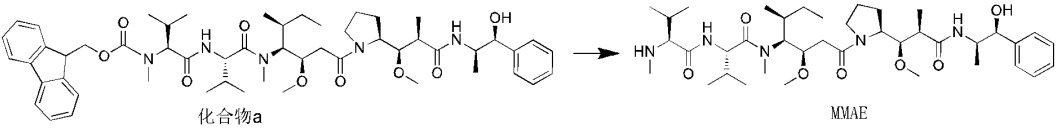


一种甲基奥瑞他汀 E 化合物的制备及纯化方法

技术领域

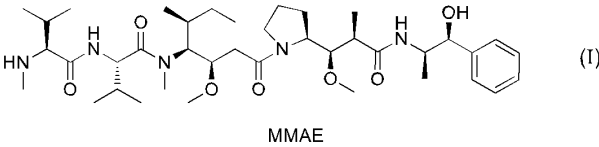
- [1] 本发明涉及化合物合成方法领域，具体涉及甲基奥瑞他汀 E 化合物（即 MMAE）的制备及纯化方法。
- [2] MMAE（Monomethyl Auristatin E，也称甲基奥瑞他汀 E），是一种奥瑞他汀类的全合成衍生物，其能通过抑制微管蛋白聚合而起到有效的有丝分裂抑制作用，目前已广泛用做细胞毒性小分子载荷用于开发抗体药物偶联物（Antibody drug conjugate，简称 ADC）以治疗癌症。
- [3] 公开号为 CN105143199A 的中国专利在说明书的第 29 页公开了一种 MMAE 的制备方法：



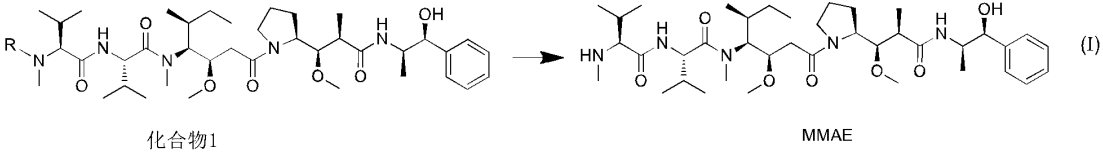
- [4] 其方法为：在惰性气氛中，将化合物 a 溶解于乙腈和吡啶中，环境温度搅拌过夜，减压蒸发至干。将残余物在硅胶柱上用二氯甲烷和甲醇的混合物纯化以获得白色固体形式的 MMAE。该方法的收率较低，仅为 68%。除此之外，该方法的纯化方法为硅胶柱层析，该方法成本较高，对设备的要求和操作人员的技术要求也非常高，另外，由于硅胶柱的纯化能力有限，生产过程中的工作效率较低。因此生产上亟需一种高收率、高纯度、高效且适合放大生产的合成及纯化方法。

发明内容

- [5] 针对上述问题，本发明提供了一种能够获得纯化方法简单高效、生产效率高、环境友好且最终产物质量高（高纯度、高收率）的 MMAE 制备和纯化方法。
- [6] 具体的，本发明提供了一种式(I)所示化合物（即 MMAE）的制备及纯化方法：



- [7] 所述的制备及纯化方法的制备路线如下：



- [8] 所述的 R 为氨基保护基团，所述的制备及纯化方法包括以下步骤：

- A. 将化合物 1 在碱性条件下脱除氨基保护基 R；
- B. 待步骤 A 反应结束后，向步骤 A 的反应体系中加入适量的水，搅拌，过滤，收集滤液；
- C. 向步骤 B 收集的滤液中加入适量的第一有机溶剂，萃取，收集有机相并浓缩，得浓缩物 a；
- D. 向步骤 C 中所得的浓缩物 a 中加入第二有机溶剂，待溶解后，得溶解液 b；
- E. 将步骤 D 所得的溶解液 b 滴加至第三有机溶剂中，待固体大量析出时，抽滤，收集滤饼，即得

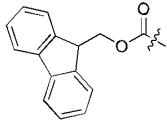
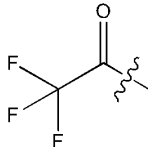
MMAE；

- [9] 其中：

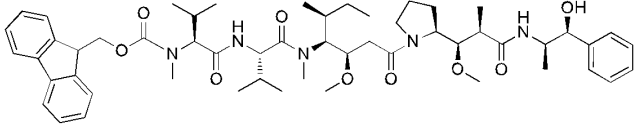
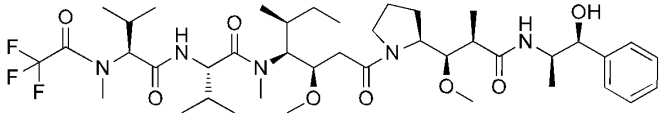
[10] 所述的氨基保护基 R 选自 Fmoc 保护基、三氟乙酰基；

[11] 所述的第一有机溶剂选自乙酸乙酯、二氯甲烷、乙酸异丙酯、氯仿、甲苯；

- [12] 所述的第二有机溶剂选自甲苯、乙酸乙酯、丙酮；
- [13] 所述的第三有机溶剂选自正庚烷、石油醚、正己烷、环己烷、正戊烷、甲基环己烷、甲基叔丁基醚。
- [14] 在一些具体的实施例中，所述的氨基保护基 R 选自如下结构：

Fmoc 保护基 (即 9-苄基甲氧基羰基保护基) (9-fluorenylmethoxycarbonyl)	
三氟乙酰基 (Trifluoroacetyl)	

- [15] 在一些具体的实施例中，所述的化合物 1 选自如下结构：

	化合物 a
	化合物 b

- 5 [16] 在一些具体的实施例中，所述的第一有机溶剂为乙酸乙酯；或者在另一些具体的实施例中，所述的第一有机溶剂为二氯甲烷；在另一些具体的实施例中，所述的第一有机溶剂为乙酸异丙酯；在另一些具体的实施例中，所述的第一有机溶剂为氯仿；在另一些具体的实施例中，所述的第一有机溶剂为甲苯。
- [17] 在一些具体的实施例中，所述的第二有机溶剂为甲苯；或者在另一些具体的实施例中，所述的第二有机溶剂为乙酸乙酯；在另一些具体的实施例中，所述的第二有机溶剂为丙酮。
- 10 [18] 在一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为正庚烷；或者在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为石油醚；在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为正己烷；在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为环己烷；在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为正戊烷；在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为甲基环己烷；在另一些具体的实施例中，所述的第三有机溶剂为甲基叔丁基醚。
- 15 [19] 可以理解的是，所述的第一有机溶剂、第二有机溶剂、第三有机溶剂的选择相互独立，即每一步骤中涉及的有机溶剂（如步骤 C 中涉及的第一有机溶剂、步骤 D 中涉及的第二有机溶剂、步骤 E 中涉及的第三有机溶剂）在溶剂的选择上相互独立。在一个更具体的实施例中，所述的第一有机溶剂、第二有机溶剂、第三有机溶剂可以为以下组合：

