



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108713020 A

(43)申请公布日 2018. 10. 26

(21)申请号 201780014867.4

A · 佐格

(22)申请日 2017.03.03

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(30)优先权数据

62/303,556 2016.03.04 US

代理人 胡晨曦 黄革生

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.03

(51)Int.Cl.

C07D 498/04(2006.01)

C07C 215/78(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/020711 2017.03.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/152083 EN 2017.09.08

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 S·巴赫曼 S·M·凡塔西亚

M·杰森 S·凯尼格 X·令狐

S·里特 N·L·西格雷夫斯

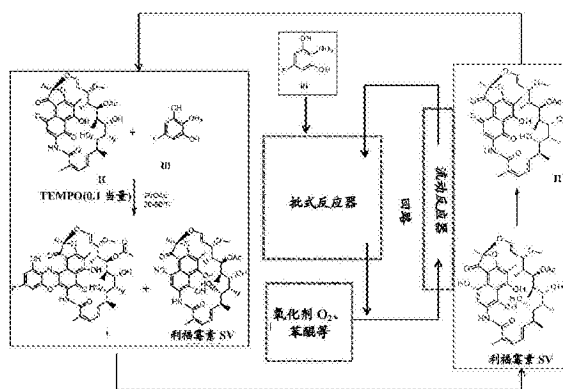
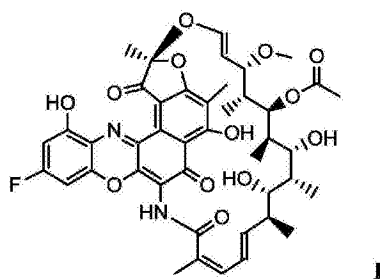
权利要求书4页 说明书21页 附图1页

(54)发明名称

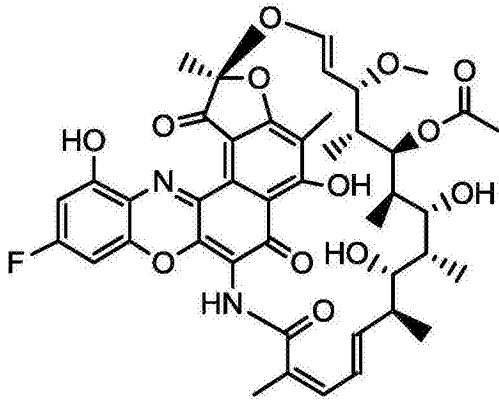
制备抗体-利福霉素缀合物的方法

(57)摘要

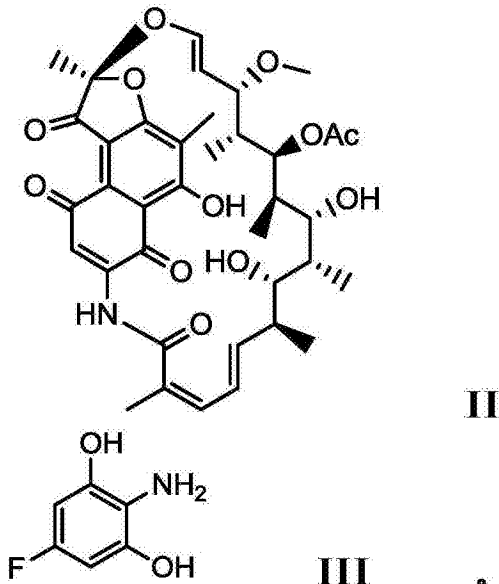
描述了制备F-苯并噁嗪并利福霉素I的方法以及用于与抗体缀合的中间体。



1. 制备F-苯并噁嗪并利福霉素I的方法，



其包括将利福霉素S II、2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III和选自以下的一种或多种氧化剂反应：TEMPO和TEMPO类似物、环境空气、氧气、苯醌、氧化锰 (MnO_2)、(PhI (OTs) OH)、高碘酸钠 ($NaIO_4$)、氯醌、过氧化氢、 Fe_2O_3 、 $Na_2S_2O_8$ 、 $Co(acac)_3$ 、 $Mn(acac)_2$ 、 $Cu(OAc)_2$ 、 CuO 、 $CuBr_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $InCl_3$ 、 $Ag(OTf)_2$ 、 $Sc(OTf)_3$ 和 $Yb(OTf)_3$ ，以形成I



2. 如权利要求1所述的方法，其中氧化剂包含氧气。

3. 如权利要求2所述的方法，其中氧气占反应气相的约5%至约100%。

4. 如权利要求2所述的方法，其中氧化剂包含催化量的TEMPO。

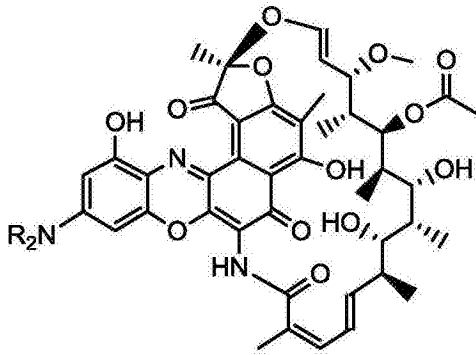
5. 如权利要求2所述的方法，其中氧化剂包含催化量的铜盐。

6. 如权利要求5所述的方法，其中所述铜盐是氧化铜。

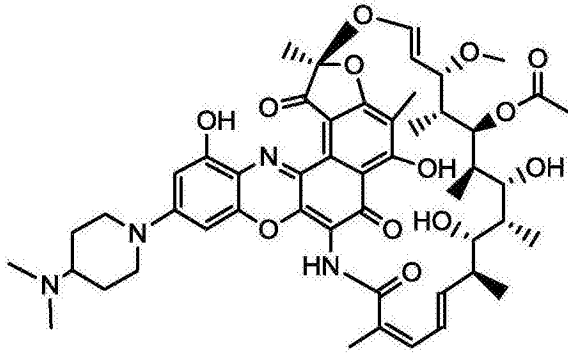
7. 如权利要求2所述的方法，其中氧化剂通过半连续方法与III分离，并且II通过环路法重新形成和再循环。

8. 如权利要求1所述的方法，其中II和III的反应在选自乙酸异丙酯、乙酸乙酯、甲苯、甲醇和四氢呋喃的溶剂中进行。

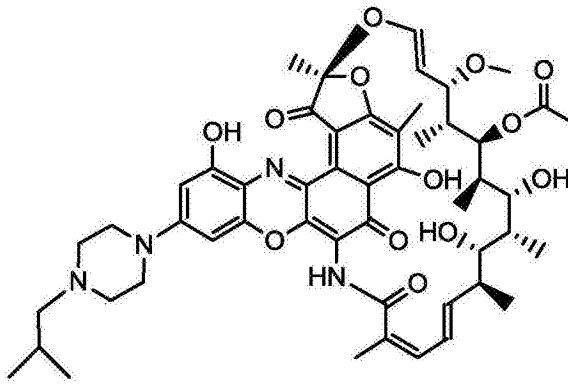
9. 如权利要求1所述的方法，其还进一步包括将F-利福霉素I和仲胺 R_2NH 反应形成IV，所述仲胺选自二甲胺、二乙胺、二正丙胺、1-甲基哌嗪、N1-异丁基哌嗪和N,N-二甲基哌啶-4-胺；



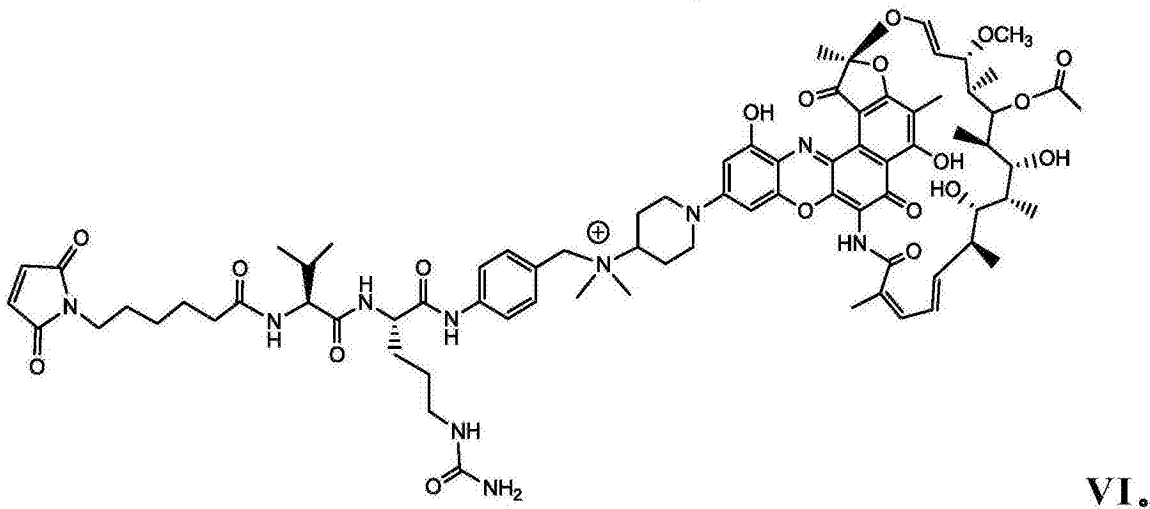
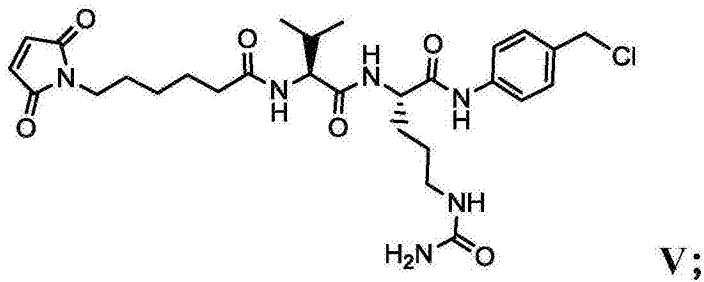
10. 如权利要求9所述的方法,其中仲胺是N,N-二甲基哌啶-4-胺,且IV具有结构IVa:



