



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0163438
(43) 공개일자 2023년11월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/02 (2006.01) C07K 1/02 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/02 (2013.01)
C07K 1/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7034738
- (22) 출원일자(국제) 2022년03월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년10월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/084236
- (87) 국제공개번호 WO 2022/206870
국제공개일자 2022년10월06일
- (30) 우선권주장
202110349993.3 2021년03월31일 중국(CN)

- (71) 출원인
레메젠 코, 리미티드
중국 264006 산둥, 중국(산둥) 파일럿 프리 트레이드 존, 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트 존, 베이징 미들 로드 58
- (72) 발명자
리, 주양린
중국 264006 산둥 엔타이 중국(산둥) 파일럿 프리 트레이드 존 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트 존 베이징 미들 로드 넘버 58
구오, 웨이
중국 264006 산둥 엔타이 중국(산둥) 파일럿 프리 트레이드 존 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트 존 베이징 미들 로드 넘버 58
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

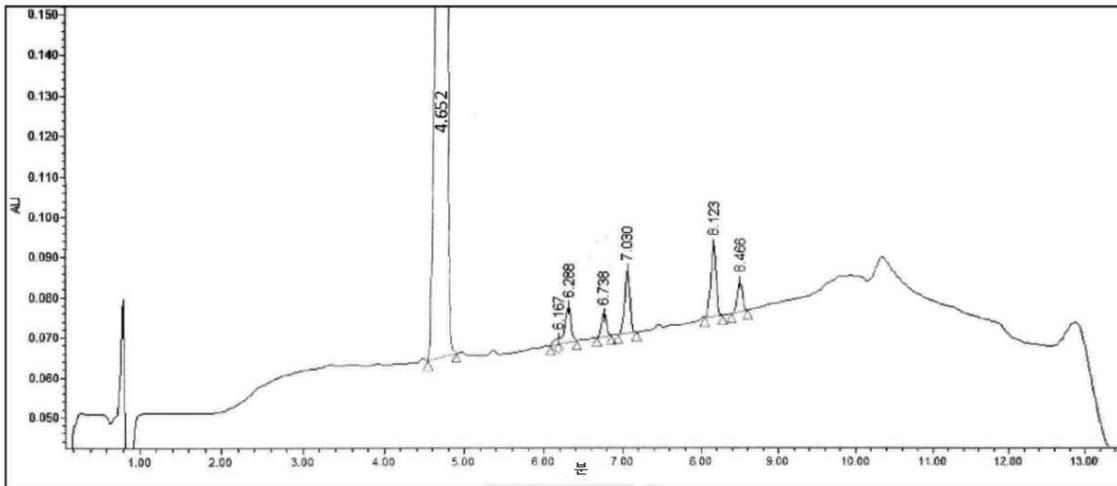
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 모노메틸 아우리스테인 E 화합물의 제조 및 정제 공정

(57) 요약

MMAE의 제조 및 정제 공정이 제공된다. 공정은 온건한 합성 및 정제 조건을 가지고, 과도한 고온에 의해 야기된 생성물 키랄성 변화를 효과적으로 방지할 수 있고, 분해 불순물의 생성을 크게 감소시키고, 생성물의 순도 및 수율을 증가시킨다. 또한, 제조 및 정제 공정은 우수한 안정성을 가지고 대규모 생산에 더욱 적합하다. 제조된 MMAE는 99% 초과 순도를 가지고, 임상 약물 기준 요건을 완벽하게 충족할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 1/10 (2013.01)

Y02P 20/55 (2020.08)

(72) 발명자

선, 쩡

중국 264006 산둥 엔타이 중국(산둥) 과일렛 프리
트레이드 존 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트
존 베이징 미들 로드 넘버 58

샤오, 카이

중국 264006 산둥 엔타이 중국(산둥) 과일렛 프리
트레이드 존 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트
존 베이징 미들 로드 넘버 58

리, 신리

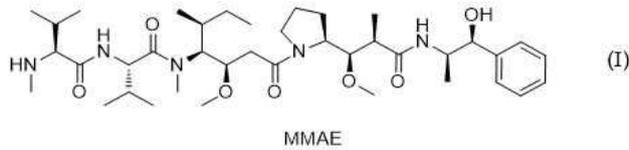
중국 264006 산둥 엔타이 중국(산둥) 과일렛 프리
트레이드 존 엔타이 디스트릭트 엔타이 디벨롭먼트
존 베이징 미들 로드 넘버 58

명세서

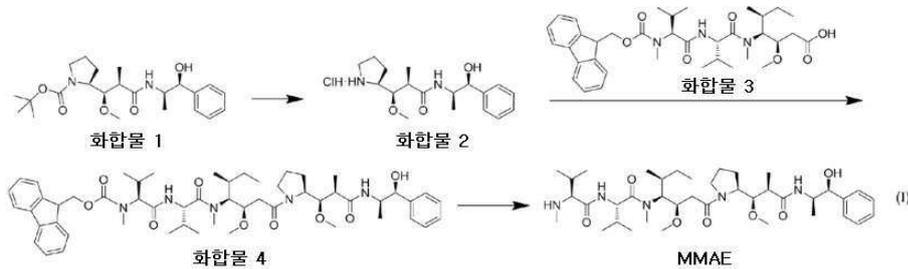
청구범위

청구항 1

하기 화학식(I)로 나타나는 화합물의 제조 및 정제 방법으로서,



상기 방법의 제조 경로는 하기와 같으며,



상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:

- (1) 화합물 1을 적당량의 제1 유기 용매에 용해시켜 용액 A를 형성하는 단계;
- (2) 절연 반응을 위해 충분한 양의 HCl-1,4-디옥산 용액을 용액 A에 첨가하고, Boc 보호기를 제거하는 단계;
- (3) 반응이 완료된 후, 단계 (2)의 반응 용액을 충분한 양의 제1 저극성 용매에 붓고, 교반 한 후 여과액을 폐기하고, 건조 후 고형분 잔류물은 화합물 2가 되는 단계;
- (4) 수득된 화합물 2 및 적당량의 화합물 3을 제2 유기 용매에 용해시켜 용액 B를 형성하는 단계;
- (5) 제1 폴리펩타이드 축합제를 적당량의 제3 유기 용매에 용해시켜 용액 C를 형성하는 단계로서, 여기서 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰수가 단계 (4)의 화합물 3의 몰수보다 큰 단계;
- (6) 용액 C를 용액 B에 첨가하여 용액 D를 형성하는 단계;
- (7) 절연 반응을 위해 적당량의 제1 유기 염기를 용액 D에 첨가하는 단계;
- (8) 단계 (7)의 반응이 완료된 후, 추출을 위해 충분한 양의 제2 저극성 용매 및 정제수를 단계 (7)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하는 단계;
- (9) 단계 (8)에서 수집된 유기상을 적당량의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액으로 순차 세척하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하고, 건조하여 화합물 4를 수득하는 단계;
- (10) 화합물 4를 제4 유기 용매에 용해시켜 용액 E를 형성하는 단계;
- (11) 절연 반응을 위해 충분한 양의 디에틸아민을 용액 E에 첨가하고, Fmoc 보호기를 제거하는 단계;
- (12) 반응이 완료된 후, 추출을 위해 적당량의 제5 유기 용매 및 정제수를 단계 (11)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하는 단계;
- (13) 크로마토그래피 정제를 단계 (12)에서 수득된 감압 농축물 상에서 톨루엔: 메탄올의 용출 시스템에 의해 수행하고, 수집된 용리액을 감압 농축하는 단계;
- (14) 단계 (13)에서 수득된 감압 농축 생성물을 제6 유기 용매로 용해시킨 후, 여과하고, 여과액을 감압 농축하