序号	第一有机溶剂	第二有机溶剂	第三有机溶剂
组合 1	乙酸乙酯	甲苯	正庚烷
组合 2	乙酸乙酯	甲苯	石油醚
组合 3	乙酸乙酯	甲苯	正己烷
组合 4	乙酸乙酯	甲苯	环己烷
组合 5	乙酸乙酯	甲苯	正戊烷
组合 6	乙酸乙酯	甲苯	甲基环己烷

组合 7	乙酸乙酯	甲苯	甲基叔丁基醚
组合 8	乙酸乙酯	乙酸乙酯	正庚烷
组合 9	乙酸乙酯	乙酸乙酯	石油醚
组合 10	乙酸乙酯	乙酸乙酯	正己烷
组合 11	乙酸乙酯	乙酸乙酯	环己烷
组合 12	乙酸乙酯	乙酸乙酯	正戊烷
组合 13	乙酸乙酯	乙酸乙酯	甲基环己烷
组合 14	乙酸乙酯	乙酸乙酯	甲基叔丁基醚
组合 15	乙酸乙酯	丙酮	正庚烷
组合 16	乙酸乙酯	丙酮	石油醚
组合 17	乙酸乙酯	丙酮	正己烷
组合 18	乙酸乙酯	丙酮	环己烷
组合 19	乙酸乙酯	丙酮	正戊烷
组合 20	乙酸乙酯	丙酮	甲基环己烷
组合 21	乙酸乙酯	丙酮	甲基叔丁基醚
组合 22	二氯甲烷	甲苯	正庚烷
组合 23	二氯甲烷	甲苯	石油醚
组合 24	二氯甲烷	甲苯	正己烷
组合 25	二氯甲烷	甲苯	环己烷
组合 26	二氯甲烷	甲苯	正戊烷
组合 27	二氯甲烷	甲苯	甲基环己烷
组合 28	二氯甲烷	甲苯	甲基叔丁基醚
组合 29	二氯甲烷	乙酸乙酯	正庚烷
组合 30	二氯甲烷	乙酸乙酯	石油醚
组合 31	二氯甲烷	乙酸乙酯	正己烷
组合 32	二氯甲烷	乙酸乙酯	环己烷
组合 33	二氯甲烷	乙酸乙酯	正戊烷
组合 34	二氯甲烷	乙酸乙酯	甲基环己烷

组合 35	二氯甲烷	乙酸乙酯	甲基叔丁基醚
组合 36	二氯甲烷	丙酮	正庚烷
组合 37	二氯甲烷	丙酮	石油醚
组合 38	二氯甲烷	丙酮	正己烷
组合 39	二氯甲烷	丙酮	环己烷
组合 40	二氯甲烷	丙酮	正戊烷
组合 41	二氯甲烷	丙酮	甲基环己烷
组合 42	二氯甲烷	丙酮	甲基叔丁基醚
组合 43	乙酸异丙酯	甲苯	正庚烷
组合 44	乙酸异丙酯	甲苯	石油醚
组合 45	乙酸异丙酯	甲苯	正己烷
组合 46	乙酸异丙酯	甲苯	环己烷
组合 47	乙酸异丙酯	甲苯	正戊烷
组合 48	乙酸异丙酯	甲苯	甲基环己烷
组合 49	乙酸异丙酯	甲苯	甲基叔丁基醚
组合 50	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	正庚烷
组合 51	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	石油醚
组合 52	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	正己烷
组合 53	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	环己烷
组合 54	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	正戊烷
组合 55	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	甲基环己烷
组合 56	乙酸异丙酯	乙酸乙酯	甲基叔丁基醚
组合 57	乙酸异丙酯	丙酮	正庚烷
组合 58	乙酸异丙酯	丙酮	石油醚
组合 59	乙酸异丙酯	丙酮	正己烷
组合 60	乙酸异丙酯	丙酮	环己烷
组合 61	乙酸异丙酯	丙酮	正戊烷
组合 62	乙酸异丙酯	丙酮	甲基环己烷

组合 63	乙酸异丙酯	丙酮	甲基叔丁基醚
组合 64	氯仿	甲苯	正庚烷
组合 65	氯仿	甲苯	石油醚
组合 66	氯仿	甲苯	正己烷
组合 67	氯仿	甲苯	环己烷
组合 68	氯仿	甲苯	正戊烷
组合 69	氯仿	甲苯	甲基环己烷
组合 70	氯仿	甲苯	甲基叔丁基醚
组合 71	氯仿	乙酸乙酯	正庚烷
组合 72	氯仿	乙酸乙酯	石油醚
组合 73	氯仿	乙酸乙酯	正己烷
组合 74	氯仿	乙酸乙酯	环己烷
组合 75	氯仿	乙酸乙酯	正戊烷
组合 76	氯仿	乙酸乙酯	甲基环己烷
组合 77	氯仿	乙酸乙酯	甲基叔丁基醚
组合 78	氯仿	丙酮	正庚烷
组合 79	氯仿	丙酮	石油醚
组合 80	氯仿	丙酮	正己烷
组合 81	氯仿	丙酮	环己烷
组合 82	氯仿	丙酮	正戊烷
组合 83	氯仿	丙酮	甲基环己烷
组合 84	氯仿	丙酮	甲基叔丁基醚
组合 85	甲苯	甲苯	正庚烷
组合 86	甲苯	甲苯	石油醚
组合 87	甲苯	甲苯	正己烷
组合 88	甲苯	甲苯	环己烷
组合 89	甲苯	甲苯	正戊烷
组合 90	甲苯	甲苯	甲基环己烷

组合 91	甲苯	甲苯	甲基叔丁基醚
组合 92	甲苯	乙酸乙酯	正庚烷
组合 93	甲苯	乙酸乙酯	石油醚
组合 94	甲苯	乙酸乙酯	正己烷
组合 95	甲苯	乙酸乙酯	环己烷
组合 96	甲苯	乙酸乙酯	正戊烷
组合 97	甲苯	乙酸乙酯	甲基环己烷
组合 98	甲苯	乙酸乙酯	甲基叔丁基醚
组合 99	甲苯	丙酮	正庚烷
组合 100	甲苯	丙酮	石油醚
组合 101	甲苯	丙酮	正己烷
组合 102	甲苯	丙酮	环己烷
组合 103	甲苯	丙酮	正戊烷
组合 104	甲苯	丙酮	甲基环己烷
组合 105	甲苯	丙酮	甲基叔丁基醚