11. 如权利要求9所述的方法,其中仲胺是N1-异丁基哌嗪,且IV具有结构IVb:



12. 如权利要求9所述的方法,其进一步包括将IVa和V反应,以形成连接体-抗生素VI;

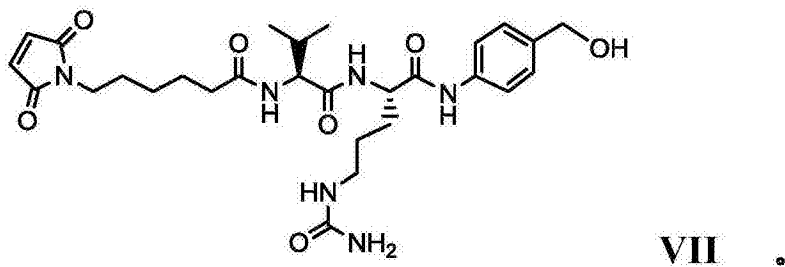


13. 如权利要求12所述的方法,其进一步包括将VI与抗体在含水混合物中反应,以形成抗体-利福霉素缀合物。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述含水混合物包含选自丙二醇、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)和二甲基亚砜(DMSO)的溶剂。

15. 如权利要求13所述的方法,其中所述抗体是抗-壁磷壁酸抗体。

16. 如权利要求12所述的方法,其进一步包括将VII与亚硫酰氯反应,以形成V;

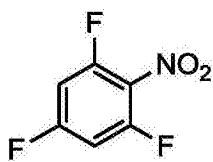
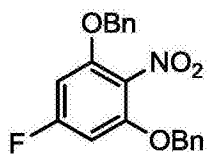


17. 如权利要求16所述的方法,其中V从水中分离。

18. 制备2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III的方法,包括:



(a) 将1,3,5-三氟-2-硝基苯VIII、苯甲醇与选自二(三甲基甲硅烷基氨基)锂、二异丙基氨基锂和醇盐试剂的碱性试剂反应,以形成((5-氟-2-硝基-1,3-亚苯基)二(氧基))二(亚甲基)二苯IX

**VIII**

和

IX ;

(b) 将IX与氢气和异相的金属催化剂反应,以形成III。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述醇盐试剂选自叔丁醇钾、叔丁醇钠、异丙醇钾、异丙醇钠、乙醇钾、乙醇钠、甲醇钾和甲醇钠。

20. 如权利要求18所述的方法,其中所述醇盐试剂是叔丁醇钾。

21. 如权利要求18所述的方法,其中所述异相金属催化剂选自在碳或氧化铝支持物上的钯、铂或钨。

22. 如权利要求18所述的方法,其中IX与氢气和异相金属催化剂反应形成脱苄基化的中间体5-氟-2-硝基苯-1,3-二醇,将其分离,然后用氢气和异相金属催化剂进一步处理以形成III。

制备抗体-利福霉素缀合物的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 根据37 CFR§1.53 (b) 提交的该非临时申请要求根据35USC§119 (e) 于2016年3月4日提交的美国临时申请序号62/303,556的的权益,该临时申请通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及制备抗体-利福霉素缀合物化合物的方法。

[0004] 发明背景

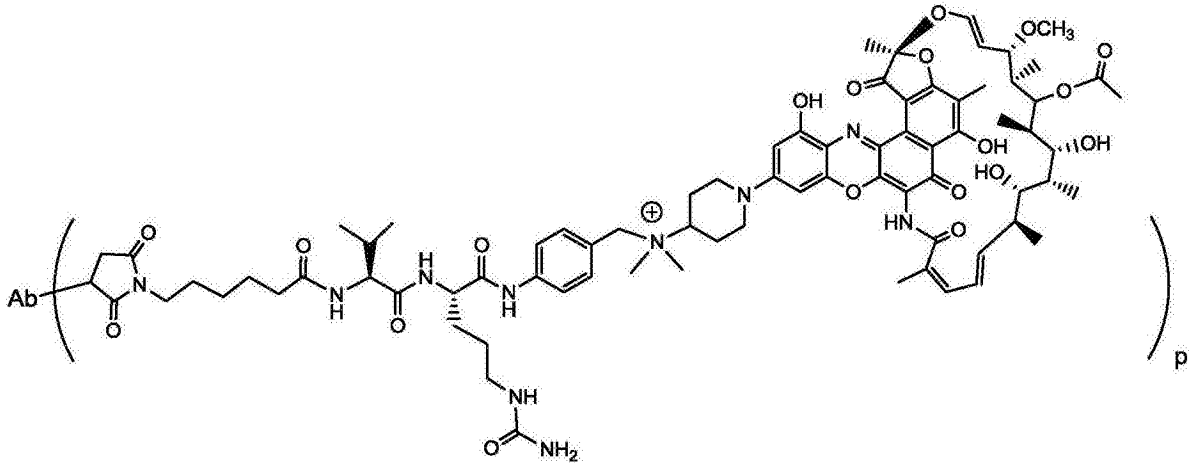
[0005] 抗体-药物缀合物(ADC),也称为免疫缀合物,是靶向化学治疗分子,其通过将有效的细胞毒性药物靶向于表达抗原的肿瘤细胞,结合了抗体和细胞毒性药物的理想特性(Teicher,B.A. (2009) Curr.Cancer Drug Targets9:982-1004),从而通过最大化功效和最小化脱靶毒性来增强治疗指数(Carter,P.J.和Senter P.D. (2008) The Cancer Jour.14 (3):154-169;Chari,R.V. (2008) Acc.Chem.Res.41:98-107。ADC包含通过连接体单元共价连接至细胞毒性药物部分的靶向抗体。免疫缀合物允许将药物部分靶向递送至肿瘤,并在其中的细胞内蓄积,而全身施用未缀合的药物可导致对正常细胞和想要清除的肿瘤细胞的不可接受的毒性水平(Polakakis P. (2005) Curr.Opin.Pharmacol.5:382-387)。

[0006] ADC在癌症治疗中的概念已经扩展到抗菌疗法,其中药物部分是抗生素,产生抗体-抗生素缀合物(AAC)。抗WTA单克隆抗体通过共价连接体与一个或多个利福霉素类抗生素部分(Lehar,S.等人(2015)“Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S.aureus”Nature527 (7578) 323-328;Staben,L.R.,等人(2016)“Targeted drug delivery through the traceless release of tertiary and heteroaryl amines from antibody-drug conjugates”Nature Chemistry 8(12):1112-1119;Zhou,C.,等人(2016)“Pharmacokinetics and pharmacodynamics of DSTA4637A:A novel THIOMAB™antibody antibiotic conjugate against Staphylococcus aureus in mice”MABS 8(8):1612-1619;WO2014/194247)以及其它抗生素(WO 2014/193722)连接而缀合。已经证明,小鼠中金黄色葡萄球菌的细胞内储库包含即使在万古霉素存在下也可以建立感染的有毒细菌亚群。抗WTA利福霉素缀合物是一种有效杀死细胞内金黄色葡萄球菌的新型治疗剂。该抗体-抗生素缀合物(AAC)由与高效抗生素缀合的金黄色葡萄球菌靶向抗体组成,其仅在吞噬溶酶体的蛋白水解环境中释放后才被激活。所述抗体-抗生素缀合物在治疗菌血症中优于万古霉素,并提供细胞内金黄色葡萄球菌代表侵入性感染的重要组分的直接证据。

