一种新的偶联方式：桥接偶联，桥接偶联方式是在巯基偶联的基础上开发的一种新的偶联方式，其是将连接子同时于抗体上两个游离的巯基偶联，如此形成的抗体药物偶联物的 DAR 值为 0-4，公开号为 CN107921030A 的中国专利申请中公开了多种能够与抗体以桥接偶联方式共价连接的连接子，其在说明书第 42 页公开了一种如下所示的抗体药物偶联物中间体（Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE）（其中，Py 为 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪，其 CAS 为 959-52-4，可购自百灵威科技有限公司、南京康满林化工实业有限公司）。



Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE

[05] 此外，在该专利申请第 32 页中还公开了一种药物部分是 MMAD（Demethyldolastatin）的抗体药物偶联物中间体（Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD）的制备工艺：

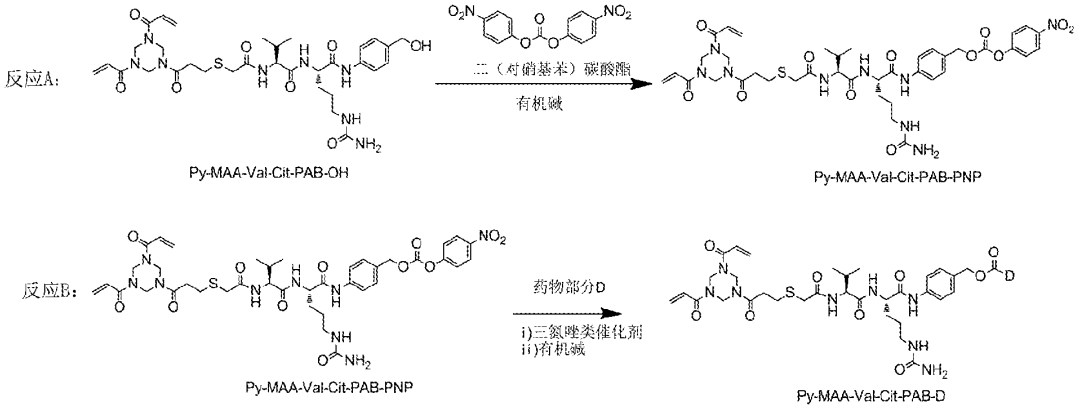


该工艺是先将 Val-Cit-PAB 与药物部分（MMAD）偶联在一起形成 Val-Cit-PAB -MMAD 偶联物后，再与 Py-MAA 反应生成抗体药物偶联物中间体 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD。由于抗体药物偶联物中连接的药物部分（例如 MMAD/MMAE 或 MMAF 等）的价格通常都比较昂贵，通过上述工艺生产药物部分投料损耗较高，因此导致生产成本高，不适于工业化大规模生产。

发明内容

[06] 本发明提供了一种抗体药物偶联物中间体的制备工艺，具体提供了一种包含连接子部分和药物部分的抗体药物偶联物中间体的制备工艺，所述的抗体药物偶联物中间体为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-D，所述中间体中的 Py-MAA-Val-Cit-PAB 为连接子部分，所述中间体中的所述 D 代表连接的

药物部分，其特征在于，包括以下反应路线：



[07]进一步的，所述的制备工艺包括如下反应过程：

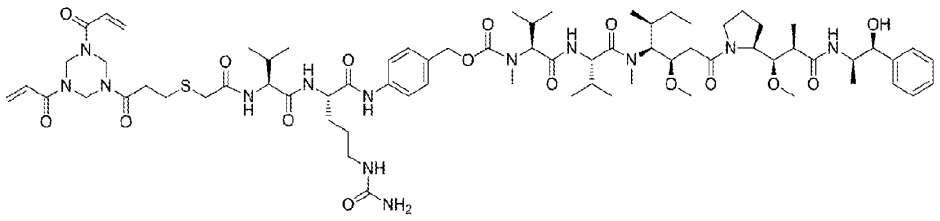
反应 A：将 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 溶于溶剂中，加入二（对硝基苯）碳酸酯，搅拌至溶解或略微浑浊后加入有机碱；

反应 B： 反应 A 结束后，加入三氮唑类催化剂、药物部分 D、有机碱，反应结束后进行纯化，得 Py-MAA-Val-Cit-PAB -D。纯化优选使用 pre-HPLC 纯化。

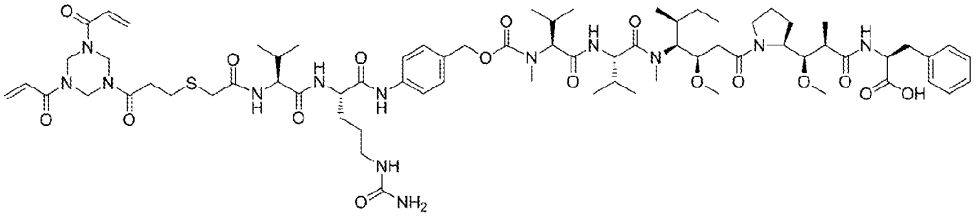
[08] 更进一步的，所述的药物部分 D 为奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒性剂、安曲霉素（Anthramycin）类细胞毒性剂、蒽环(anthracycline)类细胞毒性剂或嘌呤霉素(puromycin)细胞毒性剂。

[09]优选的，所述的奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒性剂为 MMAE、MMAF、MMAD 或其衍生物；所述的安曲霉素（Anthramycin）类细胞毒性剂为安曲霉素；所述的蒽环(anthracycline)类细胞毒性剂为柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、戊柔比星、米托蒽醌；所述的嘌呤霉素(puromycin)细胞毒性剂为嘌呤毒素。

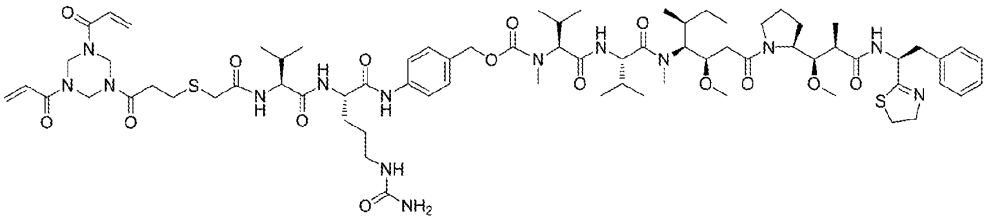
[10] 优选的，所述的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-D 的结构如式（1-11）所示：



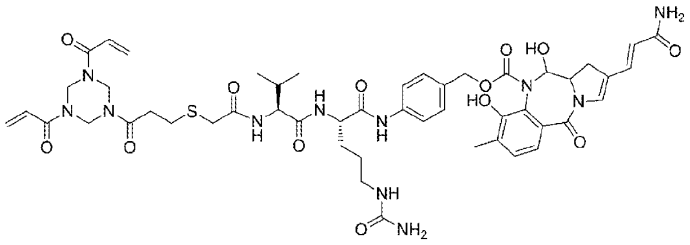
（1）



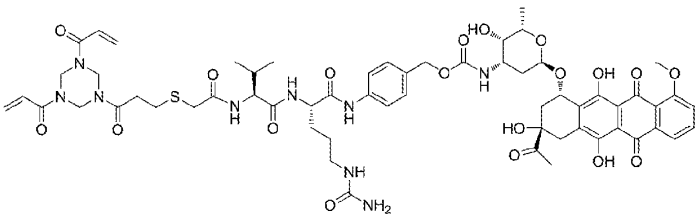
(2)