- [20] 在一些具体的实施例中，步骤 B 中所述水为纯净水。
- [21] 在一些具体的实施例中，步骤 D 中所述溶解的方式为通过搅拌方式溶解。
- [22] 在一些优选的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 B 中所述的纯化水的重量体积比(g/ml)为 1:4~20。
5 在一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 B 中所述的纯化水的重量体积比 (g/ml) 为 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19 或者 1:20。
在另一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 B 中所述的纯化水的重量体积比还可以为范围内的其他比例，如非限制性的为 1:14.1，1:14.2，1:14.3，1:14.4，1:14.5 ... 等等。
- [23] 在一些优选的实施例中，步骤 B 中所述的搅拌为低温搅拌。在一些更优选的实施例中，步骤 B 中所述的低温搅拌的温度为 0~10℃。在一些具体的实施例中，步骤 B 中所述的低温搅拌的温度为 0℃、1℃、
10 2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃；或者在一些具体的实施例中，步骤 B 中所述的低温搅拌的温度可以为范围内的其他温度；又或者在一些具体的实施例中，步骤 B 中所述的低温搅拌的温度可以在 0℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃范围内上下浮动 1-5℃，如 -5℃、-4℃、-3℃、-2℃、-1℃或者 11℃、12℃、13℃、14℃、15℃等。
- [24] 在一些优选的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~25。在一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体
15 积比 (g/ml) 为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24 或者 1:25；在另一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步
骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比可以为范围内的其他比例。
- [25] 在一些更优选的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比(g/ml) 为 1:5~15。在一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体
20 积比 (g/ml) 为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14 或者 1:15；或者在另一些具体的实施例中，步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比可以为范围内的其
他比例。
- [26] 在一些优选的实施例中，步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3~15。在一些具体的实施例中，步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体
25 积比为 1:3~15。在一些具体的实施例中，步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体

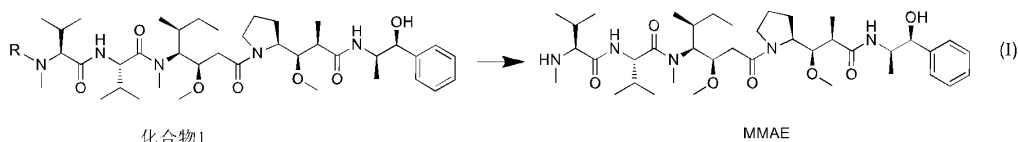
积比 (g/ml) 为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14 或者 1:15; 在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。

- 5 [27] 在一些更优选的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~10。在一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或者 1:10; 在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。
- 10 [28] 在一些优选的实施例, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15~45。在一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44 或者 1:45。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- 15 [29] 在一些更优选的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20~40。在一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39 或者 1:40。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- 20 [30] 或者在一些更更优选的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25~35。在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34 或者 1:35。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- 25 [31] 可以理解的是, 步骤 C 中的浓缩物 a 实际为未纯化的 MMAE, 步骤 C 中所述的浓缩是指减压浓缩, 即通过减压浓缩的方式将收集到的有机相浓缩至一定的程度, 在一些优选的实施例中, 步骤 C 通过减压浓缩的方式将收集到的有机相蒸干, 即获得固状的浓缩物 a。
- 30 [32] 在一些优选的实施例中, 所述的“在碱性条件下脱除氨基保护基 R 中”用到的碱包括但不限于哌啶、二乙胺、DBU, 在一些具体的实施例中, 采用哌啶脱除化合物 1 的氨基保护基, 在另一些具体的实施例中, 采用二乙胺脱除化合物 1 的氨基保护基, 或者在其他另一些具体的实施例中, 采用 DBU 脱除化合物 1 的氨基保护基。
- 35 [33] 在一些具体的实施例中, 采用哌啶脱除化合物 1 的氨基保护基, 其具体的过程可以非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量第四有机溶剂 (所述的第四有机溶剂可以非限制性的选自乙腈、乙醇、甲醇) 中, 搅拌溶解后, 加入哌啶开始反应。在一些优选的实施例中, 所述的化合物 1 和第四有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:2~12 (如 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12, 或者其他非整数的比值, 如 1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、... ..、1:10.4、... ..等)。所述的化合物 1 和哌啶的当量比为 1:2~8 (如 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 或者其他非整数的比值, 如 1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、... ..等)。在一些更具体的实施例中, 采用哌啶脱除化合物 1 的氨基保护基的具体过程非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量乙腈中, 搅拌溶解后, 加入哌啶开始反应, 其中, 所述的化合物 1 和哌啶的当量比为 1:3, 反应结束后, 进行下一步反应。在另一些更具体的实施例中, 采用哌啶脱除化合物 1 的氨基保护基的具体过程非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量甲醇中, 搅拌溶解后, 加入哌啶开始反应, 其中, 所述的化合物 1 和哌啶的当量比为 1:4, 反应结束后, 进行下一步反应。又或者在其他另一些更具体的实施例中, 采用哌啶脱除化合物 1 的氨基保护基的具体过程非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量乙醇中, 搅拌溶解后, 加入哌啶开始反应, 其中, 所述的化合物 1 和哌啶的当量比为 1:5, 反应结束后, 进行下一步反应。
- 40 [34] 在另一些具体的实施例中, 采用二乙胺脱除化合物 1 的氨基保护基, 其具体的过程可以非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量第四有机溶剂 (所述的第四有机溶剂可以非限制性的选自乙腈、乙醇、甲醇) 中, 搅拌溶解后, 加入哌啶开始反应。在一些优选的实施例中, 所述的化合物 1 和第四有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:2~12 (如 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12, 或者其他非整数的比值, 如 1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、... ..、1:10.4、... ..等)。所述的化合物 1 和二乙胺的当量比为 1:2~8 (如 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8 或者其他非整数的比值, 如 1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、... ..等)。在一些更具体的实施例中, 采用二乙胺脱除化合物 1 的氨基保护基的具体过程非限制性的为: 将化合物 1 溶解在适量甲醇中, 搅拌溶解后, 加入二乙胺开始反应, 其中, 所述的化合物 1 和二乙胺的当量比为 1:3, 反应结束后, 进行下一步反应。
- 50

在一些更具体的实施例中,采用二乙胺脱除化合物1的氨基保护基的具体过程非限制性的为:将化合物1溶解在适量乙醇中,搅拌溶解后,加入二乙胺开始反应,其中,所述的化合物1和二乙胺的当量比为1:3,反应结束后,进行下一步反应。在另一些更具体的实施例中,采用二乙胺脱除化合物1的氨基保护基的具体过程非限制性的为:将化合物1溶解在适量乙腈中,搅拌溶解后,加入二乙胺开始反应,其中,所述的化合物1和二乙胺的当量比为1:4,反应结束后,进行下一步反应。