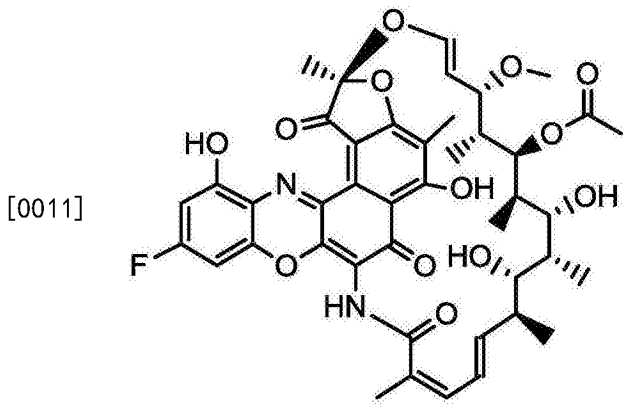
[0007] 发明简述

[0008] 本发明涉及制备抗体-利福霉素缀合物化合物的方法:

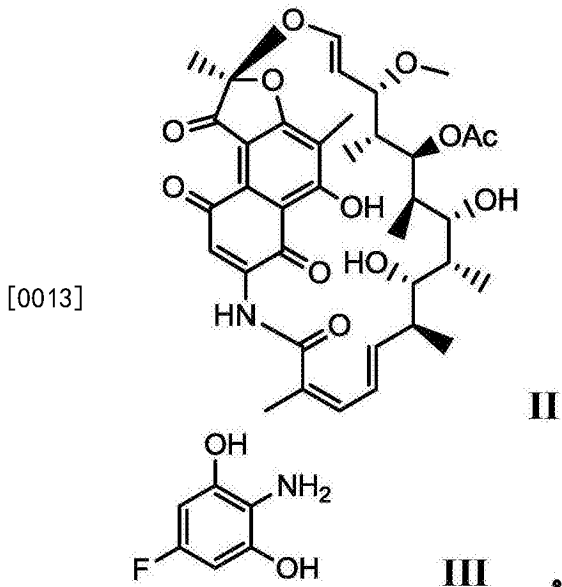
[0009]



[0010] 本发明的一个方面是制备F-苯并噁嗪并利福霉素I的方法，



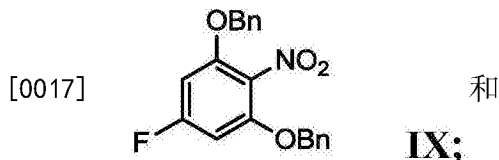
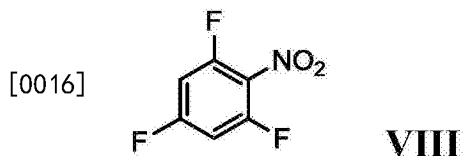
[0012] 包括将利福霉素S II、2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III和选自TEMPO、苯醌和铜盐的氧化剂反应，以形成I



[0014] 本发明的另一方面是制备2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III的方法，包括：

[0015] (a) 将1,3,5-三氟-2-硝基苯VIII和苯甲醇以及选自二(三甲基甲硅烷基氨基)锂、二异丙基氨基锂和醇盐试剂的碱性试剂反应，以形成((5-氟-2-硝基-1,3-亚苯基)二(氧

基))二(亚甲基))二苯IX



[0018] (b) 将IX与氢气和异相金属催化剂反应,以形成III。

[0019] 附图简述

[0020] 图1显示通过使用流动反应器和批式反应器的半连续环路方法,将利福霉素S II用2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III氧化环化得到F-苯并噁嗪并利福霉素I(方案1)的一般方法的示意图。

[0021] 定义

[0022] 术语“手性”是指具有镜像伴侣不可重叠性的分子,而术语“非手性”是指可与其镜像伴侣重叠的分子。

[0023] 术语“立体异构体”是指具有相同化学构成但在空间中原子或基团的排列方面不同的化合物。

[0024] “非对映异构体”是指具有两个或更多个手性中心并且其分子不是彼此的镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理性质,例如熔点、沸点、光谱性质和反应性。非对映异构体的混合物可以在高分辨率分析方法如电泳和色谱法下分离。

[0025] “对映异构体”是指化合物的两种立体异构体,它们是彼此不可重叠的镜像。

[0026] 本文使用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker编辑,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;以及Eliel,E.和Wilen,S.,“Stereochemistry of Organic Compounds”,John Wiley&Sons, Inc.,New York,1994。本发明的化合物可含有不对称或手性中心(立体中心),因此以不同的立体异构形式存在。意欲包括本发明化合物的所有立体异构形式,包括但不限于非对映异构体、对映异构体和阻转异构体,以及它们的混合物,例如外消旋混合物,它们都构成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在,即它们具有旋转平面偏振光平面的能力。在描述光学活性化合物时,前缀D和L或R和S用于表示分子关于其手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示化合物旋转平面偏振光的符号,(-)或l表示该化合物是左旋的。以(+)或d为前缀的化合物是右旋的。对于给定的化学结构,这些立体异构体是相同的,除了它们是彼此的镜像。特定的立体异构体也可称为对映异构体,这些异构体的混合物通常称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物被称为外消旋混合物或外消旋体,其可以在化学反应或过程中在没有立体选择或立体特异性的情况下出现。术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种对映异构体物质的等摩尔混合物,没有光学活性。

[0027] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指不同能量的结构异构体,其可通过低能垒相互转化。例如,质子互变异构体(也称为质子移变互变异构体)包括通过质子迁移的互变,例如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价电子互变异构体包括通过重组一些键合电子的相

互转换。

[0028] 本文所用的短语“可药用盐”是指本发明化合物的可药用有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐“甲磺酸盐”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。可药用盐可以涉及包含另一种分子,例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。所述抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,可药用盐在其结构中可具有多于一个带电原子。多个带电原子是可药用盐的一部分的实例可具有多个抗衡离子。因此,可药用盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0029] 如果本发明的化合物是碱,则可以通过本领域可用的任何合适的方法制备所需的可药用盐,例如,用无机酸处理游离碱,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等,或用有机酸,如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖苷酸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸、 α -羟基酸如柠檬酸或酒石酸、氨基酸如天冬氨酸或谷氨酸、芳香酸如苯甲酸或肉桂酸、磺酸如对甲苯磺酸或乙磺酸等。

[0030] 如果本发明的化合物是酸,则可通过任何合适的方法制备所需的可药用盐,例如用无机或有机碱如(伯、仲或叔)胺、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等处理游离酸。合适的盐的说明性实例包括但不限于衍生自氨基酸如甘氨酸和精氨酸、氨、伯、仲和叔胺和环胺如哌啶、吗啉和哌嗪的有机盐,以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

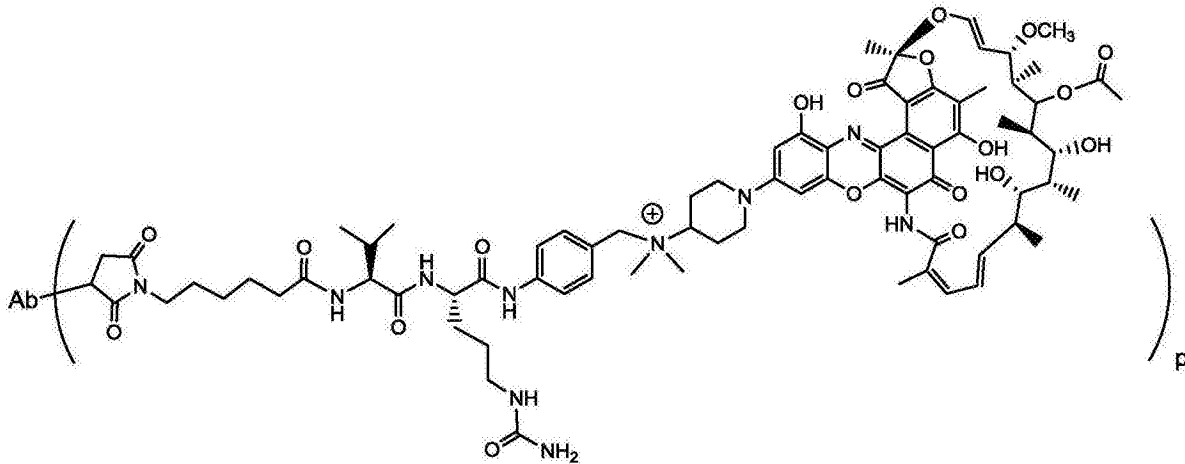
[0031] “溶剂化物”是指一种或多种溶剂分子与本发明化合物的缔合或复合物。形成溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。术语“水合物”是指溶剂分子为水的复合物。