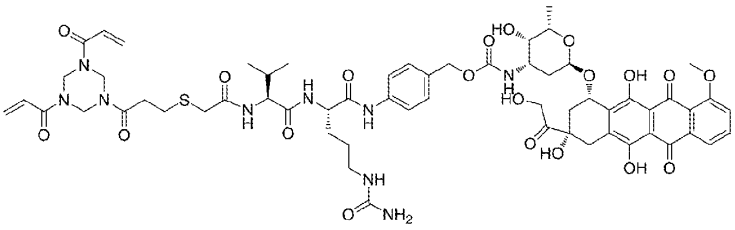
(3)



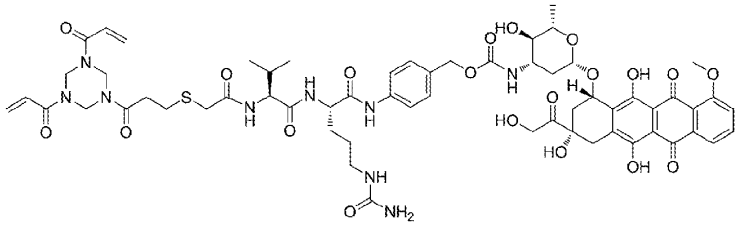
(4)



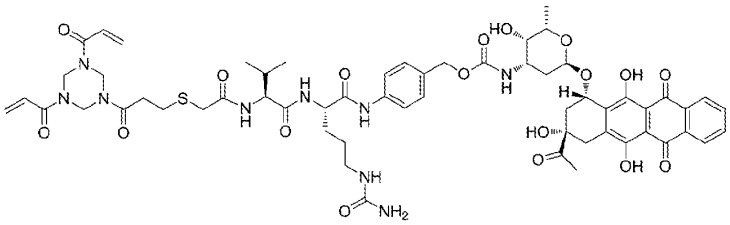
(5)



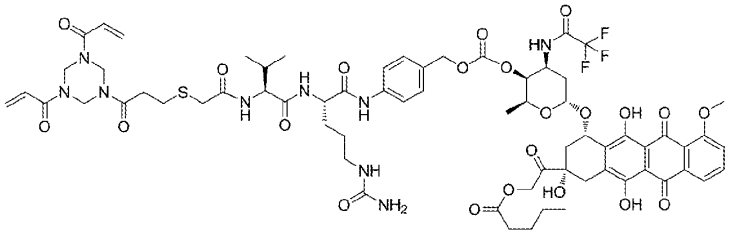
(6)



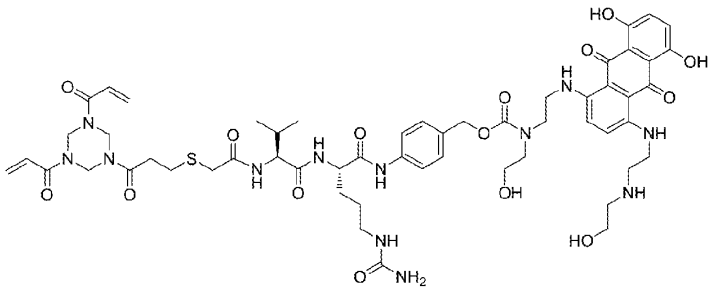
(7)



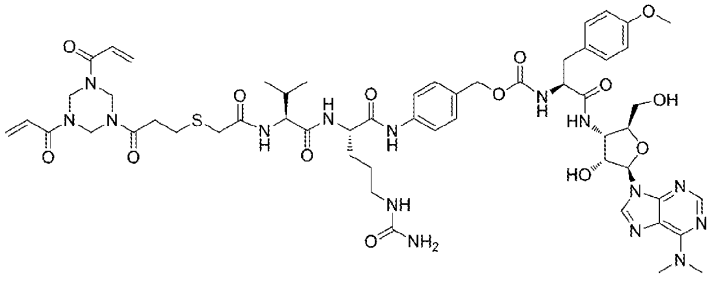
(8)



(9)



(10)



(11)

。

[11]进一步的，所述的溶剂为极性溶剂和/或非极性溶剂，所述的极性溶剂为 DMF、DMA、NMP 的一种或几种；所述的非极性溶剂为二氯甲烷、四氯化碳的一种或几种。

[12] 进一步的，所述的有机碱为 N，N 二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶的一种或几种，优选为 N，N 二异丙基乙胺、吡啶的一种或两种。

[13] 进一步的，所述的三氮唑类催化剂为 1-羟基苯并三氮唑 、1- 羟 基 -7-偶氮苯并三氮唑、1-羟基-1H-1,2,3-三唑-4-羧酸乙酯的一种或几种，优选为 1-羟基苯并三氮唑。

[14] 进一步的，所述反应 A 的反应温度为 5-35℃，反应时间为 2-10 小时。

[15] 优选的，所述反应 A 中在加入二（对硝基苯）碳酸酯前控制反应体系温度为 5-15℃，进一步优选温度为 10℃。

[16] 优选的，所述的反应 A 在加入有机碱后，控制体系反应温度为 20-35℃之间，优选为 30℃。

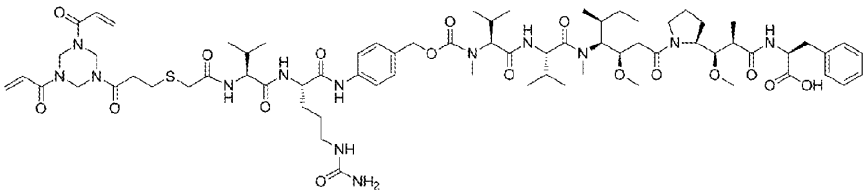
[17] 进一步的，所述反应 B 的反应温度为 5-30℃，反应时间为 15-48 小时。

[18] 优选的，所述的反应 B 中，在加入三氮唑类催化剂前控制反应体系的温度为 5-15℃，优选为 10℃。

[19] 优选的，所述的反应 B 中，在加入有机碱后，控制体系反应温度为 15-30℃，优选为 20℃。进一步的，所述反应 A 中 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 和二（对硝基苯）碳酸酯以及有机碱的摩尔比为 1：1-5：1-3。

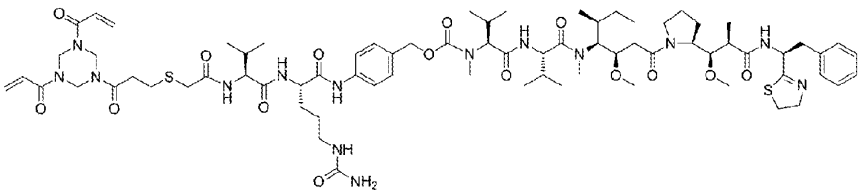
[20] 进一步的，所述反应 B 中三氮唑类催化剂、MMAE、有机碱和 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 的摩尔比为 1-3：1-3：1.5-30：1。

[21]进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAF，其结构如式（2）所示：



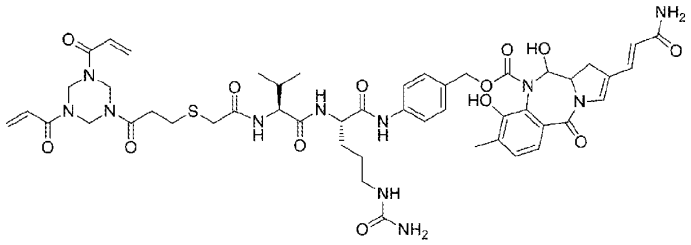
(2)