[35] 在另一些具体的实施例中,采用DBU脱除化合物1的氨基保护基,其具体的过程可以非限制性的为:将化合物1溶解在适量第四有机溶剂(所述的第四有机溶剂可以非限制性的选自乙腈、乙醇、甲醇)中,搅拌溶解后,加入哌啶开始反应。在一些优选的实施例中,所述的化合物1和第四有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:2~12(如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12,或者其他非整数的比值,如1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、.....、1:10.4、.....等)。所述的化合物1和DBU的当量比为1:2~8(如1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8或者其他非整数的比值,如1:2.4、1:2.6、1:2.8、... ..、1:3.7、... ..、1:5.5、.....等)。在一些更具体的实施例中,采用DBU脱除化合物1的氨基保护基的具体过程非限制性的为:将化合物1溶解在适量甲醇中,搅拌溶解后,加入DBU开始反应,其中,所述的化合物1和DBU的当量比为1:3,反应结束后,进行下一步反应。在另一些更具体的实施例中,采用DBU脱除化合物1的氨基保护基的具体过程非限制性的为:将化合物1溶解在适量乙醇中,搅拌溶解后,加入DBU开始反应,其中,所述的化合物1和DBU的当量比为1:3,反应结束后,进行下一步反应。在另一些更具体的实施例中,采用DBU脱除化合物1的氨基保护基的具体过程非限制性的为:将化合物1溶解在适量乙腈中,搅拌溶解后,加入DBU开始反应,其中,所述的化合物1和DBU的当量比为1:4,反应结束后,进行下一步反应。

[36] 本发明还提供了反向滴加法在制备和纯化 MMAE 中的应用,所述的制备路线为:



[37] 所述的R为氨基保护基团;

[38] 所述的反向滴加法是指将根据所述的制备路线制备的待纯化的包含 MMAE 的反应产物先溶解在第二有机溶剂中,再将所得到的溶液反向滴加到第三有机溶剂中,之后过滤,干燥,即获得纯化后的 MMAE;其中:

[39] 所述的第二有机溶剂选自甲苯、乙酸乙酯、丙酮;

[40] 所述的第三有机溶剂选自正庚烷、石油醚、正己烷、环己烷、正戊烷、甲基环己烷、甲基叔丁基醚。

[41] 所述的反向滴加法包括如下步骤:

(1) 将所述待纯化的包含 MMAE 的反应产物溶解在第二有机溶剂,得溶液1;

(2) 将所得到的溶液1滴加至第三有机溶剂中,有大量固体析出,抽滤,收集滤饼,即得纯化后的 MMAE。

[42] 上述所述的“根据所述的制备路线制备的待纯化的包含 MMAE 的反应产物”或“待纯化的包含 MMAE 的反应产物”顾名思义,是指用上述制备路线制备获得,未经纯化的粗品 MMAE。如在本发明的某些特例中,“根据所述的制备路线制备的待纯化的包含 MMAE 的反应产物”或“待纯化的包含 MMAE 的反应产物”是指化合物1经过脱除氨基保护基后,经过滤、萃取和减压浓缩后得到的粗品产物,即浓缩物a。

[43] 上述所述的“反向滴加法”是相对于常规有机实验操作中将溶剂加入到包含产物的溶液中而言的,具体到本发明是指将“根据所述的制备路线制备的待纯化的包含 MMAE 的反应产物先溶解在第二有机溶剂中,再将所得到的溶液反向滴加到第三有机溶剂中”。

[44] 在一些优选的实施例中,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:3~15;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比为(g/ml)为1:5~10。

[45] 在一些优选的实施例中,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:15~45;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:20~40;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:25~35。

[46] 在一些优选的实施例中,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量

- 体积比 (g/ml) 为 1:3~15。在一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14 或者 1:15; 在另一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。
- 5 [47] 在一些更优选的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~10。在一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或者 1:10; 在另一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。
- 10 [48] 在一些优选的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15~45。在一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44 或者 1:45。或者在另一些
- 15 具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- [49] 在一些更优选的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20~40。在一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20、1:21、
- 20 1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39 或者 1:40。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- [50] 或者在一些更更优选的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25~35。在另一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25、
- 25 1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34 或者 1:35。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 (1) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (2) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- [51] 本发明还提供了反向滴加法在纯化 MMAE 中的应用, 所述的反向滴加法是指将待纯化的包含 MMAE 的反应产物先溶解在第二有机溶剂中, 再将所得到的溶液反向滴加到第三有机溶剂中, 之后过滤, 干燥, 即获得纯化后的 MMAE; 其中:
- 30 [52] 所述的第二有机溶剂选自甲苯、乙酸乙酯、丙酮;
- [53] 所述的第三有机溶剂选自正庚烷、石油醚、正己烷、环己烷、正戊烷、甲基环己烷、甲基叔丁基醚。
- [54] 在一些优选的实施例中, 所述的反向滴加法包括如下步骤:
- 35 (a) 将待纯化的包含 MMAE 的反应产物溶解在第二有机溶剂, 得溶液 2;
- (b) 将所得到的溶液 2 滴加至第三有机溶剂中, 有大量固体析出, 抽滤, 收集滤饼, 即得纯化后的 MMAE。
- [55] 在一些优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3~15; 优选的, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比为 (g/ml) 为 1:5~10。
- 40 [56] 在一些优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15~45; 优选的, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20~40; 优选的, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25~35。
- 45 [57] 在一些优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3~15。在一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14 或者 1:15; 在另一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。
- 50 [58] 在一些更优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重

量体积比 (g/ml) 为 1:5~10。在一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或者 1:10; 在另一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比也可以为上述范围内的其他比例。

- 5 [59] 在一些优选的实施例, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15~45。在一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44 或者 1:45。或者在另一些具体的
- 10 实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- [60] 在一些更优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20~40。在一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39 或者 1:40。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- 15 [61] 或者在一些更更优选的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25~35。在另一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34 或者 1:35。或者在另一些具体的实施例中, 步骤 (a) 中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤 (b) 中所述的第三有机溶剂的重量体积比为上述范围内的其他比例。
- 20 [62] 上述所述的 MMAE 制备和/或纯化方法在制备以 MMAE 为毒素的抗体药物偶联物中的应用。
- [63] 上述所述的 MMAE 制备和/或纯化方法在制备以 MMAE 为毒素的抗体药物偶联物中间体中的应用。
- 25 [64] 本发明提供的 MMAE 的制备及纯化方法, 用甲苯和正庚烷反滴析晶的纯化方法代替了现有技术涉及的方法中柱层析纯化的操作, 大大的提高了生产效率, 有效的降低了溶剂用量, 降低了生产成本。另外, 利用本发明提供的制备及纯化方法制备出的 MMAE, 收率及纯度有明显提高, 且方法稳定性良好, 更加适合放大生产。