[0032] 本文所用的短语“可药用盐”是指本发明化合物的可药用的有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐“甲磺酸盐”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。可药用盐可以涉及包含另一种分子,例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,可药用盐在其结构中可具有多于一个带电原子。多个带电原子是可药用盐的一部分的实例可具有多个抗衡离子。因此,可药用盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0033] 抗体-利福霉素缀合物的制备方法

[0034] 本发明包括用于合成如下所示的抗体-利福霉素缀合物化合物的过程、方法、试剂和中间体:

[0035]

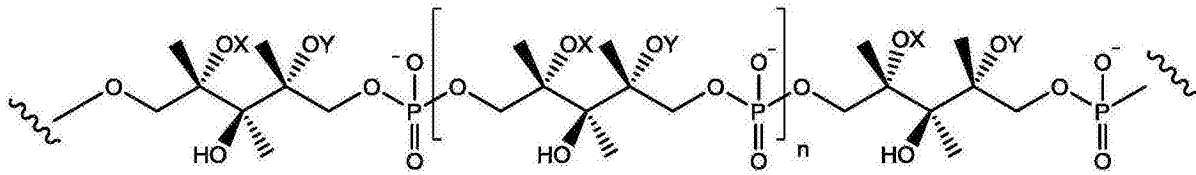


[0036] 其中Ab是抗-WTA(壁磷壁酸)抗体且p是从1至约4的整数(Lehar, S.等人(2015)“Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*”527 (7578) 323-328; W02014/194247; W02014/193722, 每篇内容均以引用方式并入本文)。该抗体通过包含二肽(缬氨酸-瓜氨酸)和对氨基苄基间隔物的连接体与利福霉素抗生素部分共价连接,所述间隔物在生理条件下被裂解(Carl, P. L.等人(1981) *J. Med. Chem.* 24 (5): 479-480; Dubowchik, G. M.等人(1998) *Chem. Lett.* 8: 3341-3346; Dubowchik, G. M.等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 855-869)。利福霉素部分的叔胺末端在抗体-利福霉素缀合物化合物中形成季铵盐,以在裂解时释放活性抗生素。季铵基团还可用于调节裂解、优化溶解度和最小化所述缀合化合物的聚集。

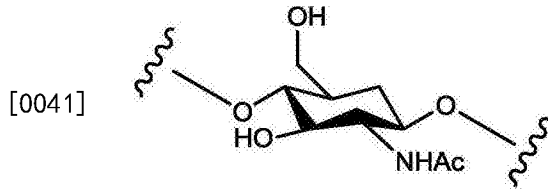
[0037] 革兰氏阳性细菌的厚肽聚糖层与称为壁-磷壁酸(WTA)的病原体特异性聚阴离子糖聚合物相连。具体地,金黄色葡萄球菌产生由磷酸-核糖醇重复单元组成的WTA,其通过由TarM或TarS糖基转移酶分别介导的 α -或 β -O-连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)糖修饰进一步修饰(Winstel, V.,等人(2014) *Int J Med Microbiol* 304, 215-221)。磷壁酸(TA)是在包括金黄色葡萄球菌在内的革兰氏阳性细菌的细胞壁内发现的细菌多糖。壁磷壁酸(WTA)是与细胞壁的肽聚糖(PDG)层共价连接的那些;而脂磷壁酸(LTA)是与细胞质膜的脂质共价连接的那些(Xia等人(2010) *Intl. J. Med. Microbiol.* 300: 148-54)。这些糖聚合物在不利条件下和其它基本细胞过程中在细菌存活中起关键作用。已知的WTA结构在细菌种类之间变化很大。金黄色葡萄球菌TA由重复的多元醇磷酸酯亚单位组成,例如核糖醇磷酸酯或甘油磷酸酯。

[0038] 术语“壁磷壁酸”(WTA)是指通过磷酸二酯键与N-乙酰胞壁酸糖的C6羟基共价连接到肽聚糖上的阴离子糖聚合物。虽然精确的化学结构可以在生物体之间变化,但在一个实施方案中,WTA是核糖醇磷壁酸,其具有在2位上的D-核糖醇和D-丙氨酸酯的1,5-磷酸二酯键和在4位上的糖基取代基的重复单元。所述糖基可以是金黄色葡萄球菌中存在的N-乙酰葡萄糖胺基 α 或 β 。醛糖醇/糖醇磷酸酯重复单元上的羟基被阳离子D-丙氨酸酯和单糖(例如N-乙酰葡萄糖胺)取代。在一个方面,所述羟基取代基包括D-丙氨酸酯和 α 或 β -GlcNAc。在一个具体方面,WTA包含下式的化合物:

[0039]



[0040] 其中波浪线表示重复的连接单元或聚醛糖醇-P或肽聚糖的连接位点,其中X是D-丙氨酸或-H;Y是 α -GlcNHAc或 β -GlcNHAc。



GlcNHAc

[0042] 在金黄色葡萄球菌中,WTA通过由N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)-1-P和N-乙酰甘露糖胺(ManNAc)组成的二糖与N-乙酰胞壁酸(MurNAc)的6-OH共价连接,其后是两到三个甘油磷酸酯单位。然后,实际上的WTA聚合物由11-40个核糖醇-磷酸(Rbo-P)重复单元组成。WTA的分步合成首先由称为Tag0的酶和缺乏Tag0基因的金黄色葡萄球菌菌株启动,所述缺乏Tag0基因的菌株(通过人工删除基因)不产生任何WTA。所述重复单元可以用D-丙氨酸(D-Ala)在C2-OH上和/或用N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)在C4-OH位置上通过 α -(α)或 β -(β)糖苷键进一步定制。根据金黄色葡萄球菌的菌株或该细菌的生长期,糖苷键可以是 α -、 β -或两种异头物的混合物。

[0043] 使用单克隆抗体发现技术,来自金黄色葡萄球菌感染后的患者的外周B细胞中克隆针对抗 β -GlcNAc WTA mAb和抗 α -GlcNAc WTA mAb的人IgG抗体,所述单克隆抗体发现技术保留了抗体重链和轻链的同源配对(Meijer,P.J.等人(2006) *Journal of molecular biology* 358:764-772)。通过转染哺乳动物细胞表达单个抗体克隆(Meijer,P.J.,等人(2009) *Methods Mol Biol* 525:261-277,xiv)。7天后收获含有全长IgG1抗体的上清液,用于通过ELISA筛选抗原结合。这些抗体对于结合来自USA300的细胞壁制剂是阳性的。随后在200-ml瞬时转染中产生抗体,并用蛋白A色谱纯化(MabSelect SuRe™,GE Life Sciences,Piscataway,NJ)纯化。

[0044] 发现与人IgG1的最高水平的抗体结合,其识别WTA上的 β -O-连接的GlcNAc糖修饰(Lehar,S.等人(2015) 527 (7578) 323-328)。用识别 α -O-连接的GlcNAc的单克隆抗体实现较少的结合;抗巨细胞病毒(CMV)gD蛋白的同种型对照抗体由于在体内衍生的金黄色葡萄球菌上表达的蛋白A而显示出一些最小反应性。通过遗传手段确定抗体的抗原特异性,从而使针对WTA上的 α -或 β -GlcNAc糖修饰的抗体不能与缺乏其各自的糖基转移酶的金黄色葡萄球菌菌株结合。

[0045] 可以通过US 8283294;Meijer PJ等人(2006) *J Mol Biol.*358(3):764-72;Lantto J等人(2011) *J Virol.*85(4):1820-33中教导的方法选择和制备抗WTA抗体。

[0046] 可以在抗体中的反应位点处工程化半胱氨酸氨基酸,并且不形成链内或分子间二硫键(Junutula,等人,2008b *Nature Biotech.*,26(8):925-932;Dornan等人(2009) *Blood* 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;W02009/052249,Shen等人(2012) *Nature Biotech.*,30(2):184-191;Junutula等人(2008) *Jour of Immun.Methods* 332:41-52)。经

工程化的半胱氨酸硫醇可与本发明的连接体试剂或连接体-抗生素中间体反应,所述连接体试剂具有硫醇反应性亲电子基团如马来酰亚胺或 α -卤代酰胺以与半胱氨酸工程化的抗体(thioMabs)和抗生素部分形成AAC。因此可以设计、控制和知晓抗生素部分的位置。可以控制抗生素负载,因为工程化的半胱氨酸硫醇基团通常以高产率与硫醇反应性连接体试剂或连接体-抗生素中间体反应。将抗WTA抗体进行改造以通过在重链或轻链上的单个位点处取代而引入半胱氨酸氨基酸,由此在对称的四聚体抗体上产生两个新的半胱氨酸。可以实现接近于2的抗生素负载和缀合产物AAC的近似均匀性。