[22] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD，其结构如式（3）所示：



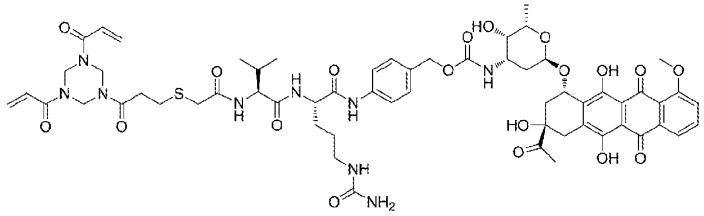
(3)

[23] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（4）所示：



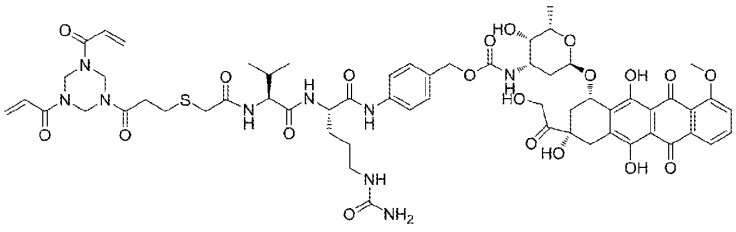
(4)

[24] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（5）所示：



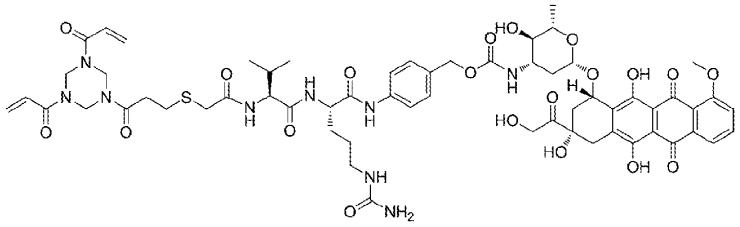
(5)

[25] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（6）所示：



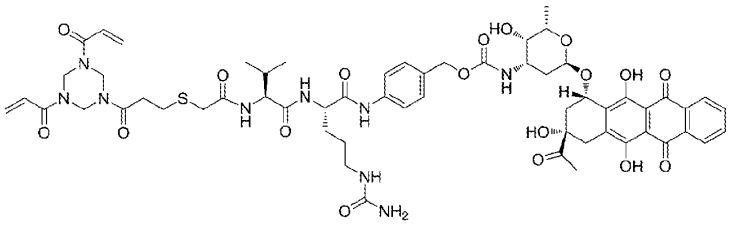
(6)

[26] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（7）所示：



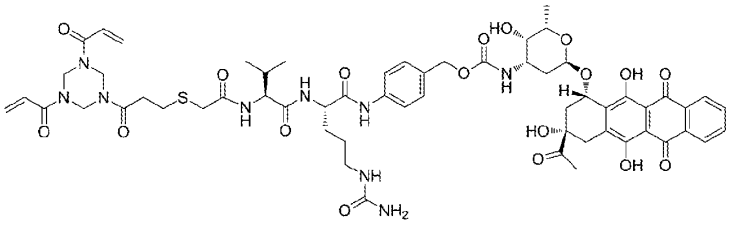
(7)

[27] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（8）所示：



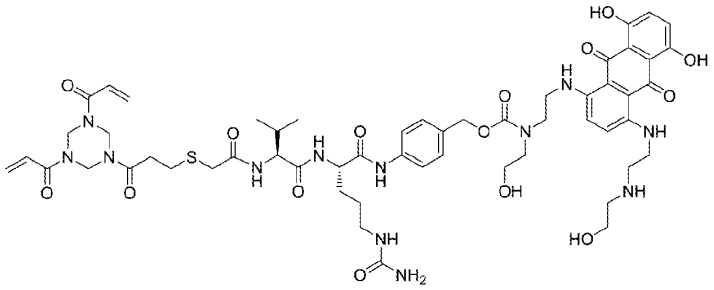
(8)

[28] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（9）所示：



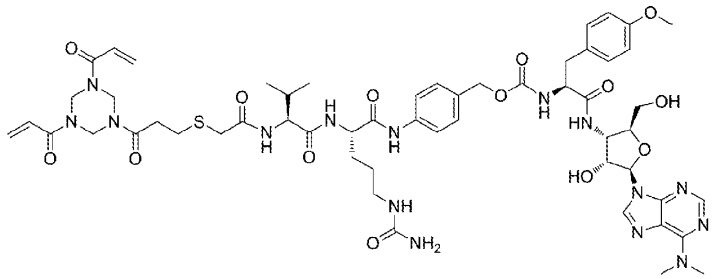
(9)

[29] 进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（10）所示：



(10)

[30]进一步的，本发明还提供了利用上述任一制备工艺制备抗体药物偶联物中间体，所述的抗体药物偶联物中间体的结构如式（11）所示：



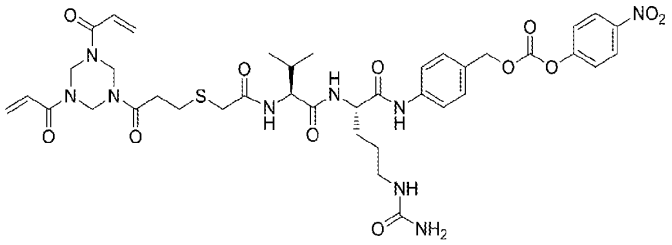
（11）

[31] 在一些特定的实施例中，所述的工艺包括如下步骤：

反应 A：将 Py-MAA-Val-Cit-PAB 溶于 DMF 中，加入二（对硝基苯）碳酸酯，搅拌至溶解或略微浑浊后滴加 N,N-二异丙基乙胺，分离纯化，得 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP；

反应 B：将 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 溶于 DMF 中，加入 1-羟基苯并三氮唑、MMAE、N,N-二异丙基乙胺和吡啶，反应结束后进行 pre-HPLC 纯化，得到如结构式（1）所示的化合物 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE。

其中所述的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 的结构如下所示：



Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP

[32] 更进一步的，上述反应过程中的分离纯化可以是以下操作：

（1）将反应 A 的反应液离心，获取上清液；

（2）向上清液中加入溶剂 1，搅拌均匀；

（3）在 0-10℃条件下滴加溶剂 2，搅拌均匀；

（4）抽滤，取滤饼；

（5）将滤饼复溶于溶剂 3 和溶剂 4 的混合溶液中；

（6）在 0-10℃条件下滴加到溶剂 5 中，搅拌；

（7）抽滤得类白色粉末，即为纯化后的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP。

其中，溶剂 1 为中等极性溶剂，优选为乙酸乙酯，二氯甲烷，甲醇，

甲基叔丁基醚等，最优选为乙酸乙酯；

溶剂 2 为小极性溶剂，优选为石油醚，正己烷，正戊烷，环己烷等，最优选为石油醚；

溶剂 3 和 4 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 易溶的溶剂，优选为乙酸，三氟乙酸，甲酸，甲醇，乙醇等，最优选为乙酸和甲醇；

溶剂 5 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 不易溶的溶剂，优选为乙腈，乙酸乙酯，二氯甲烷，水等，最优选为水。

所述的溶剂 1、溶剂 2、溶剂 3 和溶剂 4 和 Py-MAA-Val-Cit-PAB 的体积重量比为 40-100:80-200:5-15:1-3:15-30:1。