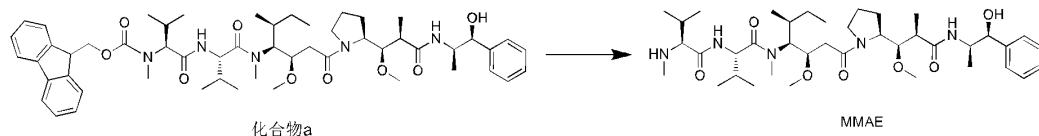
30 附图说明

- [65] 图 1 为通过实施例 1 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [66] 图 2 为通过实施例 2 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [67] 图 3 为通过实施例 3 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [68] 图 4 为通过实施例 4 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- 35 [69] 图 5 为通过实施例 5 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [70] 图 6 为通过实施例 6 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [71] 图 7 为通过实施例 7 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [72] 图 8 为通过实施例 8 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [73] 图 9 为通过实施例 9 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- 40 [74] 图 10 为通过实施例 10 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [75] 图 11 为通过实施例 11 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [76] 图 12 为通过实施例 12 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [77] 图 13 为通过实施例 13 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [78] 图 14 为通过实施例 14 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- 45 [79] 图 15 为通过实施例 15 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [80] 图 16 为通过实施例 16 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [81] 图 17 为通过对比例 1 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图;
- [82] 图 18 为通过对比例 2 提供的方法制备纯化的 MMAE 的色谱图。

具体实施方式

- 50 [83] 下面结合具体实施方式对本发明的技术方案作进一步非限制性的详细说明。需要指出的是, 下述实施例仅为说明本发明的技术构思及特点, 其目的在于让本领域技术人员能够了解本发明的内容并据以实施, 并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[84] 实施例 1



[85] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 100.0g 化合物 a (即 Fmoc-MMAE, 下同) 和 500ml 乙腈, 搅拌溶解后, 加入 36.25g 哌啶开始反应。

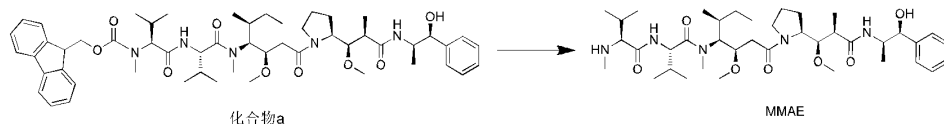
[86] 反应完毕后, 向反应液中加入 500ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[87] 加入 1000ml 二氯甲烷萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 71.03g (即 MMAE 粗品)。

[88] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入甲苯 710ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[89] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 2131ml 正庚烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 67.6g, 收率为 88.5%, 纯度为 99.97%, 单杂为 0.03%, 色谱图如 1 所示。

[90] 实施例 2



[91] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 4ml 乙腈, 搅拌溶解后, 加入 362mg 哌啶开始反应。

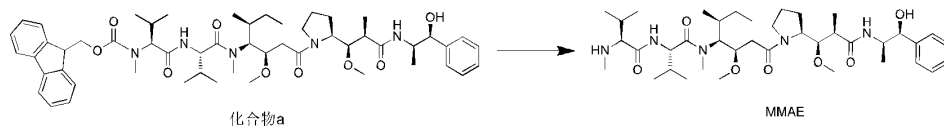
[92] 反应完毕后, 向反应液中加入 8ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[93] 加入 10ml 二氯甲烷萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 1.40g (即 MMAE 粗品)。

[94] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入甲苯 4.2ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[95] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 21ml 正庚烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 1.30g, 收率为 83.7%, 纯度为 99.60%, 单杂为 0.21%, 色谱图如 2 所示。

[96] 实施例 3



[97] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 4ml 乙腈, 搅拌溶解后, 加入 362mg 哌啶开始反应。

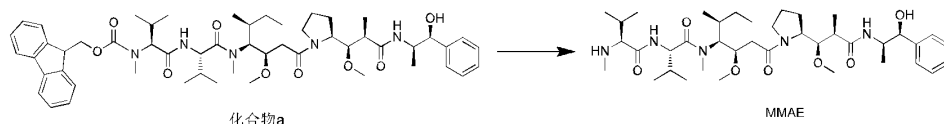
[98] 反应完毕后, 向反应液中加入 8ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[99] 加入 10ml 二氯甲烷萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 1.42g (即 MMAE 粗品)。

[100] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入甲苯 4.3ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[101] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 28.4ml 正庚烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 1.30g, 收率为 85%, 纯度为 99.58%, 单杂为 0.24%, 色谱图如 3 所示。

[102] 实施例 4



[103] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 4ml 乙腈, 搅拌溶解后, 加入 362mg 哌啶开始反应。

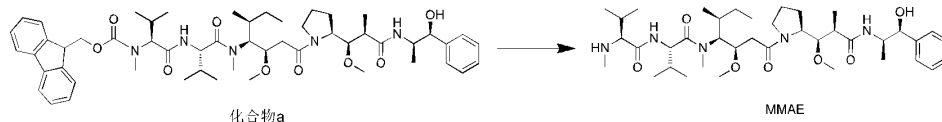
[104] 反应完毕后, 向反应液中加入 8ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[105] 加入 10ml 二氯甲烷萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 1.44g (即 MMAE 粗品)。

[106] 向上述浓缩物（即 MMAE 粗品）中加入甲苯 4.3ml 溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[107] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 36ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 1.33g，收率为 86.9%，纯度为 99.21%，单杂为 0.35%，色谱图如 4 所示。

[108] 实施例 5



[109] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基，具体过程如下：向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 24ml 乙腈，搅拌溶解后，加入 1.45g 吡啶开始反应。

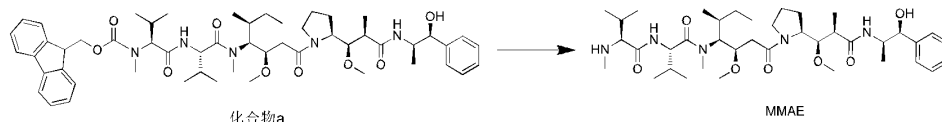
[110] 反应完毕后，向反应液中加入 40ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中，0~5℃搅拌 0.5 h，过滤。

[111] 加入 50ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得浓缩物 1.36g（即 MMAE 粗品）。

[112] 向上述浓缩物（即 MMAE 粗品）中加入甲苯 20.4ml 溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[113] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 61.2ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 1.27g，收率为 83%，纯度为 99.90%，单杂为 0.06%，色谱图如 5 所示。

[114] 实施例 6



[115] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基，具体过程如下：向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 24ml 乙腈，搅拌溶解后，加入 1.45g 吡啶开始反应。

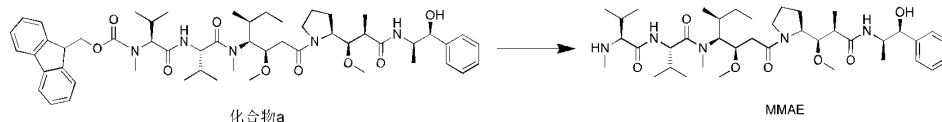
[116] 反应完毕后，向反应液中加入 20ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中，0~5℃搅拌 0.5 h，过滤。

[117] 加入 30ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得浓缩物 1.36g（即 MMAE 粗品）。

[118] 向上述浓缩物（即 MMAE 粗品）中加入甲苯 13.6ml 溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[119] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 54.4ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 1.29g，收率为 85%，纯度为 99.82%，单杂为 0.11%，色谱图如 6 所示。