[0047] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化的抗WTA抗体,例如“thioMabs”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定的实施方案中,取代的残基出现在抗体的可进入位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位在抗体的可进入位点,并且可以用于将抗体与其它部分(例如抗生素部分或连接体-抗生素部分)缀合,以产生免疫缀合物,如本文进一步所描述。在某些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可以被半胱氨酸取代,包括轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。非限制性示例性半胱氨酸工程化的抗体是抗WTA抗体的重链A118C和轻链V205C突变体。按照Junutula,等人,2008b Nature Biotech.,26(8):925-932;US 7521541;US-2011/0301334所述可产生半胱氨酸工程化的抗WTA抗体。

[0048] 本发明的抗体-抗生素缀合物(AAC)的利福霉素型抗生素部分具有细胞毒性或细胞抑制作用。利福霉素是一组抗生素,其由细菌地中海诺卡菌(*Nocardia mediterranei*)、地中海拟无枝菌酸菌(*Amiclatopsis mediterranei*)天然获得或人工获得。它们是较大的安莎霉素家族的亚类,所述安莎霉素家族抑制细菌RNA聚合酶(Fujii等人(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:1489-1492;Feklistov,等人(2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105(39):14820-5)且具有对抗革兰氏阳性和选择性的革兰氏阴性细菌的效力。利福霉素对分枝杆菌特别有效,因此用于治疗结核病、麻风病和鸟分枝杆菌复合体(MAC)感染。利福霉素类组包括“经典的”利福霉素药物以及利福霉素衍生物利福平(rifampin,CA登记号13292-46-1)、利福布丁(CA登记号72559-06-9;US 2011/0178001)、利福喷汀和利福拉齐(Rothstein等人(2003) Expert Opin. Investig. Drugs 12(2):255-271;Fujii等人(1994) Antimicrob. Agents Chemother. 38:1118-1122;Yamane, T.;等人(1992) Chem. Pharm. Bull., 40:2707; (b) Yamane, T.;等人(1993) Chem. Pharm. Bull., 41:148-155)。许多利福霉素类抗生素具有发生耐药性的有害特性(Wichelhaus等人(2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153-156)。利福霉素首先于1957年从地中海链霉菌(*Streptomyces mediterranei*)的发酵培养物中分离。发现了约7种利福霉素,命名为利福霉素A、B、C、D、E、S和SV(US 3150046)。利福霉素B是首次在商业上引入的,在1960年代用于治疗耐药性结核病。由于大量可用的类似物和衍生物,利福霉素已被广泛用于清除对常用抗生素产生抗性的致病细菌。

[0049] 苯并噁嗪并利福霉素是利福霉素的衍生物。利福拉齐(KRM-1648,CA登记号129791-92-0)是一类安莎霉素中的苯并噁嗪并利福霉素的一个例子,是开发用于治疗结核病和其它细胞内病原体的利福霉素类抗生素(Rothstein, D.M.等人(2003) Expert Opinion Investig. Drugs 12(2):255-271;Rothstein, D.M.等人(2006) Expert Opinion Investig. Drugs 15(6):603-623;US 4983602;US 7342011;US 7678791)。衍生物苯并噁嗪

并利福霉素以其抗菌性质而闻名(US 4690919;EP 0190709;US 4983602),并且可以通过氨基间苯二酚化合物与利福霉素S的氧化环合来制备(Yamane, T.; 等人(1992) Chem.Pharm.Bull., 40:2707; (b) Yamane, T.; 等人(1993) Chem.Pharm.Bull., 41:148-155)。

[0050] 选择苯并噁嗪并利福霉素类似物IV是由于其高效力,在低吞噬溶酶体pH下具有未改变的杀菌活性,能够抵抗细胞内损伤的能力,并且易于与抗体缀合。

[0051] 本发明化合物可以非溶剂化形式以及与可药用溶剂如水、乙醇等的溶剂化形式存在,并且本发明意图包括溶剂化和非溶剂化形式。

[0052] 本发明化合物也可以以不同的互变异构形式存在,所有这些形式都包括在本发明的范围内。术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指不同能量的结构异构体,其可通过低能垒相互转化。例如,质子互变异构体(也称为质子移变互变异构体)包括通过质子迁移的互变,例如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价电子互变异构体包括通过一些键合电子重组的相互转换。

[0053] 本发明的化合物还包括同位素标记的化合物,其与本文所述的那些相同,但是一个或多个原子被原子质量或质量数不同于自然界通常发现的原子质量或质量数的原子取代。所指出的任何特定原子或元素的所有同位素都涵盖在本发明化合物及其用途的范围内。可掺入本发明化合物中的示例性同位素包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、氯和碘的同位素,例如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 和 ^{125}I 。某些同位素标记的本发明化合物(例如,用 ^3H 和 ^{14}C 标记的化合物)可用于化合物和/或底物组织分布测定。氚(^3H)和碳-14(^{14}C)同位素因其易于制备和可检测性而有用。此外,用较重的同位素例如氘(即 ^2H)取代可以提供某些治疗优势,这是由于更高的代谢稳定性(例如体内半衰期延长或剂量需求减少),因此在某些情况下可能是优选的。正电子发射同位素如 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 和 ^{18}F 可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以检查底物受体占据。同位素标记的本发明化合物通常可以通过以下类似于下文实施例中公开的方法,通过用同位素标记的试剂取代非同位素标记的试剂来制备。

[0054] 用于制备抗体-利福霉素缀合物的中间体的起始材料和试剂通常可从商业来源获得或者可使用本领域技术人员熟知的方法容易地制备。(例如一般按照Louis F.Fieser和Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v.1-27, Wiley, N.Y. (1967-2013版)或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl.ed. Springer-Verlag, Berlin, 包括增刊(也可通过Beilstein在线数据库获得)中所述方法制备)。

[0055] 以下方案1-3说明了化学反应、方法、合成式I的方法以及某些中间体和试剂,它们形成了本发明的实施方案。

[0056] 流程1:

酚III保持分离以避免III的非生产性氧化。虽然作为HCl盐是稳定的,但2-氨基苯-1,3-二醇作为游离碱对氧不稳定,特别是在溶液中(Yamane, T.; 等人(1992) Chem. Pharm. Bull., 40: 2707; (b) Yamane, T.; 等人(1993) Chem. Pharm. Bull., 41: 148-155)。2-氨基苯-1,3-二醇的5-位的氟化作为III赋予更高的稳定性。该环路系统确保在氧化期间产生的利福霉素S II再循环以进一步与另外的间苯二酚III反应。利福霉素S II和间苯二酚III在批式反应器中在20-60℃下在溶剂如乙酸异丙酯中预混合(以提供假定的亚胺中间体),其部分形成F-苯并噁嗪并利福霉素I和利福霉素SV(图1)。利福霉素SV是II的还原形式。然后将混合物在0-60℃下进行氧化环路,其再次形成II(来自利福霉素SV)。然后用另外的III处理部分转化的混合物,其消耗更多重新形成的利福霉素S II,得到I和利福霉素SV。将该混合物进行氧化循环并加入间苯二酚直至认为反应完成。间苯二酚III可以逐步或连续方式加入。在反应结束时,将该混合物用抗坏血酸的水溶液萃取,然后用水萃取。将有机相蒸发至干,将残余物溶于DCM/MeOH中,并在硅胶上进行色谱分离。然后将产物从MeOH/水中重结晶。

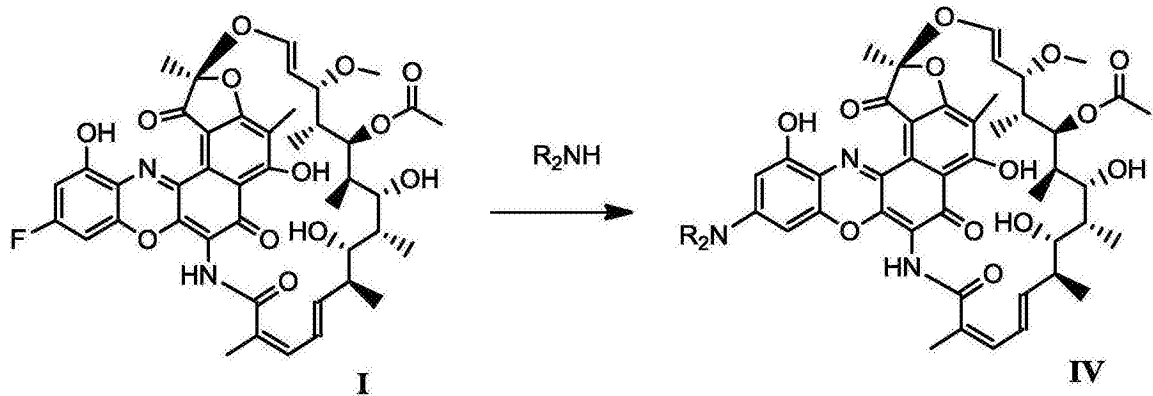
[0060] 两个反应区段的分离允许(a)在连续搅拌釜中有效地将II和III转化为中间体,然后进行氧化还原步骤,包括形成I和利福霉素SV,和b)在塞流柱中将利福霉素SV氧化成II以避免III的氧化消耗。反应进行多个循环以完成将II转化为I。