[33] 在某些特定的实施例中，上述分离纯化可以是以下操作：

（1）将中间产物 A 离心，获取上清液；

（2）向上清液中加入乙酸乙酯，搅拌均匀；

（3）在 0-10℃条件下滴加石油醚，搅拌均匀；

（4）抽滤，取滤饼；

（5）将滤饼复溶于乙酸和甲醇的混合溶液中；

（6）在 0-10℃条件下滴加纯化水，搅拌；

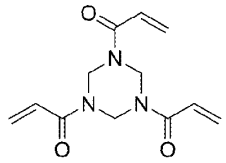
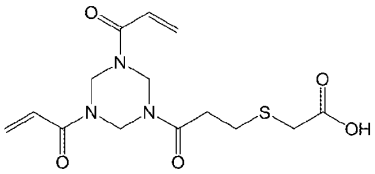
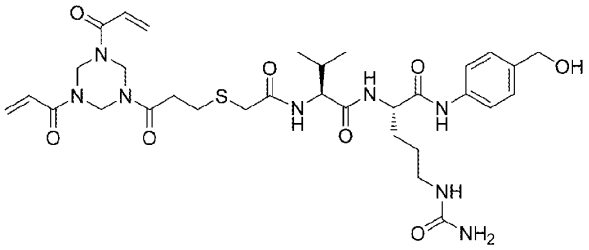
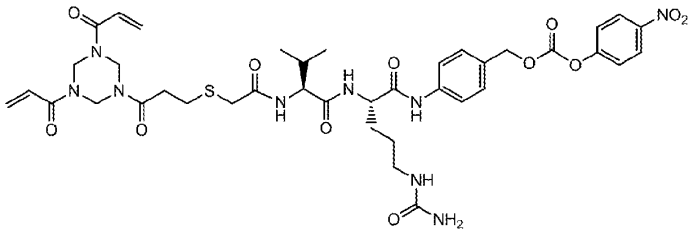
（7）抽滤得类白色粉末，即为纯化后的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP。

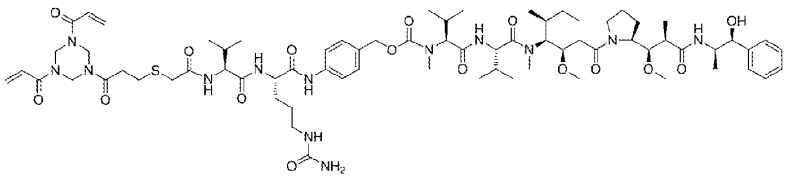
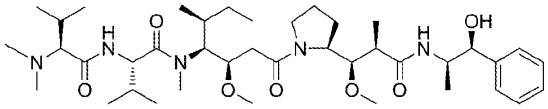
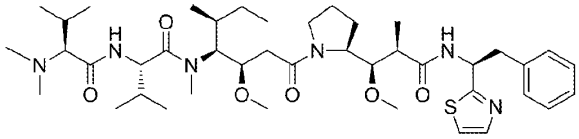
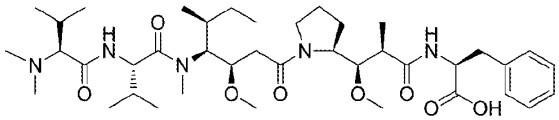
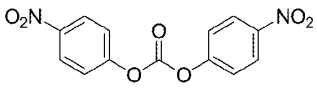
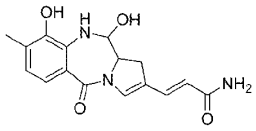
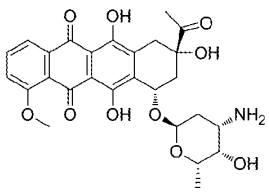
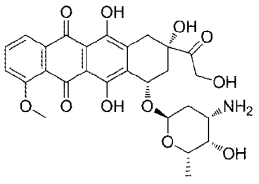
[34] 与公开号为 CN107921030A 的中国专利的说明书 43 页公开的抗体药物偶联物中间体（Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD）的制备工艺相比，本发明提供的抗体药物偶联物中间体的制备工艺由于药物部分是在最后一步参与的反应，显著地降低了药物部分（例如 MMAD/MMAE 或 MMAF 等）投料的损耗，有效地降低了生产成本，提高了生产效益。。另外，本发明提供的工艺简单、对环境友好，适于工业化大规模推广。

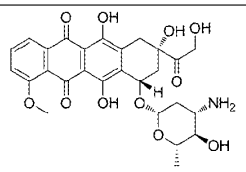
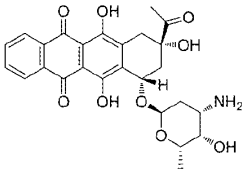
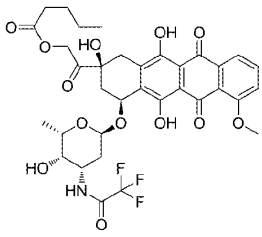
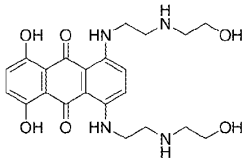
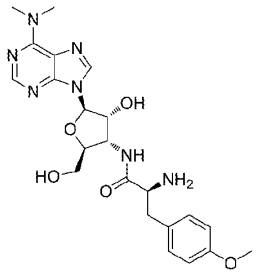
具体实施方式

[35] 缩写

缩写	结构/中文名/英文名

Py	 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪 Triacryloylhexahydro triazine
Py-MAA	 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-巯基乙酸 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid
Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH	 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-巯基乙酸-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苯甲醇基 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid-valine-citrulline-p-aminobenzyl alcohol
Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP	 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-nitrophenyl ester

Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE	 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl Monomethyl auristatin E
MMAE	
MMAD	
MMAF	
NPC	 二（对硝基苯）碳酸酯
安曲霉素	
柔红霉素	
阿霉素	

表阿霉素	
伊达比星	
戊柔比星	
米托蒽醌	
喋呤毒素	

[36] 定义

[37] 除非另有定义，本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。

[38] 尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值，但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而，任何数值本来就必然含有一定的误差，其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外，本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围；也就是说，所有以最小值 1 或更大起始的子范围，例如 1 至 6.1，以及以最大值 10 或更小终止的子范围，例如 5.5 至 10。另外，任

何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

[39] 另外应注意，如本说明书中所使用的，单数形式包括其所指对象的复数形式，除非清楚且明确的限于一个所指对象。术语“或”可与术语“和/或”互换使用，除非上下文另有清楚指明。

[40] 本发明所使用的术语“抗体药物偶联物”表示抗体/抗体功能性片段、连接子、药物部分经过化学反应连接在一起的化合物，其结构通常由三部分组成：抗体或抗体类配体、药物部分、以及将抗体或抗体类配体及药物偶联起来的连接子（linker）。目前抗体药物偶联物的制备通常分为两步：第一步是将连接子与药物部分通过化学反应形成“连接子-药物”偶联物，第二步是将“连接子-药物”偶联物中的连接子部分与抗体/抗体功能性片段通过巯基或者氨基共价偶合在一起。本发明所使用的术语“抗体药物偶联物中间体”是指上述所述的“连接子-药物”偶联物，进一步的，本发明涉及的“抗体药物偶联物中间体”泛指那些连接子和药物之间通过胺酯交换形成“-CO-NH-”键偶合在一起的“连接子-药物”偶联物。