는 단계; 및

(15) 단계 (14)에서 수득된 감압 농축 생성물을 진공 건조하여 MMAE를 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 1의 상기 제1 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 1의 제1 유기 용매는 디클로로메탄인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:2이고; 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1-3이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1.5-2.5인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 4mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 3-7mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 3.5-4.5mol/L인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-8이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-7이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 단계 (2)의 상기 HCl-1,4-디옥산 용액을 적가하고, 적가 동안 반응 시스템의 내부 온도를 -5℃ -5℃ 사이로 유지하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (2)의 절연 반응의 온도는 10-15℃인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단계 (3)의 상기 제1 저극성 용매는 n-헥산, 석유 에테르, 및 n-헵탄으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제1 저극성 용매는 n-헥산으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:16이고; 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:10-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:12-20이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-17인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단계 (4)의 상기 제2 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제2 유기 용매는 DMF이고; 추가로 바람직하게는, 단계 (4)에서, 화합물 2 및 화합물 3의 몰량이 동일한, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mp)는 1:5-8이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물

3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-7인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단계 (5)의 상기 제1 폴리펩타이드 축합제는 HATU, DIC, DCC, EDC, HCTU, DEPBT, EEDQ 및 CDI로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제는 HATU인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 약 1:1.2이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.01-1.5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.1-1.4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.2-1.3인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 단계 (5)의 상기 제3 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제3 유기 용매는 DMF인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2-6이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2.5-4이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4인, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 단계 (6)에서, 용액 C를 용액 B에 적가하고, 적가 동안 전체 반응 시스템의 내부 온도는 0-5°C인, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 단계 (7)의 상기 제1 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 및 피리딘으로부터 선택되는 하나 이상이고; 바람직하게는, 단계 (7)의 제1 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민인, 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:2-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:2.5-4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:3-4인, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 단계 (7)의 상기 제1 유기 염기를 용액 D에 적가하고, 절연 반응의 온도는 0-5°C인, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 단계 (8)의 제2 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 및 테트라하이드로퓨란으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (8)의 제2 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르인, 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:20.2:20.2이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-25:15-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-24:20-24이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의

제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-21:20-21인, 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 부피가 동일한, 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 약 0.05mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.02-0.08mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.04-0.06mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.05mol/L인, 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 단계 (9)의 염화 나트륨 용액의 농도는 약 30%이고; 바람직하게는, 단계 (9)의 염화 나트륨 용액의 농도는 20%-40%인, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 단계 (9)의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액의 부피는 단계 (8)의 제2 저극성 용매의 부피와 동일한, 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 단계 (10)의 상기 제4 유기 용매는 디클로로메탄, 아세토니트릴, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (10)의 제4 유기 용매는 디클로로메탄인, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 단계 (10)의 화합물 4 대 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-8인, 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3.5이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4인, 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 단계 (11)의 디에틸아민을 용액 E에 적가하고, 적가 공정에서, 용액의 내부 온도를 0-5°C 사이로 유지하고; 단계 (11)의 절연 반응의 온도는 20-30°C인, 방법.

청구항 30

제1항에 있어서, 단계 (12)의 상기 제5 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 사염화탄소 및 톨루엔으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (12)의 제5 유기 용매는 디클로로메탄인, 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7:10이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10:5-15이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-8:9-12인, 방법.

청구항 32

제1항에 있어서, 단계 (13)의 크로마토그래피 정제에서 사용되는 실리카겔은 200-300 메쉬 실리카겔이고; 용출 시스템은 10-20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; 바람직하게는, 용출 시스템은 처음에 약 20:1의 부피비

(2-4). 절연 반응을 위해 적당량의 제2 유기 염기를 용액 I에 첨가하는 단계;

(2-5). 반응이 완료된 후, 추출을 위해 충분한 양의 제4 저극성 용매 및 정제수를 단계 (2-4)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하는 단계; 및

(2-6). 단계 (2-5)에서 수집된 유기상을 적당량의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액으로 순차 세척하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하고, 건조하여 화합물 4를 수득하는 단계.

청구항 47

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 제8 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제8 유기 용매는 DMF인, 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-8이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-7인, 방법.

청구항 49

제46항에 있어서, 단계 (2-2)의 상기 제2 폴리펩타이드 축합제는 HATU, DIC, DCC, EDC, HCTU, DEPBT, EEDQ 및 CDI로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제는 HATU인, 방법.

청구항 50

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 약 1:1.2이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.01-1.5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.1-1.4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.2-1.3인, 방법.

청구항 51

제46항에 있어서, 단계 (2-2)의 상기 제9 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제9 유기 용매는 DMF인, 방법.

청구항 52

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2-6이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2.5-4이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4인, 방법.

청구항 53

제46항에 있어서, 단계 (2-3)에서, 용액 H를 용액 G에 적가하고, 적가 동안 전체 반응 시스템의 내부 온도는 0-5°C인, 방법.

청구항 54

제46항에 있어서, 단계 (2-4)의 상기 제2 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 및 피리딘으로부터 선택되는 하나 이상이고; 바람직하게는, 단계 (2-4)의 제2 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민인, 방법.

청구항 55

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 약 1:3이고; 바람직하게는,

단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:2-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:2.5-4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:3-4인, 방법.

청구항 56

제46항에 있어서, 단계 (2-4)에서, 제2 유기 염기를 용액 I에 적가하고, 절연 반응의 온도는 0-5℃인, 방법.

청구항 57

제46항에 있어서, 단계 (2-5)의 상기 제4 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 및 테트라하이드로퓨란으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르인, 방법.

청구항 58

제46항에 있어서, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:20.2:20.2이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-25:15-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-24:20-24이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-21:20-21인, 방법.

청구항 59

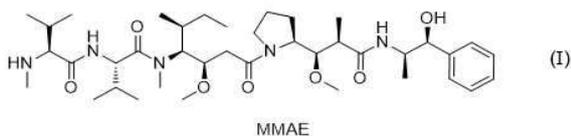
제46항에 있어서, 단계 (2-5)의 상기 제4 저극성 용매의 부피 및 정제수의 부피가 동일한, 방법.