[120] 实施例 7



[121] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基，具体过程如下：向三口瓶中加入 2.0g 化合物 a 和 24ml 乙腈，搅拌溶解后，加入 1.45g 吡啶开始反应。

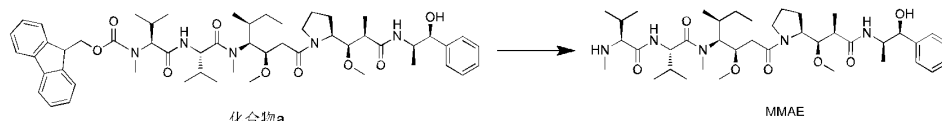
[122] 反应完毕后，向反应液中加入 20ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中，0~5℃搅拌 0.5 h，过滤。

[123] 加入 30ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得浓缩物 1.36g（即 MMAE 粗品）。

[124] 向上述浓缩物（即 MMAE 粗品）中加入甲苯 13.6ml 溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[125] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 47.6ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 1.28g，收率为 84%，纯度为 99.87%，单杂为 0.13%，色谱图如 7 所示。

[126] 实施例 8



[127] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和 5ml 乙醇, 搅拌溶解后, 加入 453mg 哌啶开始反应。

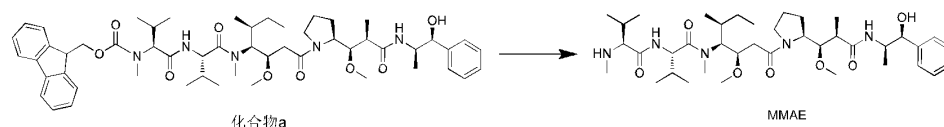
[128] 反应完毕后, 向反应液中加入 5ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[129] 加入 10ml 乙酸乙酯萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 704mg (即 MMAE 粗品)。

[130] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入乙酸乙酯 7ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[131] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的乙酸乙酯溶液向 21.1ml 石油醚中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 634mg, 收率为 83%, 纯度为 99.11%, 单杂为 0.25%, 色谱图如 8 所示。

[132] 实施例 9



[133] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和 5ml 乙醇, 搅拌溶解后, 加入 453mg 哌啶开始反应。

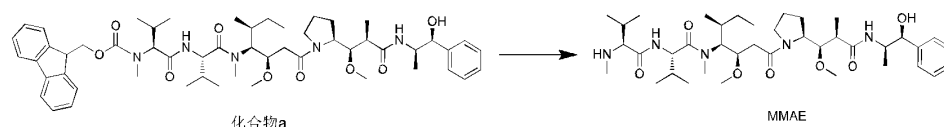
[134] 反应完毕后, 向反应液中加入 5ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[135] 加入 10ml 乙酸异丙酯萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 639mg (即 MMAE 粗品)。

[136] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入甲苯 6.4ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[137] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 19.2ml 环己烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 588mg, 收率为 77%, 纯度为 99.85%, 单杂为 0.07%, 色谱图如 9 所示。

[138] 实施例 10



[139] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 1g 化合物 a 和 5ml 乙醇, 搅拌溶解后, 加入 453mg 哌啶开始反应。

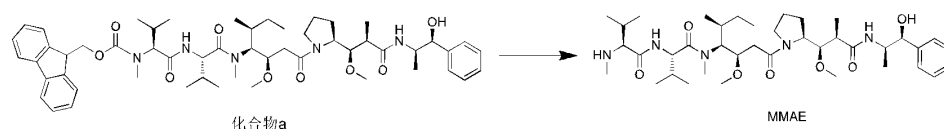
[140] 反应完毕后, 向反应液中加入 5ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[141] 加入 10ml 氯仿萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 653mg (即 MMAE 粗品)。

[142] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入乙酸乙酯 6.5ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[143] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的乙酸乙酯溶液向 19.6ml 正戊烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 596mg, 收率为 78%, 纯度为 99.63%, 单杂为 0.07%, 色谱图如 10 所示。

[144] 实施例 11



[145] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基, 具体过程如下: 向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和 5ml 乙醇, 搅拌溶解后, 加入 453mg 哌啶开始反应。

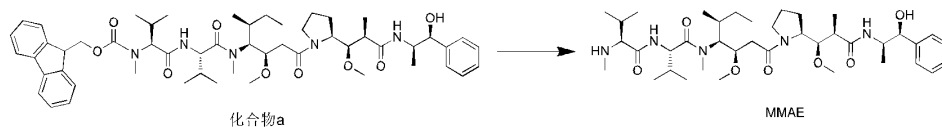
[146] 反应完毕后, 向反应液中加入 5ml 纯化水, 将反应瓶置于低温槽中, 0~5℃搅拌 0.5 h, 过滤。

[147] 加入 10ml 甲苯萃取, 分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干, 得浓缩物 649mg (即 MMAE 粗品)。

[148] 向上述浓缩物 (即 MMAE 粗品) 中加入丙酮 6.5ml 溶解, 转移至恒压滴液漏斗中。

[149] 在搅拌下, 将 MMAE 粗品的丙酮溶液向 19.5ml 甲基环己烷中滴加, 有大量固体析出, 抽滤得 MMAE 纯品 580mg, 收率为 76%, 纯度为 99.13%, 单杂为 0.21%, 色谱图如 11 所示。

[150] 实施例 12



[151] 采用碱法脱除化合物 a 中的 Fmoc 保护基，具体过程如下：向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和 5ml 乙腈，搅拌溶解后，加入 453mg 哌啶开始反应。

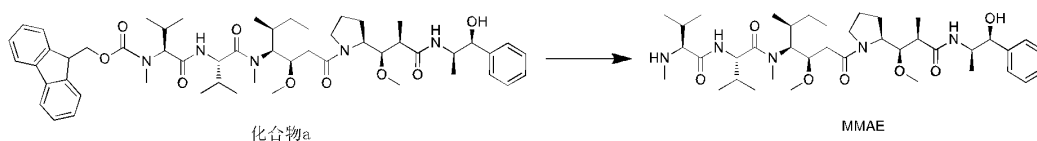
[152] 反应完毕后，向反应液中加入 5ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中，0~5℃搅拌 0.5 h，过滤。

5 [153] 加入 10ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得浓缩物 693mg（即 MMAE 粗品）。

[154] 向上述浓缩物（即 MMAE 粗品）中加入甲苯 6.9ml 溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[155] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 20.8ml 甲基叔丁基醚中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 603mg，收率为 79%，纯度为 99.77%，单杂为 0.12%，色谱图如 12 所示。

10 [156] 实施例 13



[157] 向三口瓶中加入 10.0g 化合物 a 和乙腈 50ml，搅拌溶解后，加入哌啶 2.71g 开始反应。

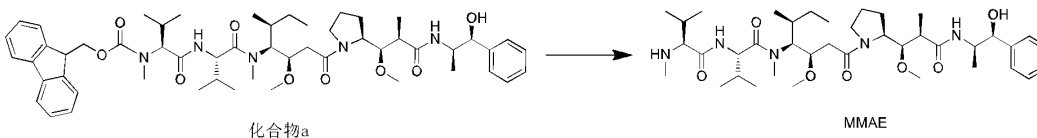
[158] 反应完毕后，向反应液中加入 80ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中 0~5℃搅拌 0.5 h。