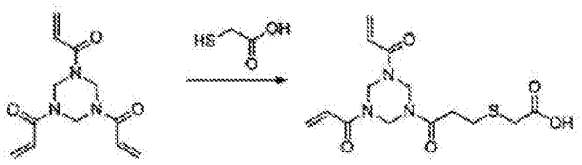
[41] 本发明所使用的术语“连接子”以及“连接子部分”是指抗体药物偶联中将抗体与药物相连接的部分，其可以是可切割的或者不可切割的。可切割的连接子(即可断裂的连接子或生物可降解连接子)可以在靶标细胞内或其上断裂，从而释放药物。在一些实施方案中，本发明的连接子选自可切割的连接子，例如基于二硫化物的连接子(其在巯基浓度更高的肿瘤细胞中选择性断裂)、肽连接子(其被肿瘤细胞中的酶所切割)、腙连接子。在另一些实施方案中，本发明的接头选自不可切割的连接子（即，不可断裂的连接子），例如硫醚连接子。在又一些实施方案中，本发明的连接子为可断裂连接子与不可断裂连接子的组合。

[42] 本发明所使用的术语“药物”以及“药物部分”泛指任何具有期望的生物活性，并具有反应性官能团以便制备本发明所述偶联物的化合物。期望的生物活性包括诊断、治愈、缓解、治疗、预防人或其它动物的疾病。随着新型药物不断被发现和发展，这些新药也应纳入本发明所述的药物中。具体的，所述的药物包括但不限于细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或传染性疾病的药物。更具体的，所述的药物包括但不限于微管蛋白抑制剂或者 DNA、RNA 损伤剂。

[43] 实施例

[44] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解，鉴于上文提供的定义及一般描述，可以实施各种其他实施方案。

[45] 实施例 1 Py-MAA 的制备

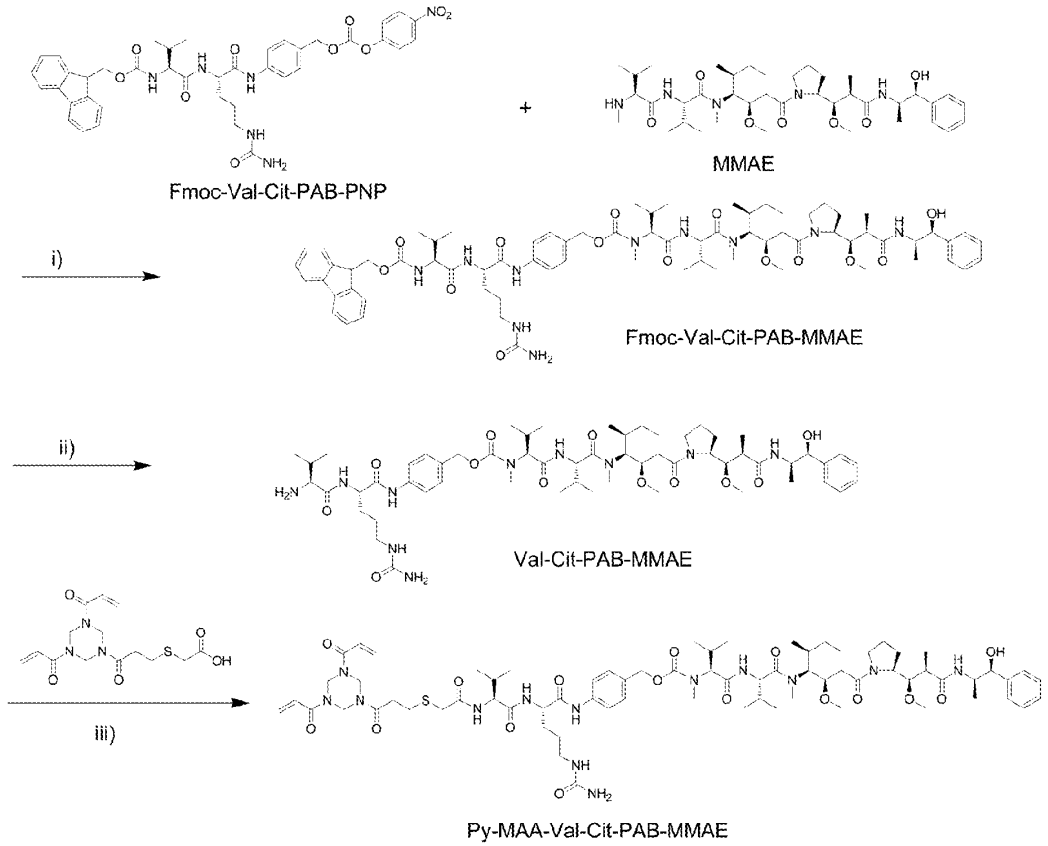


Py Py-MAA

[46] 将化合物 Py(1 .87g ,7 .51mmol)（CAS:959-52-4）和 Et_3N(104 μL ,0.75mmol)溶于无水 CH_2Cl_2(40mL)，逐滴加入巯基乙酸(103.9 μL ,1.50mmol)的 CH_2Cl_2(40mL)溶液；滴加完毕后，将体系升至室温下搅拌过夜。反应结束后，真空去除溶剂，粗产品通过柱层析纯化得到白色固体 Py-MAA (1 .87g ,40.1%)。

[47] 实施例 2 对照例：Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 的制备（公开号为 CN107921030A 的中国专利的说明书第 32 页公开的工艺）

[48] 工艺流程及方法如下所示：



[49] （1）Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE 的制备

[50] 在 0℃氮气保护下取 Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP(388.4mg ,0 .507mmol)溶于 DMF(40ml)，加入 HOBt(68.4mg，0.507mmol)和化合物 MMAE(400.0mg ,0 .558mmol)。15 分钟后，加入吡啶(8ml)和 DIPEA(106.2μL ,0 .608mmol)，并在 0℃下反应 30min。然后升至室温下搅拌 3 小时。向反应混合物反应混合物补加 DIPEA (106.2μL ,0 .608mmol)，室温下继续反应 24h。反应结束后，将混合物真空浓缩。粗产品通过柱层析纯化，得到白色固体化合物 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE (325mg ,收率 47.7%)。

[51] （2）Val-Cit-PAB-MMAE 的制备

[52] 将化合物 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE (325mg ,0 .289mmol)溶于 DMF(6ml)，加入二乙胺(3mL)，继续搅拌反应 2 .5h。反应结束后，减压去除溶剂，得到粗产品 Val-Cit-PAB-MMAE (220mg，收率 67.8%)，无需纯化，可直接进行下一步反应。

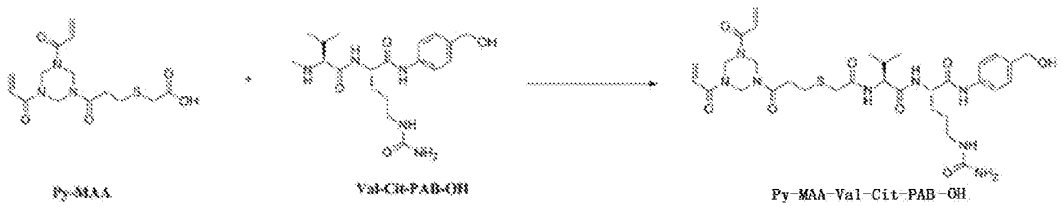
[53] （3）Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 的合成