청구항 60

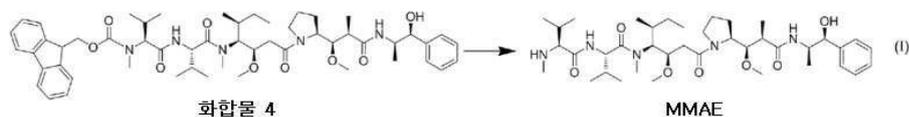
제46항에 있어서, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 약 0.05mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.02-0.08mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.04-0.06mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.05mol/L인, 방법.

청구항 61

하기 화학식 (I)로 나타나는 화합물의 제조 및 정제 방법으로서,



상기 방법의 제조 경로는 하기와 같으며,



상기 방법은 하기 단계를 포함하는 방법:

- (3-1). 화합물 4를 제10 유기 용매에 용해시켜 용액 J를 형성하는 단계;
- (3-2). 절연 반응을 위해 충분한 양의 디에틸아민을 용액 J에 첨가하고, Fmoc 보호기를 제거하는 단계;
- (3-3). 반응이 완료된 후, 추출을 위해 적당량의 제11 유기 용매 및 정제수를 단계 (3-2)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하는 단계;
- (3-4). 크로마토그래피 정제를 단계 (3-3)에서 수득된 감압 농축물 상에서 톨루엔: 메탄올의 용출 시스템에 의해 수행하고, 수집된 용리액을 감압 농축하는 단계;

(3-5). 단계 (3-4)에서 수득된 감압 농축 생성물을 제12 유기 용매로 용해시킨 후, 여과하고, 여과액을 감압 농축하는 단계; 및

(3-6). 단계 (3-5)에서 수득된 감압 농축 생성물을 진공 건조하여 MMAE를 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 단계 (3-1)의 상기 제10 유기 용매는 디클로로메탄, 아세토니트릴, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 제10 유기 용매는 디클로로메탄인, 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-8인, 방법.

청구항 64

제61항에 있어서, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3.5이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4인, 방법.

청구항 65

제61항에 있어서, 단계 (3-2)의 상기 디에틸아민을 적가하고, 적가 공정에서, 내부 온도가 0°C 내지 5°C 사이로 유지되고; 단계 (3-2)의 절연 반응의 온도는 20-30°C인, 방법.

청구항 66

제61항에 있어서, 단계 (3-3)의 제11 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 사염화탄소 및 톨루엔으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-3)의 제11 유기 용매는 디클로로메탄인, 방법.

청구항 67

제61항에 있어서, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7:10이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10:5-15이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-8:9-12인, 방법.

청구항 68

제61항에 있어서, 단계 (3-4)의 크로마토그래피 정제에서 사용되는 실리카겔은 200-300 메쉬 실리카겔이고; 용출 시스템은 10-20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; 바람직하게는, 용출 시스템은 처음에 약 20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; TLC에서 생성물만 보이는 것으로 검출되면, 용출 시스템은 약 10:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올로 변경되는, 방법.

청구항 69

제61항에 있어서, TLC 검출의 현상제는 약 5:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올인, 방법.

청구항 70

제61항에 있어서, 단계 (3-5)의 상기 제12 유기 용매는 메탄올, 톨루엔 및 아세토니트릴로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-5)의 제12 유기 용매는 메탄올인, 방법.

청구항 71

제61항에 있어서, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-5)의 제12 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3-10

인, 방법.

청구항 72

제61항에 있어서, 단계 (3-5)의 공정이 1-5회 반복될 수 있는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

분야

본 발명은 화합물 합성의 기술 분야, 특히 모노메틸 아우리스타틴 E 화합물(즉, MMAE)의 제조 및 정제 공정에 관한 것이다.

배경 기술

아우리스타틴의 완전 합성 유도체인 MMAE(모토메틸 아우리스타틴 E, 일명 메틸 아우리스타틴 E)는 튜블린 중합을 억제하는 것에 의해 유사분열을 효과적으로 억제할 수 있고, 암을 치료하기 위해 항체-약물 접합체를 합성하도록 세포독성 구성 요소(즉, 약물 모이어티)로서 널리 사용되어 왔다.

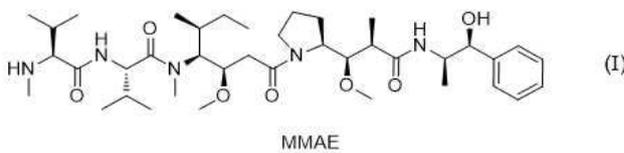
항체 약물 접합체(ADC)는 항종양 약물의 한 종류로, 항체, 링커 및 약물의 3개의 구성 요소를 포함한다. 이의 원리는 항체의 선택적 표적화 능력이 약물 모이어티의 세포 독성 효능과 결합된 후, 항체의 표적화 특이성에 의해 종양 세포 표면 상의 항원을 특이적으로 인식하여, 세포의 세포내이입을 통해 세포의 진입이 달성되고, 세포 내 프로테아제에 의해 약물 모이어티가 방출되므로, 비표적 조직을 죽이는 것을 피하면서 종양 세포를 죽이려는 목적이 달성된다.

현재, 다수의 천연 및 화학적으로 합성된 세포독소가 존재하는 것으로 알려져 있으나, 약물 구조 중 극히 일부만이 ADC에 적용될 수 있다. 이는 주로 ADC 로드로서 사용될 수 있는 독소가 높은 세포 독성 효능 및 작은 분자량과 같은 복잡한 특성을 가져야 하기 때문이다. 따라서, 아우리스타틴 화합물(예컨대 MMAE)은 ADC 분야에서 높은 인기를 얻고 있다. 현재, 시중의 많은 ADC 약물의 항체 상의 링커-독소 구조는 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE이다. 그러나, MMAE의 현재 시장 가격은 매우 높다. 주된 이유는 현재의 합성 및 정제 공정이 아직 미숙하고, 많은 약물의 합성 공정이 복잡하고, 정제 공정이 미숙하여, 수율 및 순도가 낮고 최종 생성물의 불순물(특히, 단일 불순물)의 함량이 높기 때문이다. 임상 약물의 안전성을 위해서는, 임상용으로 사용되는 약물이 극히 높은 순도 및 극히 낮은 불순물을 가져야 하지만, 현재 공정의 대부분은 임상 약물의 기준 요건을 충족하지 못하고 있으며, 이는 또한 시중에서 이용 가능한 MMAE의 높은 가격의 주요 원인 중 하나이기도 하다.

발명의 내용

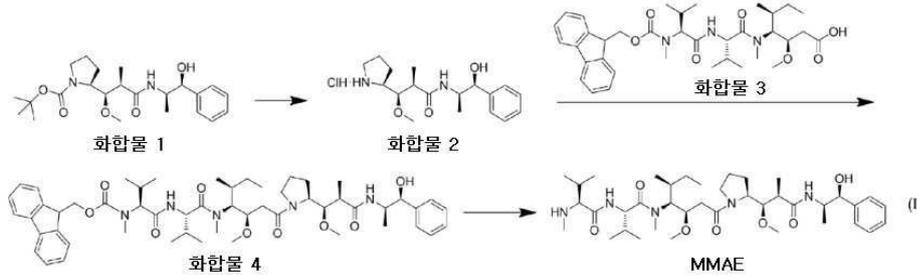
요약

본 발명은 임상 약물의 품질 기준 요건을 충분히 충족시킬 수 있는 극히 고순도의 MMAE(하기 화학식 I에서 보여지는 구조식)를 수득하는 것이 가능한 제조 및 정제 공정을 제공한다.