[0061] 在一个实施方案中,将双夹套玻璃反应器通过T形接头连接到具有静态混合元件的流动反应器(实施例3.4)上。将T形接头的第三端口连接到定量施加氧化剂溶液的泵上。流动反应器的出口与双夹套玻璃反应器连接。将试剂II和III在玻璃反应器中与iPrOAc在约20-60℃下混合过夜。将溶液与氧化剂溶液一起泵送到流动反应器中。流动反应器保持约-5至5℃的出口温度。将出口溶液泵回到双夹套玻璃反应器中(环路方法)。环路运行约8小时。然后将间苯二酚加入玻璃反应器中并反应过夜(循环1)。环路方法重新启动。总共执行三个循环。

[0062] 在另一个实施方案中,夹套玻璃容器通过T形接头连接到流动反应器上,且氧化剂在分批连续环路工艺反应中进料(实施例3.3)。流动反应器通过冷却盘管连接到气/液分离烧瓶。将分离瓶连接到所述带夹套的玻璃容器。将过滤器置于分离瓶和夹套容器之间。借助于蠕动泵将氧化环路的液体部分泵回冷却容器中。在该泵之后直接放置取样阀。将间苯二酚溶液加入所述夹套玻璃反应器中。氧气流量由气体质量流量控制器控制。在夹套玻璃反应器中,将利福霉素S II和TEMPO溶解在乙酸异丙酯(iPrOAc)中,并将容器温度设定在约50℃。将间苯二酚III在乙酸异丙酯中的溶液历经60分钟加入容器中并同时混合。然后将混合物与氧气一起在60℃下泵送通过流动反应器,并开始环路方法,同时保持间苯二酚进料恒定。循环运行约6-8小时。

[0063] 流程2:

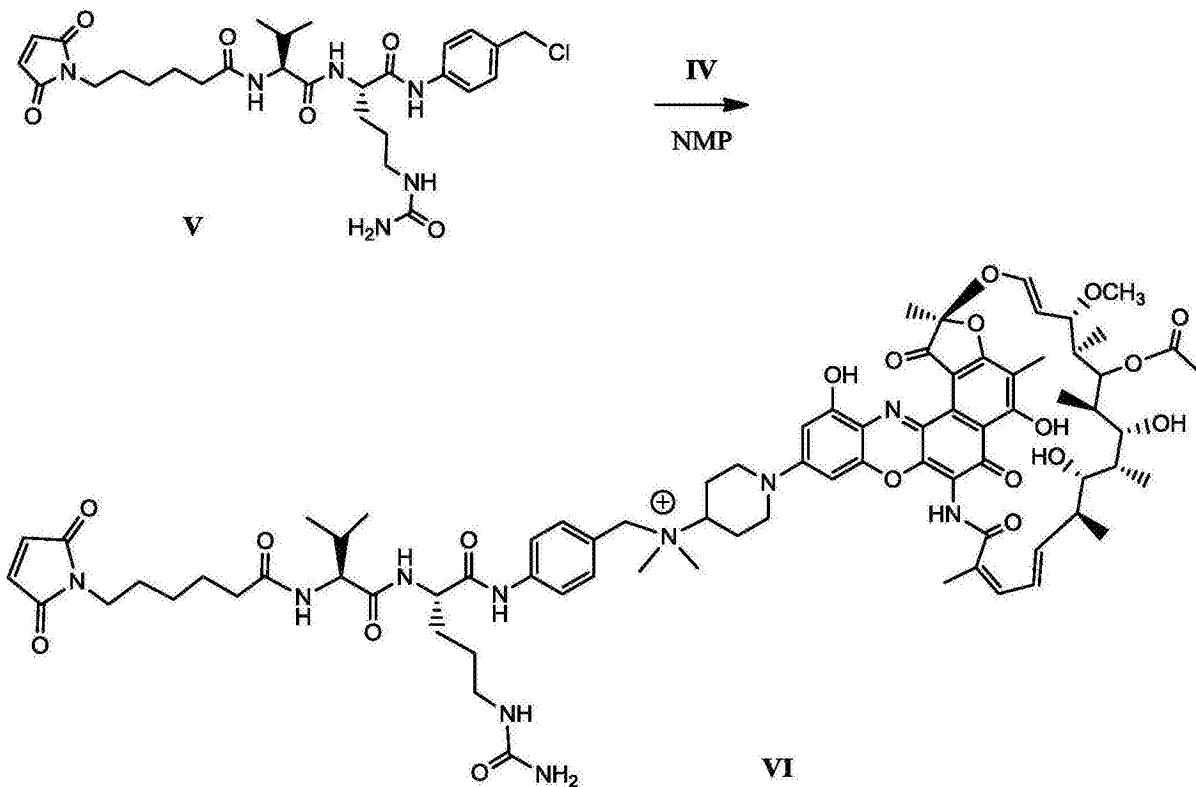
[0064]



[0065] 流程2显示了F-苯并噁嗪并利福霉素I的氟取代基与仲胺 R_2NH 的亲核取代,其中R独立地选自各种烷基和环状取代基,得到氨基-苯并噁嗪并利福霉素类似物IV。仲胺 R_2NH 包括但不限于二甲胺、二乙胺、二正丙胺、1-甲基哌嗪、N1-异丁基哌嗪和N,N-二甲基哌啶-4-胺。苯并噁嗪并利福霉素类似物IV在5'位置(按照US 7547692第13栏的惯例)用叔胺取代利福拉齐的N-异丁基哌嗪基团,所述叔胺包括N,N-二甲基哌啶-4-胺(US 7265107;US 7271165;US 7884099)。

[0066] 流程3:

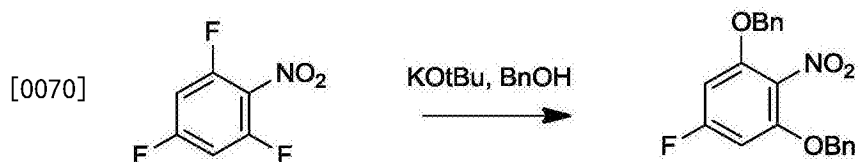
[0067]



[0068] 流程3显示了连接体氯化物V与叔胺利福拉齐类似物IV的烷基化,得到连接体-抗生素VI。

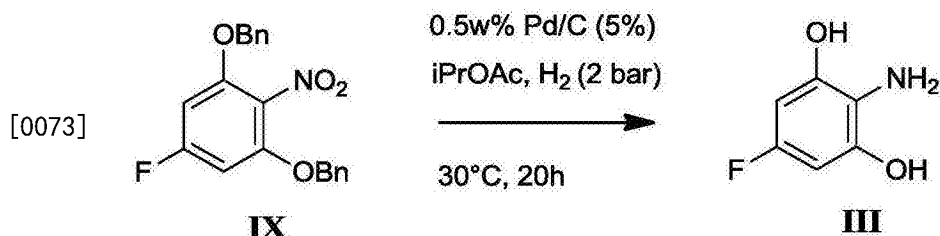
实施例

[0069] 实施例1(((5-氟-2-硝基-1,3-亚苯基)二(氧基))二(亚甲基))二苯



[0071] 向叔丁醇钾(66.5g, 593mmol)在THF(300ml)的混悬液中历经20分钟逐滴加入苯甲醇(苯甲醇, 66.3g, 613mmol)在THF(60ml)中的溶液, 得到黄色溶液。可以使用其它醇盐试剂, 例如叔丁醇钠、异丙醇钾、异丙醇钠、乙醇钾、乙醇钠、甲醇钾和甲醇钠。或者, 可以使用其它醚溶剂, 例如2-甲基四氢呋喃或二异丙基醚。或者, 可以在1-4℃的内部温度下历经2小时将苯甲醇加入到六甲基二硅烷基氨基锂(LiHMDS)在THF中的1M溶液中。在内温0-10℃下通过特氟隆套管在1小时时间内将该黄色溶液逐滴加至1,3,5-三氟-2-硝基苯, CAS登记号315-14-0(50.0g, 282mmol)在2-Me-THF(400ml)中的澄清溶液中, 并将得到的橙红色溶液在0-5℃下搅拌1小时。或者, 可以将1,3,5-三氟-2-硝基苯溶解在THF中。然后加入水(500ml)和NaCl溶液(30ml, 饱和的), 分离各相。将水相用2-Me-THF(250ml)萃取, 而有机相用盐水(600ml)洗涤。或者, 水相可以用二氯甲烷萃取。合并有机相, 用Na₂SO₄干燥, 真空浓缩黄色澄清溶液直至产物结晶开始。然后, 加入2-Me-THF(150ml)和EtOH(500ml), 将悬浮液在冰浴中搅拌3小时。滤出晶体, 用冰冷的正庚烷(200ml)洗涤并在真空下干燥直至重量恒定, 得到(((5-氟-2-硝基-1,3-亚苯基)二(氧基))二(亚甲基))-二苯, CAS登记号1639352-18-3(91.6g, 89.9%基于1,3,5-三氟-2-硝基苯), 为浅黄色固体。m.p.: 117.8-119.4℃。¹H-NMR(CDCl₃): 8.74-7.27(, 10H), 6.37(d, J=10.2Hz, 2H), 5.18-5.06(m, 4H)。MS(ESI): 352.1[M-H]⁻。分析计算值: C₂₀H₁₆FNO₄: C 67.98, H 4.56, N 3.96; 实测值C 67.89, H 4.50, N 3.94。