[54] 取化合物 Py-MAA (80.2mg ,0 .235mmol) ，HOBt (31.8mg ,0 .235mmol) 和 DIC (29.6mg,0 .235mmol)溶于 DMF (10ml) ，冰浴降温至 0℃。将化合物 Val-Cit-PAB-MMAE (220.0mg , 0 .196mmol)和 DIPEA (25.3mg ,0 .196mmol)加入到反应溶液液中，升至室温下反应 24h。反应结束后，粗产品通过柱层析纯化(甲醇：二氯甲烷＝60：1-30：1)，得到白色固体化合物 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE (147.4mg ,收率 52%)。LCMS m/z(ES+)，1445 .78 (M+H)+。

[55] 公开号为 CN107921030A 的中国专利的说明书第 32 页公开的 Py-MAA-Val-Cit-PAB- MMAD 的制备工艺制备 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE，MMAE 的投放量为 400mg，得到 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 为 147.4mg。

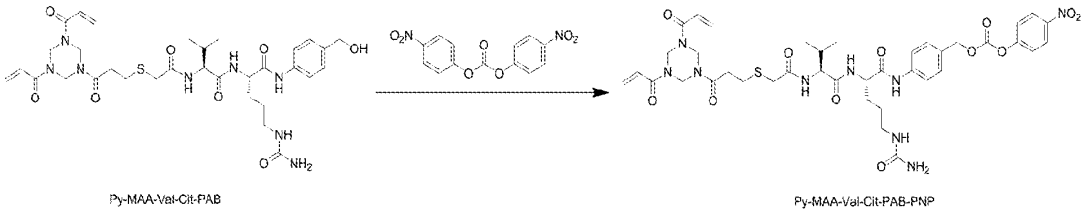
[56] 实施例 3 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 的改进制备法

[57] （1）Py-MAA-Val-Cit-PAB 的制备



[58] 将化合物 Py-MAA（10.00 g，29.33 mmol）置于四氢呋喃（200mL）中，加入 N'N-羰基二咪唑（7.13 g，44.00mmol），Val-Cit-PAB-OH（13.34 g，35.20 mmol），室温搅拌 24 小时。加入石油醚（200mL），搅拌 0.5 小时，过滤，得到白色固体。白色固体用制备型高效液相进行纯化，制备液减压旋蒸后得到 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH（6.67g，32.4%，白色固体粉末）。

[59] （2）Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 的制备



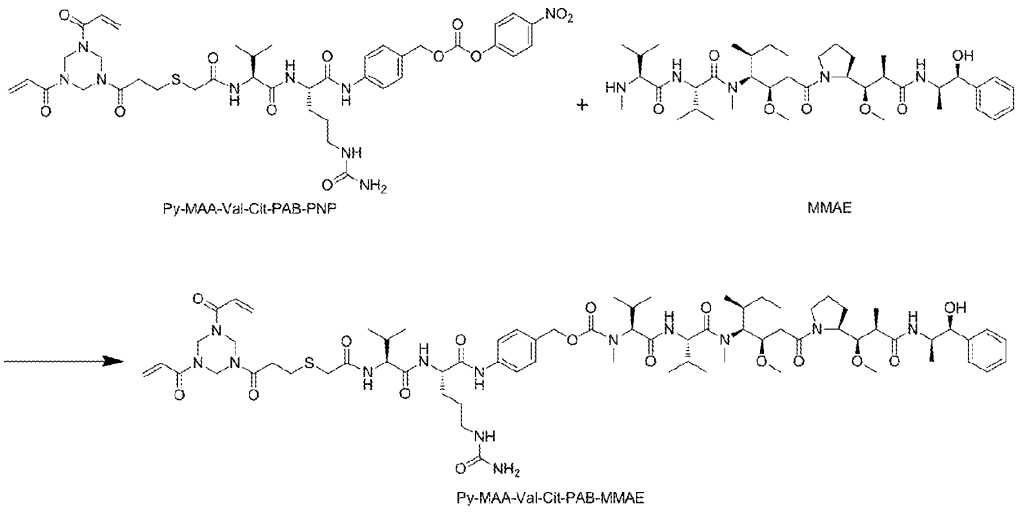
[60] 在氮气保护下往三口烧瓶中加入 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH（10.00g，

1.0eq）、DMF（$V_{DMF}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$ =15~25 mL/g），氮气保护下搅拌至固体溶解或略微浑浊。三口烧瓶降温至 10℃，一次性加入 NPC（1.5~2.5 eq,6.50~10.83g）固体，搅拌至溶解或略微浑浊。氮气保护下，滴加 DIPEA（1.0~1.5 eq，1.84~2.76g）。升温至 30℃， UPLC 监控反应，直至 Py-MAA-Val-Cit-PAB 纯度少于 5.0%，停止反应。

[61] 将反应液离心，上清液倒入大小合适的烧杯中，加入 EA（$V_{EA}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$=60±2），用电动搅拌机搅拌；0~6℃下滴加 PE（$V_{PE}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$ =120±2），滴加完毕再搅拌 20~30 min。抽滤取滤饼。得将滤饼用乙酸（$V_{AcOH}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$ =7）和甲醇（$V_{MeOH}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$）溶解得溶液。

[62] 将纯化水（$V_{水}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB}$ =21）倒入大小合适的烧杯中，机械搅拌，降温至约 3℃。将上述溶液滴加到纯化水中，滴加完毕再搅拌 15 分钟，抽滤得滤饼，冻干后得 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP （白色至类白色粉末，10.69g，收率为 86.54%）。

[63] （3）Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 的制备



[64] 向反应容器中加入 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP（9.00g, 1.0 eq），DMF（$V_{DMF}/W_{Py\text{-}MAA\text{-}Val\text{-}Cit\text{-}PAB\text{-}PNP}$= 15.0~25.0 mL/g），氮气保护下搅拌至澄清或略微浑浊。保持内温 10℃，加入 HOBt（2.10g，1.5 eq），搅拌 20 分钟。加入 MMAE（8.93g, 1.2 eq），继续搅拌 20 分钟。滴加 DIPEA（1.34g, 1.0 eq）和吡啶（$V_{吡啶}/V_{DIPEA}$ = 5）的混合溶液，升温并保持内温在 20℃。反应 36 小时后，每隔 1 小时进行 1 次 UPLC 监控，当反应液中 MMAE

的纯度<2.00%时，终止反应。

[65] 取一大小合适的烧杯，加入饱和氯化钠水溶液（记为 brine, $V_{brine}/V_{反应液}$= 10），降温至内温为 5℃。将反应液滴加至饱和氯化钠溶液中。离心得粗品，将粗品用制备型高效液相进行纯化。冻干得 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE （白色粉末，9.79g，收率为 65.27%）。

[66] 本实施例中 MMAE 的投放量为 8.93g，得到 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 为 9.79g。

[67] 对比实施例 2、实施例 3 提供的工艺中 MMAE 的投入量和最终产品的质量（对比结果如表 1 所示），从表 1 中我们可以看出，利用实施例 2 的制备工艺制备的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 最终得到量为 147.4mg，而 MMAE 的投放量为 400mg；利用实施例 3 的制备工艺制备的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 最终得到量为 9.79g，而 MMAE 的投放量为 8.93g。

表 1 MMAE 投放量及最终产物得到量对比

实施例	MMAE 的投放量	Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 最终得到量	MMAE 投入产出率（MMAE 的投入量/ Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 最终得到量）	与对照例（实施例 2）相比投料用量降低百分比
实施例 2	400mg	147.4mg	2.71	_
实施例 3	8.93g	9.79g	0.91	66.4%