실시예

[0009] 방법의 제조 경로는 하기와 같다:



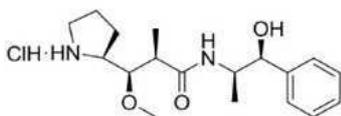
- [0010]
- [0011] 방법은 하기의 단계를 포함한다:
- [0012] (1) 화합물 1을 적당량의 제1 유기 용매에 용해시켜 용액 A를 형성하는 단계;
- [0013] (2) 절연 반응을 위해 충분한 양의 HCl-1,4-디옥산 용액을 용액 A에 첨가하고, Boc 보호기를 제거하는 단계;
- [0014] (3) 반응이 완료된 후, 단계 (2)의 반응 용액을 충분한 양의 제1 저극성 용매에 붓고, 교반 한 후 여과액을 폐기하고, 건조 후 고형분 잔류물이 화합물 2가 되는 단계;
- [0015] (4) 수득된 화합물 2 및 적당량의 화합물 3을 제2 유기 용매에 용해시켜 용액 B를 형성하는 단계;
- [0016] (5) 제1 폴리펩타이드 축합제를 적당량의 제3 유기 용매에 용해시켜 용액 C를 형성하는 단계로서, 여기서 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰수가 단계 (4)의 화합물 3의 몰수보다 큰, 단계;
- [0017] (6) 용액 C를 용액 B에 첨가하여 용액 D를 형성하는 단계;
- [0018] (7) 절연 반응을 위해 적당량의 제1 유기 염기를 용액 D에 첨가하는 단계;
- [0019] (8) 단계 (7)의 반응이 완료된 후, 추출을 위해 충분한 양의 제2 저극성 용매 및 정제수를 단계 (7)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하는 단계;
- [0020] (9) 단계 (8)에서 수집된 유기상을 적당량의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액으로 순차 세척하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하고, 건조하여 화합물 4를 수득하는 단계;
- [0021] (10) 화합물 4를 제4 유기 용매에 용해시켜 용액 E를 형성하는 단계;
- [0022] (11) 절연 반응을 위해 충분한 양의 디에틸아민을 용액 E에 첨가하고, Fmoc 보호기를 제거하는 단계;
- [0023] (12) 반응이 완료된 후, 추출을 위해 적당량의 제5 유기 용매 및 정제수를 단계 (11)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하는 단계;
- [0024] (13) 크로마토그래피 정제를 단계 (12)에서 수득된 감압 농축물 상에서 톨루엔: 메탄올의 용출 시스템에 의해 수행하고, 수집된 용리액을 감압 농축하는 단계;
- [0025] (14) 단계 (13)에서 수득된 감압 농축 생성물을 제6 유기 용매로 용해시키고, 여과하고, 여과액을 감압 농축하는 단계; 및
- [0026] (15) 단계 (14)에서 수득된 감압 농축 생성물을 감압 진공 건조하여 MMAE를 수득하는 단계.
- [0027] 추가로, 단계 1의 제1 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되며; 바람직하게는, 단계 1의 제1 유기 용매는 디클로로메탄이다.
- [0028] 추가로, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:2이고; 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1-3이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 제1 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1.5-2.5이다.
- [0029] 추가로, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 4mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 3-7mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 3.5-4.5mol/L이다.
- [0030] 추가로, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직

하계는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-8이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-7이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6이다.

- [0031] 추가로, 단계 (2)의 HCl-1,4-디옥산 용액을 적가하고, 적가 동안 반응 시스템의 내부 온도는 -5-5℃ 사이로 유지한다.
- [0032] 추가로, 단계 (2)의 절연 반응의 온도는 10-15 ℃이다.
- [0033] 추가로, 단계 (3)의 제1 저극성 용매는 n-헥산, 석유 에테르, n-헵탄으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제1 저극성 용매는 n-헥산으로부터 선택된다.
- [0034] 추가로, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:16이고; 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:10-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:12-20이고; 더욱 바람직하게는, 단계 1의 화합물 1 대 단계 (3)의 제1 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-17이다.
- [0035] 추가로, 단계 (4)의 제2 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제2 유기 용매는 DMF이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)에서, 화합물 2 및 화합물 3의 몰량이 동일하다.
- [0036] 추가로, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mp)는 1:5-8이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 제2 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-7이다.
- [0037] 추가로, 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제는 HATU, DIC, DCC, EDC, HCTU, DEPBT, EEDQ 및 CDI로부터 선택되고; 바람직하게는 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제는 HATU이다.
- [0038] 추가로, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 약 1:1.2이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.01-1.5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.1-1.4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제1 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.2-1.3이다.
- [0039] 추가로, 단계 (5)의 제3 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제3 유기 용매는 DMF이다.
- [0040] 추가로, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2-6이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (5)의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2.5-4이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 5의 제3 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4이다.
- [0041] 추가로, 단계 (6)에서, 용액 C를 용액 B에 적가하고, 적가 동안 전체 반응 시스템의 내부 온도는 0-5℃이다.
- [0042] 추가로, 단계 (7)의 제1 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 및 피리딘으로부터 선택되는 하나 이상이고; 바람직하게는 단계 (7)의 제1 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민이다.
- [0043] 추가로, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제 1 유기 염기의 몰비는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:2-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:2.5-4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (7)의 제1 유기 염기의 몰비는 1:3-4이다.
- [0044] 추가로, 단계 (7)의 제1 유기 염기를 용액 D에 적가하고, 절연 반응의 온도는 0-5℃이다.
- [0045] 추가로, 단계 (8)의 제2 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 및 테트라하이드로퓨란으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (8)의 제2 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르이다.
- [0046] 추가로, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:20.2:20.2이고; 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-25:15-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-24:20-24이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (4)의 화합물 3 대 단계 (8)의

제2저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-21:20-21이다.