[0072] 实施例2 2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III

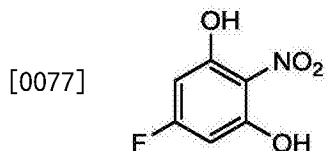


[0074] 将50L高压釜先后装载(((5-氟-2-硝基-1,3-亚苯基)二(氧基))二(亚甲基))-二苯IX, CAS登记号1639352-18-3(3.0kg, 8.49mol)、Pd/C E101N/D, 5%Pd催化剂(15g)和iPrOAc(829g), 用氩气吹扫高压釜, 接着用氢气(H₂)吹扫。Pd/C催化剂可以是基质活性炭, 湿支持物, Degussa型号E101NE/W、E101N/D、E105R/W(Evonik Industries, Johnson Matthey)、型号128M(Evonik Industries)、5207Escat 162(BASF)、**Noblyst**®P1070或**Noblyst**®P1090(Evonik Industries)。其他异相的金属催化剂可以用于还原苯基和硝基基团, 例如在碳或氧化铝支持物上的钨、铂、钨。接着将氢气压调节至2巴, 并在搅拌下将反应混合物加热至28-32℃, 在该温度下氢化21小时。将反应混合物冷却到环境温度并小心地释放压力。该反应可以以两个或更多个阶段进行, 分离部分还原的硝基和苯基中间体如5-氟-2-硝基苯-1,3-二醇, 并进一步用氢气和异相金属催化剂处理以得到III。

[0075] 将反应混合物在氩气下过滤, 用iPrOAc洗涤高压釜和滤器, 将粗的氢化溶液与两个类似的氢化操作的产物溶液合并。接着在真空下部分除去溶剂, 由此使产物开始沉淀。随

后加入正庚烷(40l),将混悬液冷却至0-5℃,在此温度下搅拌18小时。将混悬液转移至预冷却的(0-5℃)过滤干燥器,晶体用正庚烷(15l,冷的)洗涤,干燥得到2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III,CAS登记号16393406-55-5(3.0kg,基于原料计算的产率81.9%),浅褐色固体。¹H-NMR(d₆-DMSO):δ10.18-7.54(m,1H),6.05(d,J=7.0Hz,2H),3.96(br d,J=10.4Hz,1H)。¹³C-NMR(d₆-DMSO):δ154.6(d,J=230.3Hz,1C),145.4,145.3,120.3,99.6,99.1。MS(EI⁺):m/z 143.0(M⁺,100%)。分析计算值C₆H₆FN₂O₂:C 50.35,H 4.23,N 9.79;实测值C 50.36,H 4.33,N 9.72。

[0076] 或者,IX的还原可以终止,以分离脱苯基化的硝基二醇中间体5-氟-2-硝基苯-1,3-二醇:



[0078] 其为橙色固体,以近乎定量的产率和>95%的GC分析纯度。¹H-NMR(d₆-DMSO) δ 11.20(s,2H),6.24(d,2H)。分析计算值C₆H₄FN₂O₄:C 46.63,H 2.33,N 8.09;实测值C 41.58,H 2.52,N 8.04。将5-氟-2-硝基苯-1,3-二醇使用范围广泛的碳分散的钨、铂、铂-钨和镍异相金属催化剂(包括Pt/C、Pt.V/C、Ra-Ni(拉尼镍)和Ra-Co)通过多相氢化还原为III。

[0079] 实施例3 F-苯并噁嗪并利福霉素I

[0080] 3.1使用苯醌的整批法

[0081] 在500ml玻璃反应器中,将利福霉素S II(可商购自ChemShuttle公司,Fremont,CA,US 7342011;US 7271165;US 7547692)(13.92g,20mmol)、2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III(4.9g,34mol,1.6当量)和苯醌(2.38g,24mmol,1.2当量)溶于iPrOAc(185ml)。将溶液在25℃搅拌40小时。将溶液用磨光过滤,接着将滤液蒸发至干,得到25.3g粗的F-苯并噁嗪并利福霉素I(29.2%产率,18.93%含量测定)。MS(EI⁺):m/z 817.6(M⁺,15%)。HPLC(方法A):5.32min。

[0082] HPLC方法A:

[0083] 样品制备:在100ml乙腈中的50mg物质

[0084] 系统:安捷伦1200,二元

[0085] 洗脱剂A:ACN/H₂O 9:1+0.25%TFA

[0086] 洗脱剂B:ACN/H₂O 1:9+0.25%TFA

[0087] 柱:x-Bridge C18 4.6x50mm,2.5μm

[0088] 流速:1.5ml/min

[0089] 进样:10μl

[0090] λ:220nm

[0091] 柱温:40℃

[0092] 梯度:

[0093]

时间[min]	A[%]	B[%]
0.00	17.5	82.5
6.00	95	5

7.00	95	5
------	----	---

[0094] 后运行时间:3min

[0095] 3.2使用苯醌的分批法

[0096] 在500ml玻璃反应器中,将利福霉素S II (20.0g, 29mmol)、2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III (4.9g, 35mmol, 1.2当量)溶于iPrOAc (300mL)中。将溶液在25℃搅拌过夜。然后将溶液冷却至-5.0℃,历经8小时加入苯醌(1.86g, 17mmol, 0.6当量,在45mL溶剂中)的iPrOAc溶液。随后在25℃加入另外的间苯二酚(2.5g, 17mmol, 1.2当量),将混合物反应过夜。在此之后,历经4小时加入苯醌(0.93g, 9mmol, 0.3当量,在22.5mL中)的iPrOAc溶液。根据下述,将依次加入间苯二酚和苯醌的操作重复总共三个循环:

[0097]

循环号	III的量	苯醌的量	配量时间
1	2.5g	1.86g	8h
2	1.2g	0.93g	4h
3	0.6g	0.93g	4h

[0098] 一旦完成所述循环,将反应混合物用抗坏血酸水溶液(100ml, 10%w/w)萃取,随后用水(100ml)萃取三次。有机相蒸发至干,得到33.7g粗的F-苯并噁嗪并利福霉素I (73.1%产率, 51.0%含量测定),为黑色泡沫状。MS(EI⁺):m/z 817.6 (M⁺, 89%)。HPLC(方法A): 5.34min。

[0099] 3.3使用氧气和TEMPO的分批法

[0100] 在1.5L玻璃反应器中,将利福霉素S II (40.0g, 58mmol)、2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇III (20.6g, 144mmol, 2.5当量)溶于iPrOAc (600mL)。将混合物在氩气下在60℃搅拌两小时。随后,加入2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基自由基TEMPO (Kaizer等人(2002) Jour.Mol.Cat.180:91-96) (0.90g, 5.8mmol, 0.1当量),并将氩气用氧气O₂(5v/v%在N₂中)流(400mL/min)替换。将反应混合物在60℃搅拌22小时。使混合物冷却到室温,因此在过滤纸上过滤。将滤纸用乙酸乙酯(300mL)洗涤。收集滤液,用Na₂S₂O₃(10%w/w, 100mL)水溶液和盐水(100mL)萃取。收集有机相,蒸发至干。将残余物溶于含有2%v/v MeOH的DCM(150mL),通过硅胶色谱纯化(250g,洗脱剂:DCM,含有2%v/v MeOH)。含有产物的流分被蒸发至干,得到22.3g的F-苯并噁嗪并利福霉素I (45%产率, 95%含量测定),为暗红色固体。¹H NMR (600MHz, CHCl₃):δ14.42-14.33 (m, 1H), 10.29-10.00 (m, 1H), 6.77-6.62 (m, 1H), 6.58-6.48 (m, 1H), 6.39-6.35 (m, 1H), 6.10-4.60 (m, 4H), 4.04-3.90 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.11 (s, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.23 (s, 2H), 2.16-2.11 (m, 6H), 2.05 (d, J=18Hz, 2H), 1.78 (d, J=12Hz, 2H), 1.58-1.54 (m, 6H), 1.37-0.51 (m, 13H)。HRMS:m/z 818.3061 (计算质量:818.3062)。HPLC(方法B):5.86min。