[159] 加入 50ml 氯仿萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 6.70g。

15 [160] 向上述 MMAE 粗品中加入 67ml 甲苯溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[161] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 201ml 正己烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 6.49g，收率为 85%，纯度为 99.96%，最大单杂为 0.04%，色谱图如 13 所示。

[162] 实施例 14



20 [163] 向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和 5ml 乙腈，搅拌溶解后，加入哌啶 271mg 开始反应。

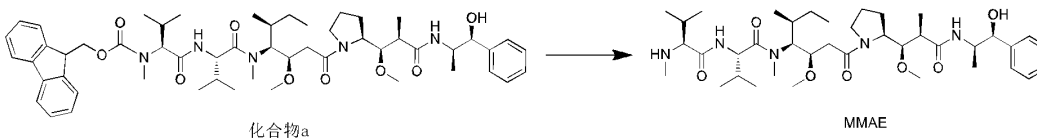
[164] 反应完毕后，向反应液中加入 10ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中 0~5℃搅拌 0.5 h。

[165] 加入 15ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 683mg。

[166] 向上述 MMAE 粗品中加入 6.8ml 丙酮溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

25 [167] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的丙酮溶液向 20.5ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 620 mg，收率为 81%，纯度为 99.44%，最大单杂为 0.25%，色谱图如 14 所示。

[168] 实施例 15



[169] 向三口瓶中加入 1200mg 化合物 a 和 10ml 甲醇，搅拌溶解后，加入 544mg 哌啶开始反应。

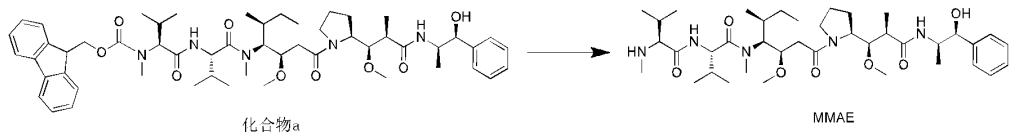
[170] 反应完毕后，向反应液中加入 9.6ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中 0~5℃搅拌 0.5 h。

30 [171] 加入 12ml 甲苯萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 770mg。

[172] 向上述 MMAE 粗品中加入 11.6ml 乙酸乙酯溶解，转移至恒压滴液漏斗中。

[173] 在搅拌下，将 MMAE 粗品的乙酸乙酯溶液向 30.8ml 正己烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 724mg，收率为 79%，纯度为 99.20%，最大单杂为 0.38%，色谱图如 15 所示。

[174] 实施例 16



- 5
- [175]

向三口瓶中加入 10.0g 化合物 a 和乙腈 100ml，搅拌溶解后，加入哌啶 9.05g 开始反应。
- [176]

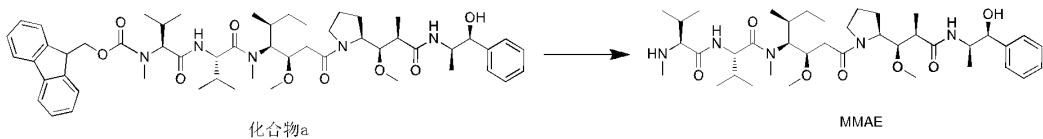
反应完毕后，向反应液中加入 100ml 纯化水，将反应瓶置于低温槽中 0~5℃搅拌 0.5 h。
- [177]

加入 150ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 6.53g。
- [178]

向上述 MMAE 粗品中加入 98ml 甲苯溶解，转移至恒压滴液漏斗中。
- [179]

在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲苯溶液向 294ml 正庚烷中滴加，有大量固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 6.31g，收率为 82.6%，纯度为 99.53%，单杂为 0.07%，色谱图如 16 所示。

对比例 1



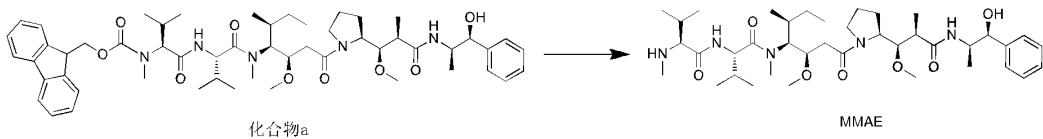
- 10
- [180]

向三口瓶中加入 10.0g 化合物 a 和二氯甲烷 70ml，搅拌溶解后，加入二乙胺 3.1g 开始反应。
- [181]

反应完毕后，向反应液中加入 100ml 纯化水和 70ml 二氯甲烷萃取，分出有机相。20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 6.68g。
- [182]

将上述 MMAE 粗品柱层析纯化，蒸干溶剂得 MMAE 纯品 5.11g，收率为 66.9%，纯度为 98.43%，最大单杂为 0.22%，色谱图如 17 所示。
- 15
- [183]

对比例 2



- 20
- [184]

向三口瓶中加入 1.0g 化合物 a 和二氯甲烷 10ml，搅拌溶解后，加入 DBU 485mg 开始反应。
- [185]

反应完毕后，20-25℃下减压浓缩至干，得 MMAE 粗品 1.52g。
- [186]

向上述 MMAE 粗品中加入 15ml 甲醇溶解，转移至恒压滴液漏斗中
- [187]

在搅拌下，将 MMAE 粗品的甲醇溶液向 45.6ml 甲基叔丁基醚中滴加，有固体析出，抽滤得 MMAE 纯品 557mg，收率为 73%，纯度为 89.37%，单杂为 7.10%，色谱图如 18 所示。

表 1 各实施例与对比例产品收率及纯度比较

实施例	收率	纯度
实施例 1	88.5%	99.97%
实施例 2	83.7%	99.6%
实施例 3	85%	99.58%
实施例 4	86.9%	99.21%
实施例 5	83%	99.9%
实施例 6	85%	99.82%
实施例 7	84%	99.87%

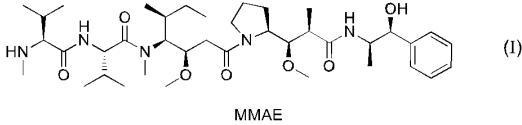
实施例 8	83%	99.11%
实施例 9	77%	99.85%
实施例 10	78%	99.63%
实施例 11	76%	99.13%
实施例 12	79%	99.77%
实施例 13	85%	99.96%
实施例 14	81%	99.44%
实施例 15	79%	99.2%
实施例 16	82.6%	99.53%
对比例 1	66.9%	98.43%
对比例 2	73%	89.37%