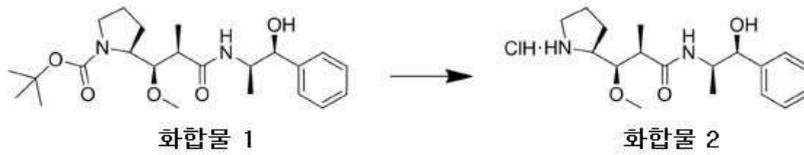
- [0047] 추가로, 단계 (8)의 제2 저극성 용매 및 정제수의 부피는 동일하다.
- [0048] 추가로, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 약 0.05mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.02-0.08mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.04-0.06mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (9)의 염산 용액의 농도는 0.05mol/L이다.
- [0049] 추가로, 단계 (9)의 염화 나트륨 용액의 농도는 약 30%이고; 바람직하게는, 단계 (9)의 염화 나트륨 용액의 농도는 20%-40%이다.
- [0050] 추가로, 단계 (9)의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액의 부피는 단계 (8)의 제2저극성 용매의 부피와 동일하다.
- [0051] 추가로, 단계 (10)의 제4 유기 용매는 디클로로메탄, 아세트니트릴, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (10)의 제4 유기 용매는 디클로로메탄이다.
- [0052] 추가로, 단계 (10)의 화합물 4 및 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 제4 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-8이다.
- [0053] 추가로, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3.5이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (11)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4이다.
- [0054] 추가로, 단계 (11)의 디에틸아민을 용액 E에 적가하고, 이 적가 공정에서, 용액의 내부 온도를 0℃ 내지 5℃ 사이로 유지하고; 단계 (11)의 절연 반응의 온도는 20-30℃이다.
- [0055] 추가로, 단계 (12)의 제5 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 사염화탄소 및 톨루엔으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (12)의 제5 유기 용매는 디클로로메탄이다.
- [0056] 추가로, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7:10이고; 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10:5-15이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (12)의 제5 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-8:9-12이다.
- [0057] 추가로, 단계 (13)의 크로마토그래피 정제에서 사용되는 실리카겔은 200-300 메쉬 실리카겔이고; 용출 시스템은 10-20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; 바람직하게는 용출 시스템은 처음에 약 20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이다. TLC에서 생성물만 보이는 것으로 검출되면(예를 들어, 생성물 반점만), 용출 시스템을 약 10:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올로 변경한다. 물론, 용출 시스템을 교체할 수 없을 수 있고, 여기서 용출 시스템 교체의 목적은 생성물을 보다 빠르게 용출시키고 생산 공정에서 시간 및 비용을 절약하기 위한 것이다.
- [0058] 추가로, TLC 검출의 현상제는 약 5:1의 부피비의 톨루엔: 메탄올이다.
- [0059] 추가로, 단계 (14)의 제6 유기 용매는 메탄올, 톨루엔 및 아세트니트릴로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (14)의 제6 유기 용매는 메탄올이다.
- [0060] 추가로, 단계 (10)의 화합물 4 대 단계 (14)의 제6 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3-10이다.
- [0061] 추가로, 단계 (14)의 공정은 1-5회 반복될 수 있다.
- [0062] 본 발명은 또한 하기 화학식으로 나타나는 화합물의 제조 및 정제 방법을 제공한다:



화합물 2

[0063]

[0064] 방법의 제조 경로는 하기와 같다:



[0065]

[0066] 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0067] (1-1). 화합물 1을 적당량의 제7 유기 용매에 용해시켜 용액 F를 형성하는 단계;

[0068] (1-2). 절연 반응을 위해 충분한 양의 HCl-1,4-디옥산 용액을 용액 F에 첨가하고, Boc 보호기를 제거하는 단계; 및

[0069] (1-3). 반응이 완료된 후, 단계 (1-2)의 반응 용액을 충분한 양의 제3 저극성 용매에 붓고, 교반 한 후 여과액을 폐기하고, 건조 후 고형분 잔류물이 화합물 2가 되는 단계;

[0070] 추가로, 단계 (1-1)의 제7 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 그리고 바람직하게는, 단계 (1-1)의 제1 유기 용매는 디클로로메탄인 단계.

[0071] 추가로, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 제7 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:2이고; 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 제7 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1-3이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 제7 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:1.5-2.5이다.

[0072] 추가로, 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 4mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 약 3-7mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 농도는 3.5-4.5mol/L이다.

[0073] 추가로, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-8이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-7이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6이다.

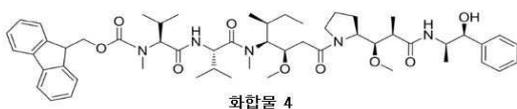
[0074] 추가로, 단계(1-2)의 HCl-1,4-디옥산 용액을 적가하고, 적가 동안 반응 시스템의 내부 온도는 -5-5℃ 사이로 유지한다.

[0075] 추가로, 단계 (1-2)의 절연 반응의 온도는 10-15℃이다.

[0076] 추가로, 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매는 n-헥산, 석유 에테르, 및 n-헵탄으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매는 n-헥산으로부터 선택된다.

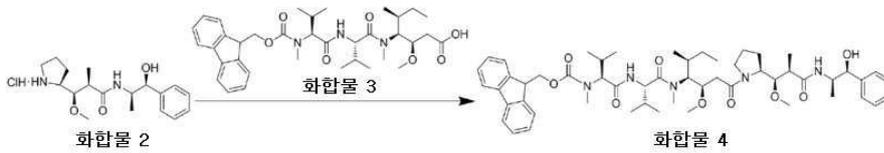
[0077] 추가로, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매는 약 1:16이고; 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:10-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:12-20이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (1-1)의 화합물 1 대 단계 (1-3)의 제3 저극성 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-17이다.

[0078] 본 발명은 또한 하기 화학식으로 나타나는 화합물의 제조 및 정제 방법을 제공한다:



[0079]

[0080] 방법의 준비 경로는 하기와 같다:



[0081]

[0082] 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0083] (2-1). 화합물 2 및 적당량의 화합물 3을 제8 유기 용매에 용해시켜 용액 G를 형성하는 단계;

[0084] (2-2). 제2 폴리펩타이드 축합제를 적당량의 제9 유기 용매에 용해시켜 용액 H를 형성하는 단계로서, 여기서 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰수는 단계 (2-1)의 화합물 3의 몰수보다 큰, 단계;

[0085] (2-3). 용액 H를 용액 G에 첨가하여 용액 I를 형성하는 단계;

[0086] (2-4). 절연 반응을 위해 적당량의 제2 유기 염기를 용액 I에 첨가하는 단계;

[0087] (2-5). 반응이 완료된 후, 추출을 위해 충분한 양의 제4 저극성 용매 및 정제수를 단계 (2-4)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하는 단계; 및

[0088] (2-6). 단계 (2-5)에서 수집된 유기상을 적당량의 염산 용액, 정제수 및 염화 나트륨 용액으로 순차 세척하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하고, 건조하여 화합물 4를 수득하는 단계.

[0089] 추가로, 단계 (2-1)의 제8 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제8 유기 용매는 DMF이다.

[0090] 추가로, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:6이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mp)는 1:5-8이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 제8 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-7이다.

[0091] 추가로, 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제는 HATU, DIC, DCC, EDC, HCTU, DEPBT, EEDQ 및 CDI로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제는 HATU이다.

[0092] 추가로, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 약 1:1.2이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.01-1.5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.1-1.4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제2 폴리펩타이드 축합제의 몰비는 1:1.2-1.3이다.

[0093] 추가로, 단계 (2-2)의 제9 유기 용매는 DMF, DMA, DMSO, 및 DCM으로부터 선택되고; 바람직하게는, 제9 유기 용매는 DMF이다.

[0094] 추가로, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2-6이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:2.5-4이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-2)의 제9 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4이다.