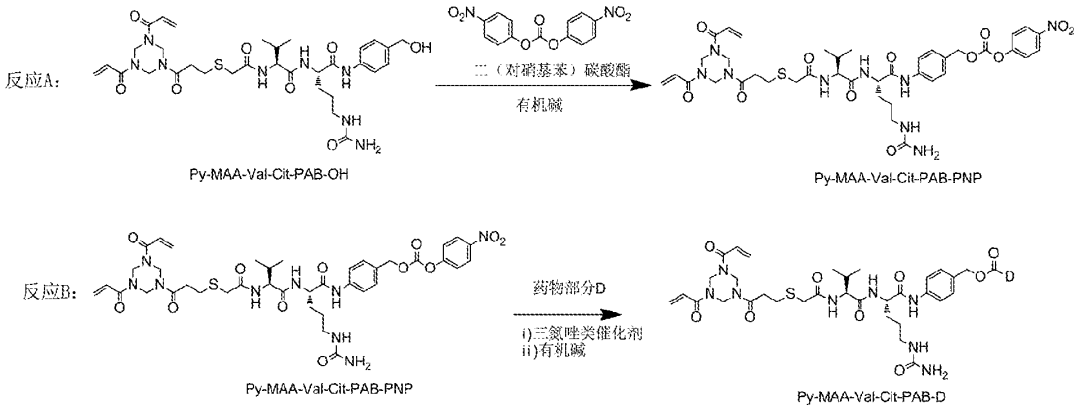
[68] MMAE 投入产出率代表每制备获得 1 单位质量的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 需投入多少单位质量的 MMAE，从表 1 中可以看出，采用实施例 2 的方法，制备 1 单位质量的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 需投入 2.71 单位质量的 MMAE，而采用实施例 3 的方法，则只需要投入 0.91 单位质量的 MMAE，投料用量降低 66.4%，显著的降低了生产成本。

[69] 以上描述地仅是优选实施方案，其只作为示例而不限制实施本发明所必需特征的组合。所提供的标题并不意指限制本发明的多种实施方案。术语例如“包含”、“含”和“包括”不意在限制。此外，除非另有说明，没有数词修饰时包括复数形式，以及“或”、“或者”意指“和/或”。除非本文另有定义，本文使用的所有技术和科学术语的意思与本领域技术人员通常理解

的相同。

[70] 本申请中提及的所有公开物和专利通过引用方式并入本文。不脱离本发明的范围和精神，本发明的所描述的方法和组合物的多种修饰和变体对于本领域技术人员是显而易见的。虽然通过具体的优选实施方式描述了本发明，但是应该理解所要求保护的本发明不应该被不适当地局限于这些具体实施方式。事实上，那些对于相关领域技术人员而言显而易见的用于实施本发明的所描述的模式的多种变体意在包括在随附的权利要求的范围内。

1. 一种包含连接子部分和药物部分的抗体药物偶联物中间体的制备工艺，所述的抗体药物偶联物中间体为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-D，所述中间体中的 Py-MAA-Val-Cit-PAB 为连接子部分，所述中间体中所述 D 代表连接的药物部分，所述连接的药物部分含有游离的氨基基团，其特征在于，包括以下反应路线：



2.权利要求 1 所述的制备工艺，其特征在于：

反应 A：将 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 溶于溶剂中，加入二（对硝基苯）碳酸酯，搅拌至溶解或略微浑浊后加入有机碱；

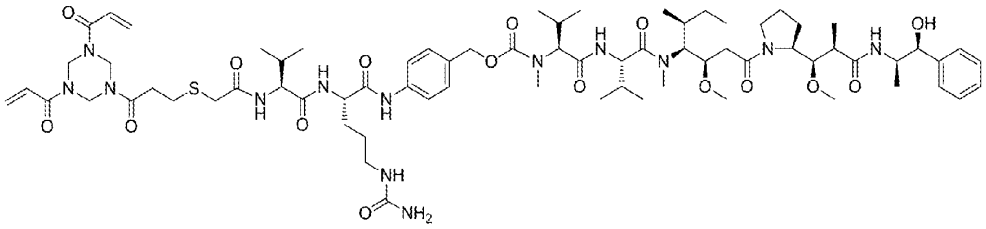
反应 B：反应 A 结束后，加入三氮唑类催化剂、药物部分 D、有机碱，反应结束后进行纯化，获得 Py-MAA-Val-Cit-PAB -D。

3.权利要求 1 或 2 所述的制备工艺，其特征在于：所述的药物部分 D 为奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒性剂、安曲霉素（Anthramycin）类细胞毒性剂、蒽环(anthracycline)类细胞毒性剂或嘌呤霉素(puromycin)细胞毒性剂。

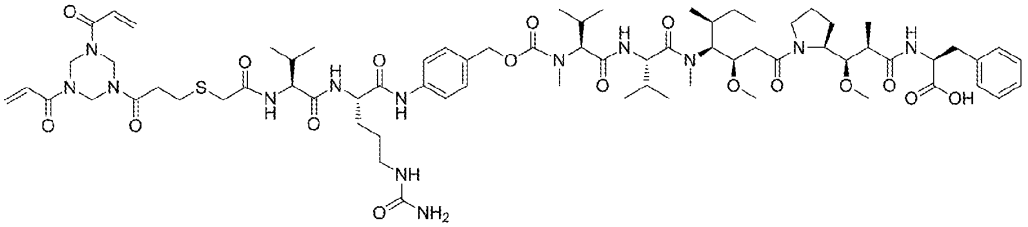
4.权利要求 3 所述的制备工艺，其特征在于：所述的奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒性剂为 MMAE、MMAF、MMAD 或其衍生物；所述的安曲霉素（Anthramycin）类细胞毒性剂为安曲霉素或其衍生物；所述的蒽环(anthracycline)类细胞毒性剂为柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、戊柔比星、米托蒽醌或其衍生物；所述的嘌呤霉素(puromycin)细胞毒性剂为嘌呤毒素或其衍生物。