5 [188] 通过表 1 可以看出，本发明提供的 MMAE 的制备及纯化方法，用反滴析晶的纯化方法代替了现有技术涉及的方法中柱层析纯化的操作，大大的提高了生产效率，降低了生产成本，最主要的是，在提升产品纯度的同时，显著的提高了产品收率，不仅使得最终产品纯度由 98.43%跨越到 99.97%，更是将收率从 66.9%显著提升至 88.5%，极大的降低了生产成本。另外，利用本发明提供的制备及纯化方法制备出的 MMAE，方法稳定性良好，更加适合放大生产，具有意料不到的技术效果。

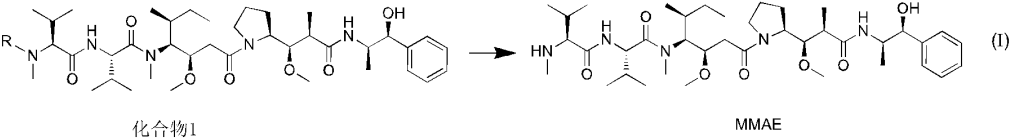
10 [189] 本发明已通过各个具体实施例作了举例说明。但是，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式，普通技术人员在本发明的范围内可以作出各种改动或变型，并且在本说明书中各处提及的各个技术特征可以相互组合，而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种式(I)所示化合物的制备及纯化方法:



所述的化合物的制备路线如下:



5 所述的 R 为氨基保护基团, 其特征在于, 所述的制备及纯化方法包括以下步骤:

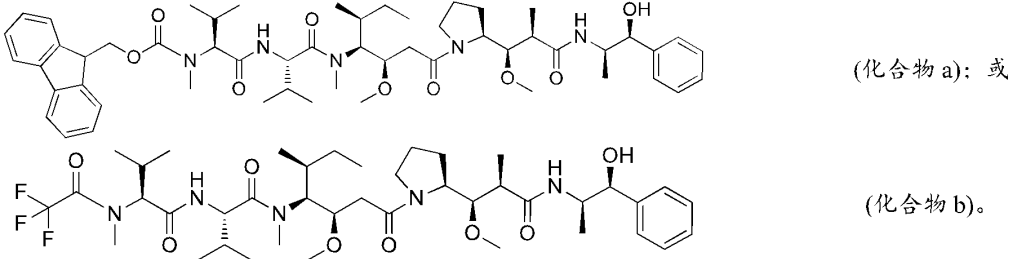
- A. 将化合物 1 在碱性条件下脱除氨基保护基 R;
- B. 待步骤 A 反应结束后, 向步骤 A 的反应体系中加入适量的水, 搅拌, 过滤, 收集滤液;
- C. 向步骤 B 收集的滤液中加入适量的第一有机溶剂, 萃取, 收集有机相并浓缩, 得浓缩物 a;
- D. 向步骤 C 中所得的浓缩物 a 中加入第二有机溶剂, 溶解后, 得溶解液 b;
- E. 将步骤 D 所得的溶解液 b 滴加至第三有机溶剂中, 待固体大量析出, 抽滤, 收集滤饼, 即得

MMAE;

其中:

- 所述的氨基保护基 R 选自 Fmoc 保护基、三氟乙酰基;
- 所述的第一有机溶剂选自乙酸乙酯、二氯甲烷、乙酸异丙酯、氯仿、甲苯;
- 15 所述的第二有机溶剂选自甲苯、乙酸乙酯、丙酮;
- 所述的第三有机溶剂选自正庚烷、石油醚、正己烷、环己烷、正戊烷、甲基环己烷、甲基叔丁基醚。

2. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 所述的化合物 1 选自如下结构:



3. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 步骤 A 中的化合物 1 和步骤 B 中所述水的重量体积比 (g/ml) 为 1:4~20; 优选的, 步骤 A 中的化合物 1 和步骤 B 中所述水的重量体积比 (g/ml) 为 1:4~10; 优选的, 所述步骤 B 中所述的搅拌为低温搅拌; 进一步优选的, 所述低温搅拌的温度为 0~10℃。

4. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~25; 优选的, 步骤 A 中的化合物 1 和步骤 C 中所述的第一有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~15。

5. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:3~15; 优选的, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 D 中所述的第二有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:5~10。

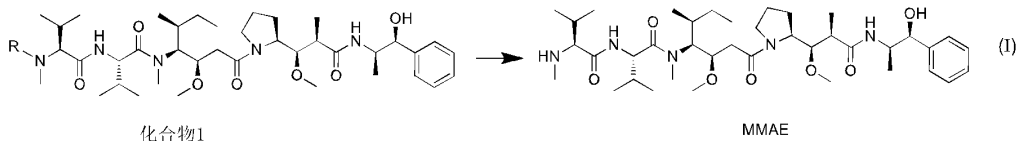
6. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:15~45; 优选的, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:20~40; 优选的, 步骤 C 中的浓缩物 a 和步骤 E 中所述的第三有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:25~35。

7. 根据权利要求 1 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 步骤 A 中所述的将化合物 1 在碱性条件下脱除氨基保护基 R 包括如下步骤: 将化合物 1 溶解在适量第四有机溶剂中, 搅拌溶解后, 加入碱反应, 脱除氨基保护基 R; 优选的, 所述第四有机溶剂选自乙腈、乙醇、甲醇; 进一步优选的, 所述的碱选自哌啶、二乙胺、DBU。

8. 根据权利要求 7 所述的制备及纯化方法, 其特征在于, 所述的化合物 1 和第四有机溶剂的重量体积比 (g/ml) 为 1:2~12, 和/或所述的化合物 1 和所述碱的当量比为 1:2~8。

9. 根据权利要求1所述的制备及纯化方法,其特征在于,步骤B中所述水为纯净水,和/或所述步骤D中所述溶解的方式为通过搅拌方式溶解。

10. 反向滴加法在制备和纯化 MMAE 中的应用,所述的 MMAE 的制备路线为:



5 所述的 R 为氨基保护基团;

所述的反向滴加法是指将根据所述的制备路线制备的待纯化的包含 MMAE 的反应产物先溶解在第二有机溶剂中,再将所得到的溶液反向滴加到第三有机溶剂中,之后过滤,干燥,即获得纯化后的 MMAE;其中:

所述的第二有机溶剂选自甲苯、乙酸乙酯、丙酮;

10 所述的第三有机溶剂选自正庚烷、石油醚、正己烷、环己烷、正戊烷、甲基环己烷、甲基叔丁基醚。

11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于,所述的反向滴加法包括如下步骤:

(1) 将所述待纯化的包含 MMAE 的反应产物溶解在第二有机溶剂,得溶液1;

(2) 将所得到的溶液1滴加至第三有机溶剂中,待固体大量析出,抽滤,收集滤饼,即得纯化后的 MMAE。

15 12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:3~15;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和第二有机溶剂的重量体积比为(g/ml)为1:5~10。

20 13. 根据权利要求12所述的应用,其特征在于,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:15~45;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:20~40;优选的,步骤(1)中所述的待纯化的包含 MMAE 的反应产物和步骤(2)中所述的第三有机溶剂的重量体积比(g/ml)为1:25~35。