[0095] 추가로, 단계 (2-3)에서, 용액 H를 용액 G에 적가하고, 적가 동안 전체 반응 시스템의 내부 온도는 0-5°C이다.

[0096] 추가로, 단계 (2-4)의 제2 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 및 피리딘 로부터 선택되는 하나 이상이고; 바람직하게는, 단계 (2-4)의 제2 유기 염기는 N,N-디이소프로필에틸아민이다.

[0097] 추가로, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 약 1:3이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:2-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:2.5-4이고; 보다 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-4)의 제2 유기 염기의 몰비는 1:3-4이다.

[0098] 추가로, 단계 (2-4)에서, 제2 유기 염기를 용액 I에 적가하고, 절연 반응의 온도는 0-5°C이다.

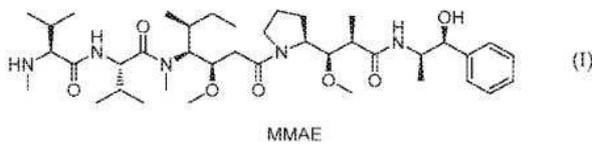
[0099] 추가로, 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 및 테트라하이드로퓨란으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (2-5)의 제2 저극성 용매는 메틸 tert-부틸 에테르이다.

[0100] 추가로, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:20.2:20.2이고; 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:15-25:15-25이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-24:20-24이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-1)의 화합물 3 대 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:20-21:20-21이다.

[0101] 추가로, 단계 (2-5)의 제4 저극성 용매 및 정제수의 부피는 동일하다.

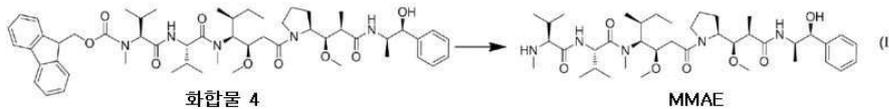
[0102] 추가로, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 약 0.05mol/L이고; 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.02-0.08mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.04-0.06mol/L이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (2-6)의 염산 용액의 농도는 0.05mol/L이다.

[0103] 발명은 또한 하기 화학식(I)로 나타나는 화합물의 제조 및 정제 방법을 제공한다:



[0104]

[0105] 방법의 제조 경로는 하기와 같다:



[0106]

[0107] 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0108] (3-1). 화합물 4를 제10 유기 용매에 용해시켜 용액 J를 형성하는 단계;

[0109] (3-2). 절연 반응을 위해 충분한 양의 디에틸아민을 용액 J에 첨가하고, Fmoc 보호기를 제거하는 단계;

[0110] (3-3). 반응이 완료된 후, 추출을 위해 적당량의 제11 유기 용매 및 정제수를 단계 (3-2)의 반응 시스템에 첨가하고, 유기상을 수집하고, 무수 황산 나트륨에 의해 건조하고, 감압 농축하는 단계;

[0111] (3-4). 크로마토그래피 정제를 단계 (3-3)에서 수득된 감압 농축물 상에서 톨루엔: 메탄올 용출 시스템에 의해 수행하고, 수집된 용리액을 감압 농축하는 단계;

[0112] (3-5). 단계 (3-4)에서 수득된 감압 농축 생성물을 제12 유기 용매로 용해시킨 후, 여과하고, 여과액을 감압 농축하는 단계; 및

[0113] (3-6). 단계 (3-5)에서 수득된 감압 농축 생성물을 진공 건조하여 MMAE를 수득하는 단계.

[0114] 추가로, 단계 (3-1)의 제10 유기 용매는 디클로로메탄, 아세토니트릴, 트리클로로메탄 및 사염화탄소로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 제10 유기 용매는 디클로로메탄이다.

[0115] 추가로, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:4-10이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 제10 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-8이다.

[0116] 추가로, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3.5이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-5이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-2)의 디에틸아민의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:3-4이다.

[0117] 추가로, 단계 (3-2)의 디에틸아민을 적가하고, 적가 공정에서, 내부 온도는 0℃ 및 5℃사이로 유지하고; 단계 (3-2)의 절연 반응의 온도는 20-30℃이다.

- [0118] 추가로, 단계 (3-3)의 제11 유기 용매는 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 사염화탄소 및 톨루엔으로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-3)의 제11 유기 용매는 디클로로메탄이다.
- [0119] 추가로, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:7:10이고; 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:5-10:5-15이고; 더욱 바람직하게는, 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-3)의 제11 유기 용매 및 정제수의 중량 대 부피비(g/mL)는 1:6-8:9-12이다.
- [0120] 추가로, 단계 (3-4)의 크로마토그래피 정제에서 사용되는 실리카겔은 200-300 메쉬 실리카겔이고; 용출 시스템은 10-20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; 바람직하게는, 용출 시스템은 처음에 약 20:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이고; TLC에서 생성물만 보이는 것으로 검출되면, 용출 시스템을 약 10:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올로 변경한다.
- [0121] 추가로, TLC 검출의 현상제는 약 5:1의 부피비(V/V)의 톨루엔: 메탄올이다.
- [0122] 추가로, 단계 (3-5)의 제12 유기 용매는 메탄올, 톨루엔 및 아세트니트릴로부터 선택되고; 바람직하게는, 단계 (3-5)의 제12 유기 용매는 메탄올이다.
- [0123] 단계 (3-1)의 화합물 4 대 단계 (3-5)의 제12 유기 용매의 중량 대 부피비(g/mL)는 약 1:3-10이다.
- [0124] 추가로, 단계 (3-5)의 공정은 1-5회 반복될 수 있다.
- [0125] 본 발명에 의해 제공되는 MMAE의 제조 및 정제 공정은 온건한 합성 및 정제 조건을 가지고, 과도한 고온에 의해 야기된 생성물의 키랄성 변화를 효과적으로 방지할 수 있고, 분해 불순물의 생성을 크게 감소시키고, 생성물의 순도를 향상시키고, 생성물의 수율을 증가시킨다. 또한, 본 발명에 의해 제공되는 제조 및 정제 공정은 우수한 안정성을 가지고 대규모 생산에 더욱 적합하다. 본 발명에 의해 제공되는 제조 및 정제 공정에 의해 제조된 MMAE는 99% 초과 순도를 가지고, 임상 약물 기준 요건을 완벽하게 충족할 수 있다.

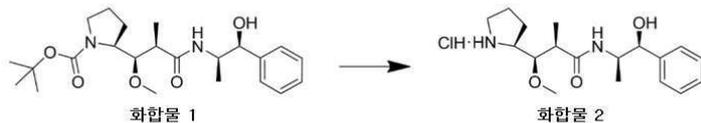
도면의 간단한 설명

- [0126] 도 1은 화합물 2의 크로마토그램이다.
 도 2는 화합물 4의 크로마토그램이다.
 도 3은 화합물 MMAE의 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0127] 본 발명의 기술 솔루션은 구체적인 구현예와 함께 제한없이 상세하게 추가로 하기에 설명될 것이다. 하기의 구현예는 단지 본 발명의 기술적 개념 및 특징을 예시하기 위한 것이고, 당업자가 본 발명의 내용을 이해하고 그에 따라 이를 구현할 수 있도록 하기 위한 것이고, 본 발명의 보호 범위를 제한할 수 없음을 주목하여야 한다. 본 발명의 진정한 의미에 따라 만들어지는 모든 동등한 변경 또는 수정은 본 발명의 보호 범위 내에 포함되어야 한다.