5. 权利要求 4 所述的制备工艺，其特征在于：所述的

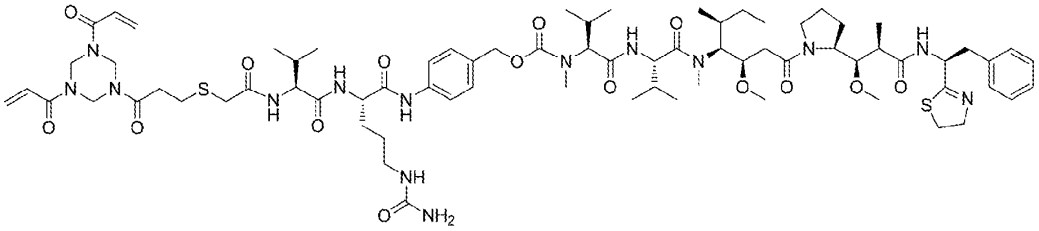
Py-MAA-Val-Cit-PAB-D 的结构如式（1-11）所示：



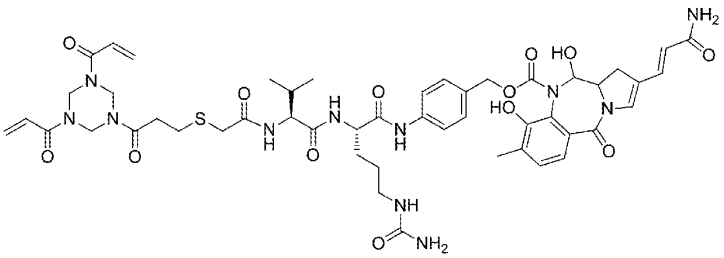
（1）



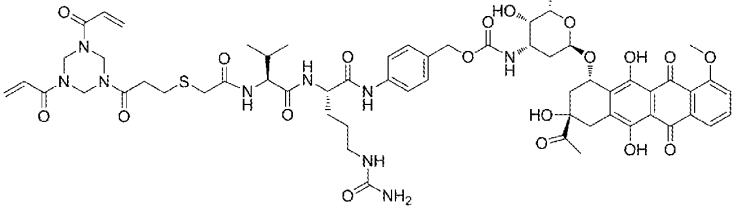
（2）



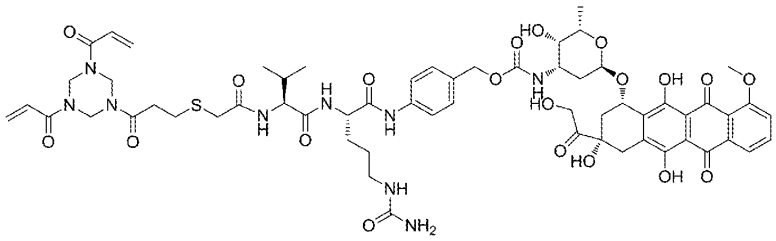
（3）



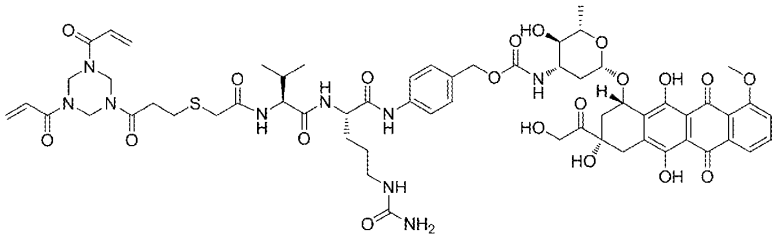
（4）



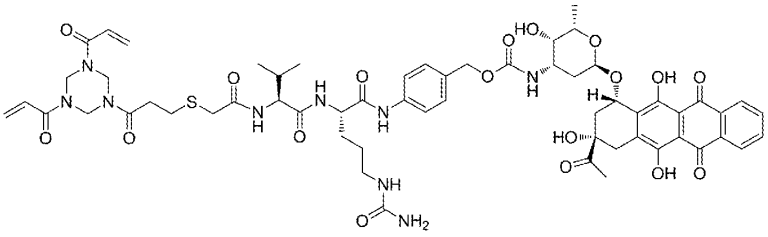
（5）



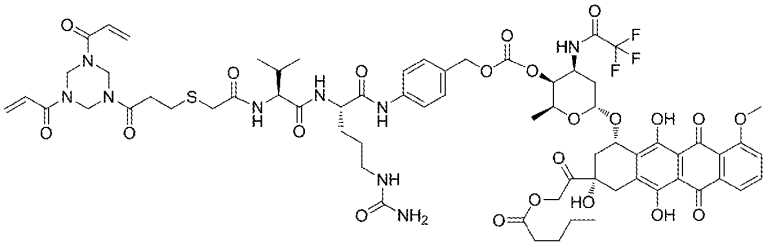
(6)



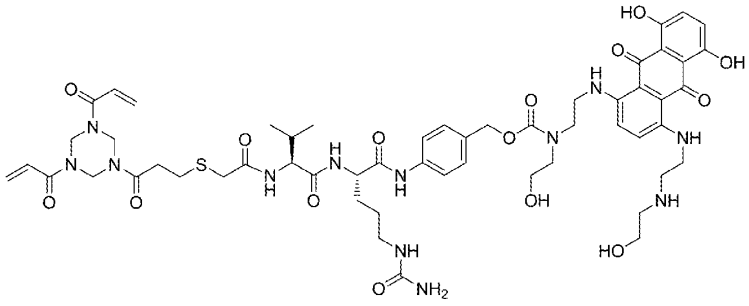
(7)



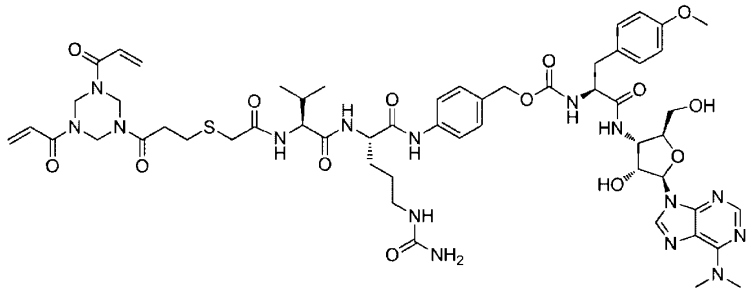
(8)



(9)



(10)



(11)

。

6.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于所述的溶剂为极性溶剂和/或非极性溶剂，所述的极性溶剂为 DMF、DMA、NMP 的一种或几种；所述的非极性溶剂为二氯甲烷、四氯化碳的一种或几种。

7.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于所述的有机碱为 N，N 二异丙基乙胺、三乙胺、吡啶的一种或几种，优选为 N，N 二异丙基乙胺、吡啶的一种或两种。

8.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于所述的三氮唑类催化剂为 1-羟基苯并三氮唑、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑、1-羟基-1H-1,2,3-三唑-4-羧酸乙酯的一种或几种，优选为 1-羟基苯并三氮唑。

9.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应 A 中在加入二（对硝基苯）碳酸酯前控制反应体系的温度为 5-15℃，进一步优选为 10℃；进一步优选的，所述的反应 A 在加入有机碱后，控制体系反应温度为 20-35℃，优选为 30℃。

10.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应 B 在加入三氮唑类催化剂前控制反应体系的温度为 5-15℃，优选为 10℃；进一步优选的，所述的反应 B 中，在加入有机碱后，控制体系反应温度为 15-30℃，优选为 20℃。

11.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应 A 中 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 和二（对硝基苯）碳酸酯以及有机碱的摩尔比为 1：1-5：1-3。

12.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应 B 中三氮唑类催化剂、MMAE、有机碱和 Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH 的摩尔比为 1-3：1-3：1.5-30：1。

13.根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应 B 结束后进行 pre-HPLC 纯化，获得 Py-MAA-Val-Cit-PAB-D。

14. 根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，反应 A 通常过以下方法纯化获得 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP：

（1）将反应 A 的反应液离心，获取上清液；

（2）向上清液中加入溶剂 1，搅拌均匀；

（3）在 0-10℃条件下滴加溶剂 2，搅拌均匀；

（4）抽滤，取滤饼；

（5）将滤饼复溶于溶剂 3 和溶剂 4 的混合溶液中；

（6）在 0-10℃条件下滴加到溶剂 5 中，搅拌；

（7）抽滤得类白色粉末，即为纯化后的 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP；

其中，溶剂 1 为中等极性溶剂，优选为乙酸乙酯，二氯甲烷，甲醇，甲基叔丁基醚等，最优选为乙酸乙酯；溶剂 2 为小极性溶剂，优选为石油醚，正己烷，正戊烷，环己烷等，最优选为石油醚；溶剂 3 和 4 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP 易溶的溶剂，优选为乙酸，三氟乙酸，甲酸，甲醇，乙醇等，最优选为乙酸和甲醇；溶剂 5 优选为乙腈，乙酸乙酯，二氯甲烷，水等，最优选为水。

15. 根据前述任一权利要求所述的制备工艺，其特征在于，所述反应均在氮气保护下进行。