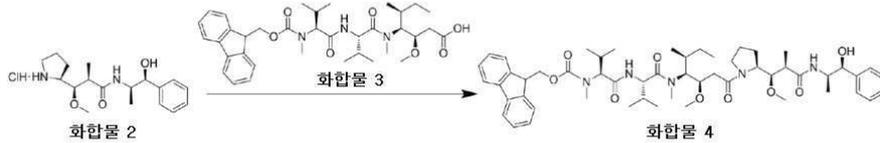
- [0128] 실시예 1 화합물 2의 제조 및 정제



- [0129]
- [0130] 115.05g의 화합물 1 (273.58mmol) 및 230mL의 디클로로메탄($V_{\text{디클로로메탄}}/W_{\text{화합물 1}}=2.0$)을 반응 플라스크에 첨가하였다. 내부 온도를 0-5℃까지 조절하고, 690mL의 4mol/L HCl-1,4-디옥산 용액($V_{4\text{mol/L HCl-1,4-디옥산 용액}}/W_{\text{화합물 1}}=6.0$)을 적가하였다. 적가 후, 온도를 10℃까지 상승시켰고, 온도를 10-15℃에서 유지하여 1시간 동안 반응시켰다. 초고 성능 액체 크로마토그래피를 샘플링하여 반응을 모니터링한 후, UPLC를 매 0.5시간마다 샘플링하여 반응을 모니터링하고, 샘플을 취하여 화합물 1의 잔량을 검출하였다. 화합물 1의 잔량이 1.0% 미만이면, 반응이 완료된 것으로 간주되었다.

[0131] 반응이 완료된 후, 상기 반응 용액을 1840 mL의 n-헥산($V_{n\text{-헥산}}/W_{\text{화합물 1}}=16.0$)을 함유하는 반응 플라스크에 교반 하에서 천천히 부었다(n-헥산은 사전에 0-5℃까지 냉각시킬 수 있음). 교반을 30분 동안 연속하고 상청액을 따라냈다. 반응 플라스크 내의 고형분을 다이얼프램 진공 펌프로 30-35℃에서 1±0.5시간 동안 진공 건조하였다. 오일펌프를 사용하여 실온(18-26℃)에서 진공 하에 12시간 이상 연속적으로 건조하였고, 화합물 2(119%의 수율, 95.4%의 순도, 및 1.4%의 최대 단일 불순물을 가짐)는 중량 변화가 없을 때 수득하였다. 이의 크로마토그램이 도 1에 나타난다.

[0132] 실시예 2 화합물 4의 제조 및 정제



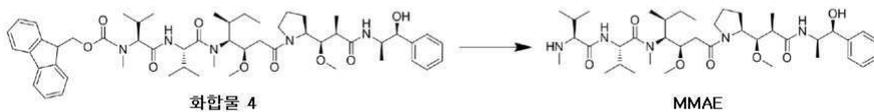
[0133]

[0134] 114.17g의 화합물 2 (301.52mmol), 192.31g의 화합물 3 (301.52mmol) 및 1160mL의 DMF($V_{\text{DMF}}/W_{\text{화합물 3}}=6.0$)를 반응 플라스크에 순차 첨가하였고, 또 다른 139.04g의 HATU (365.67mmol)를 580mL의 DMF($V_{\text{DMF}}/W_{\text{화합물 3}}=3.0$)에 용해시켜, HATU의 DMF 용액을 형성하였다. 내부 온도는 0-5℃에서 조절하고, HATU의 DMF 용액을 화합물 2 및 화합물 3의 DMF 용액에 적가하였다. 적가가 완료된 후, 내부 온도를 0-5℃에서 20±2분 동안 조절하였다. 이어서, 118.07g의 N,N-디이소프로필에틸아민(913.50mmol)을 0-5℃에서의 내부 온도의 조절 하에 적가하고; 적가 후, 온도를 0-5℃에서 유지하여 1시간 동안 반응시켰다. UPLC에 대한 샘플링을 수행하여 반응을 모니터링 한 다음, 샘플링을 매 0.5시간마다 수행하여 화합물 3의 잔량을 검출하였다. 화합물 3의 잔량이 6.0% 미만이면, 반응이 완료된 것으로 간주되었다.

[0135] 반응이 완료된 후, 반응 용액을 30L 유리 반응기로 옮기고, 추출을 위해 3900mL의 메틸 tert-부틸 에테르 및 3900mL의 정제수(사전에 0℃까지 냉각시킴)를 순차 첨가하고, 유기상을 분리하였다. 수성상을 3900mL의 메틸 tert-부틸 에테르로 2회 더 추출하였다. 유기상을 결합하였다.

[0136] 상기 유기상을 3900mL의 0.05mol/L 염산 용액 (사전에 0℃까지 냉각시킴)으로 세척하고, 유기상을 수집하였다. 유기상을 3900mL의 정제수($V_{\text{정제수}}/W_{\text{화합물 3}}=20.2$) (사전에 0℃까지 냉각시킴)로 세척하고, 유기상을 수집하였다. 이어서 유기상을 3900mL의 30% 염화 나트륨 수용액으로 세척하고, 유기상을 수집하였다. 그런 다음, 유기상을 교반하고 388.48g의 무수 황산 나트륨으로 0.5시간 동안 건조하였다. 건조제를 여과 제거하고, 필터 케이크를 1950 mL의 메틸 tert-부틸 에테르로 세척하고, 여과액을 결합한 다음, 30-35℃에서 감압 농축하여 발포하였다. 오일 펌프를 적어도 1시간 동안 진공 건조하였고, 중량 변화가 없을 때 화합물 4(112%의 수율, 88.6%의 순도, 5.6%의 최대 단일 불순물을 가짐)를 수득하였다. 이의 크로마토그램은 도 2에 나타난다.

[0137] 실시예 3 MMAE의 제조 및 정제



[0138]

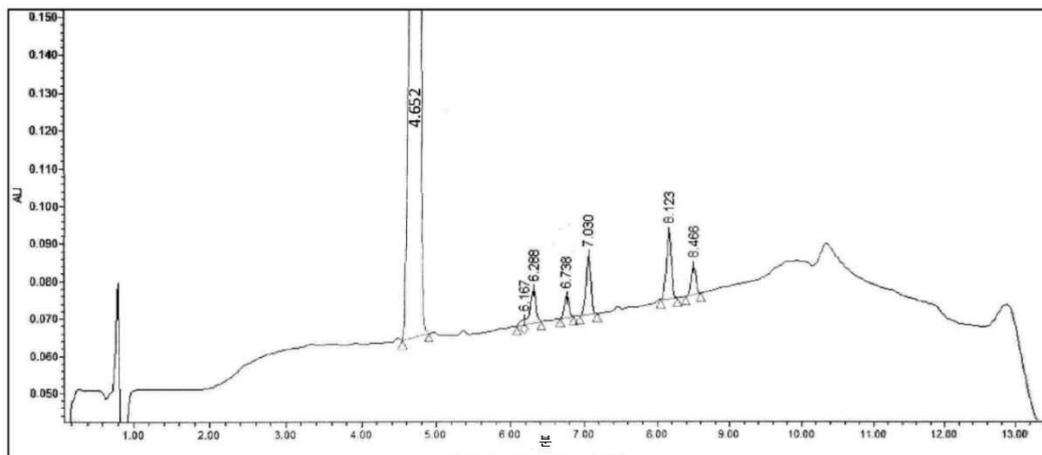
[0139] 307.22g의 화합물 4(326.75mmol) 및 1900 mL의 디클로로메탄을 반응 플라스크에 첨가하였다. 내부 온도를 0-5℃에서 조절하고, 950mL의 디에틸아민을 적가하였다. 적가 후, 온도를 20℃까지 상승시켜 타이밍 반응을 시작하였고, 온도를 20-30℃에서 유지하여 10시간 동안 반응시켰다. UPLC에 대한 샘플링을 수행하여 반응을 모니터링하였고, UPLC에 대한 샘플링을 매 1시간마다 반응을 모니터링하였고, 샘플링을 수행하여 화합물 4의 잔량을 검출하였다. 화합물 4의 잔량이 1.0% 미만이면, 반응이 완료된 것으로 간주되었다.

[0140] 반응이 완료된 후, 반응 용액을 30L 유리 반응기로 옮겼고, 1900mL의 디클로로메탄 를 첨가하고, 2700mL의 정제수(사전에 0℃까지 냉각시킴)로 2회 세척하고, 유기상을 분리하였다. 유기상을 교반하고 542.04g의 무수 황산 나트륨으로 0.5시간 동안 건조하였고, 건조제를 여과 제거하고, 필터 케이크를 810 mL의 디클로로메탄으로 세척하고, 여과액을 결합하였다. 여과물을 30-35℃에서 감압 농축하여 발포하였다. 오일 펌프를 사용하여 실온(18-26℃)에서 적어도 1시간 동안 진공 건조하였고, 중량 변화가 없을 때 조 MMAE를 수득하였다.

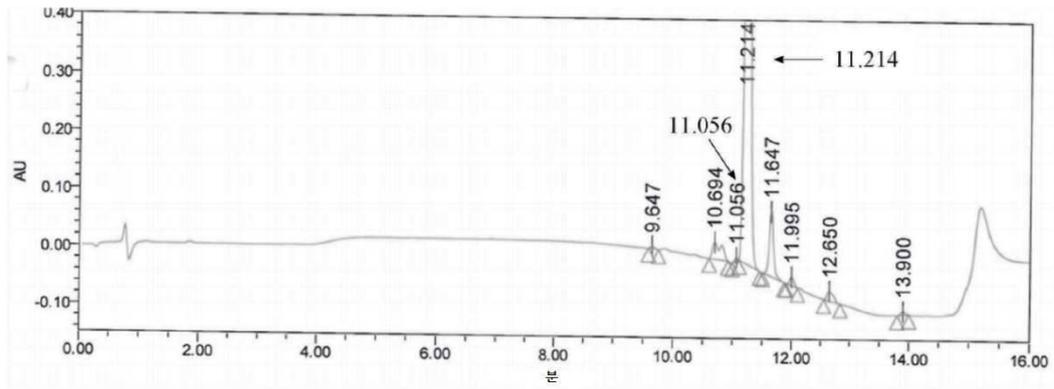
- [0141] 크로마토그래피 컬럼을 세척한 후, 컬럼을 충전하였다: 13986.14g의 실리카겔(200-300 메쉬) 및 40L의 톨루엔을 균일한 유동상태로 교반 한 후, 배치(1시간 동안 스탠딩) 중 크로마토그래피 컬럼으로 옮겼고, 5-8cm의 톨루엔을 실리카겔 상단에 유지하고, 실리카 표면 상의 톨루엔을 빼내었다.
- [0142] 262.17 g의 조 MMAE를 500 mL의 디클로로메탄에 용해시켰고; 조 MMAE의 디클로로메탄 용액을 체에 천천히 붓고, 첨가한 후, 샘플 표면 상의 액체를 빼내어 샘플의 상단 표면이 편평해지도록 하였고, 2896.58g의 무수 황산 나트륨을 실리카 컬럼의 상단에 첨가하였다. 30L 이중층 유리 반응기를 사용하여 용리액을 제조하였고, 용리액을 2-8℃까지 냉각시키고, 처음에 235.2L의 톨루엔: 메탄올=20:1 (V/V) 시스템으로 용출시켰고, 검출은 컬러 밴드가 완전히 날아갈 때까지 수행하지 않았다. 컬러 밴드가 날아간 후, 박층 크로마토그래피(TLC) 검출을 시작하였고(현상제는 $V_{\text{톨루엔}}: V_{\text{메탄올}}=5:1$, 요오드를 발색에 사용함), 생성물만 보일 때, 140.8L의 톨루엔: 메탄올=10:1 (V/V)을 대신 사용하여 생성물이 완전히 날아갈 때까지 연속 용출하였다(TLC에 의해서는 생성물이 검출되지 않음).
- [0143] MMAE의 순수 분획을 결합하고 35-40℃에서 감압 농축하여 발포하였다. 1200mL의 메탄올에 용해시킨 후, 생성물을 여과하고 35-40℃에서 감압 농축하였고; 작업이 2회 반복하였다. 오일 펌프 진공 하에서 40-45℃에서 10-18시간 동안 건조한 후, 균일한 분말을 수득할 때까지 분쇄를 여러 번 수행하였다. 총 36시간 동안 연속 건조한 후, 샘플링을 매 6-12시간마다 시작하여 메탄올 및 톨루엔 용매 잔류물을 검출하였다. 메탄올 잔류물이 0.200% 이하 및 톨루엔 잔류물이 0.089% 이하일 때, 건조를 중단하여 71.79%의 수율, 99.8%의 순도, 0.2%의 단일 불순물을 갖는 정제된 MMAE를 수득하였다. 이 크로마토그램은 도 3에 보여진다.
- [0144] 본 발명은 다양한 특정 구현예에 의해 예시되었다. 그러나, 당업자는 본 발명이 각 구체적인 구현예에 제한되는 것이 아님을 이해할 수 있고, 당업자는 본 발명의 범위 내에서 다양한 변경 또는 수정을 만들 수 있고, 본 명세서의 여러 곳에서 언급되는 여러 기술적 특징은 본 발명의 진정한 의미 및 범위로 부터 벗어나지 않고 서로 결합될 수 있다. 그러한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 내에 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