[0101] HPLC方法B:

[0102] 样品制备:在1ml乙腈中的2mg物质

[0103] 系统:安捷伦1200,二元

[0104] 洗脱剂A:H₂O

[0105] 洗脱剂B:ACN

[0106] 洗脱剂C:0.1%TFA在H₂O中

- [0107] 柱:x-Bridge C18 4.6x 50mm,2.5 μ m
 [0108] 流速:1.5ml/min
 [0109] 进样:2 μ l
 [0110] λ :220nm
 [0111] 柱温:40 $^{\circ}$ C
 [0112] 梯度:
 [0113]

时间 [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0.00	75	20	5
6.00	10	85	5
9.00	10	85	5

[0114] 3.4使用苯醌的环路法

[0115] 将双套层玻璃反应器通过T接头与带有固定搅拌装置的流动反应器相连。T接头的第三个端口与提供氧化剂溶液的泵相连。将流动反应器的出口与所述双套层玻璃反应器相连。在18L的玻璃反应器中,将利福霉素S II (200.4g,288mmol) 和2-氨基-5-氟苯-1,3-二醇 III (49.5g,347mmol,1.2当量) 溶于iPrOAc (3.0L) 中。将溶液在25 $^{\circ}$ C搅拌过夜。或者,将II和III在玻璃反应器中在20-60 $^{\circ}$ C下与iPrOAc混合过夜。接着,将所述溶液泵到(5.2L/h) 流动反应器中,与在-5.0到5.0 $^{\circ}$ C下通过结构上为混合器的流动反应器 (V=130ml) 递送的苯醌的iPrOAc溶液合在一起(具体细节见下表)。所得溶液随后被泵回到保持25 $^{\circ}$ C的批式反应器中。在苯醌的配量时间内(参见下表) 运行该环路方法。然后,在25 $^{\circ}$ C下加入另外的间苯二酚(24.7g,173mmol,0.6当量),将混合物反应过夜。根据下表,将苯醌和间苯二酚依次加入的操作重复总共三次。

[0116]

循环号	III的量	苯醌的量	配量时间
1	24.7g	18.7g	10h
2	12.4g	9.3g	8h
3	6.2g	9.3g	8h

[0117] 一旦完成所述循环,将反应混合物用抗坏血酸水溶液(1.0L,10%w/w) 萃取,随后用水(1.0L) 萃取三次。有机相蒸发至干。将残余物溶于含有2%v/v MeOH的DCM(2.0L),通过硅胶色谱纯化(3.0kg,洗脱剂:DCM,含有2%v/v MeOH)。含有产物的流分被蒸发至干。得到186.4g产物(81.5%产率,85.5%含量测定),为黑色泡沫。将该泡沫在40 $^{\circ}$ C溶于甲醇(8.0L),随后历经4小时加入水(4.8L)。将混悬液在40 $^{\circ}$ C保持2小时,接着在8小时内冷却到0 $^{\circ}$ C,并在该温度下保持2h。过滤混悬液,用水溶液(0.5L) 和甲醇(0.3L) 以及两次用水(0.8L) 洗涤。将黑色晶体在真空厢式干燥器中在10毫巴下干燥40小时。得到148.8g的F-苯并噁嗪并利福霉素I,为暗红色晶体(63.4%产率,97.4%含量测定)。¹H NMR (600MHz, CHCl₃): δ 14.42-14.33 (m, 1H), 10.29-10.00 (m, 1H), 6.77-6.62 (m, 1H), 6.58-6.48 (m, 1H), 6.39-6.35 (m, 1H), 6.10-4.60 (m, 4H), 4.04-3.90 (m, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.11 (s, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.29 (s, 1H), 2.23 (s, 2H), 2.16-2.11 (m, 6H), 2.05 (d, J=18Hz, 2H), 1.78 (d, J=12Hz, 2H), 1.58-1.54 (m, 6H), 1.37-0.51 (m, 13H)。HRMS:m/z 818.3069(计算质

量:818.3062)。HPLC(方法A):5.35min。

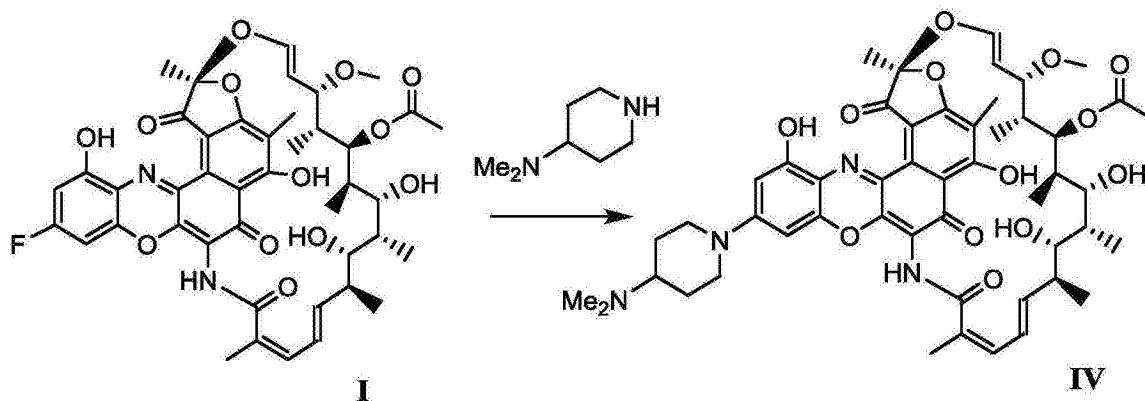
[0118] 3.5使用TEMPO的分批法

[0119] 在氮气下向反应器中装入*i*-PrOAc(355g)、利福霉素S II(40.0g,57.5mmol)和2,2,6,6-四甲基-1-哌啶氧基自由基(TEMPO)(9.0g,57.6mmol)。将反应器内容物加热到60℃持续1小时,随后历经1小时加入2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III(8.0g,55.9mmol)的*i*-PrOAc溶液(266g)。进一步加入TEMPO(9.0g,57.6mmol),并将混合物在60℃搅拌1小时。再历经1小时加入2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III(8.0g,55.9mmol)的*i*-PrOAc(266g)溶液,随后在温度下搅拌2小时。进一步加入TEMPO(1.8g,11.5mmol)的*i*-PrOAc(10g)溶液,在60℃搅拌混合物1小时。再历经1小时加入另外的2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III(1.6g,11.2mmol)的*i*-PrOAc(60g)溶液,随后搅拌2小时。最后历经1小时加入2-氨基-5-氟-苯-1,3-二醇III(1.6g,11.2mmol)的*i*-PrOAc(60g)溶液,随后在60℃混合2小时。

[0120] 在真空蒸馏下浓缩该批次至50%的体积。冷却到20-25℃后,加入庚烷(410g),将混合物通过覆盖有一层**Celite®**(40g)的硅胶层(160g)过滤。所述的层用1:1庚烷/*i*-PrOAc(943g)洗涤,合并的滤液浓缩至5%体积。一旦冷却到20-25℃,加入*i*-PrOAc(71g),随后历经1小时加入庚烷(129g)。内容物在20-25℃搅拌3小时,随后过滤浆体。将滤饼用3:1庚烷/*i*-PrOAc(39g)洗涤,然后转移到新的反应器。将所述湿物质溶于*i*-PrOAc(73g),并在20-25℃搅拌1小时,随后历经1小时加入庚烷(129g)。将内容物在20-25℃搅拌3小时,然后过滤浆体,用3:1庚烷/*i*-PrOAc(39g)洗涤滤饼。最终的湿滤饼在真空下干燥,得到F-苯并噁嗪并利福霉素I(23.5g,50.0%产率)。¹H NMR(600MHz,苯-d₆:氯仿-d₁ 3:1,60℃) δ14.59(s,1H),10.41(s,1H),7.76(s,1H),7.18(p,J=1.1Hz,1H),6.46(dd,J=10.3,2.5Hz,2H),6.29(dd,J=9.0,2.4Hz,1H),6.22-6.13(m,1H),5.94(d,J=10.7Hz,1H),5.59(s),5.16(d,J=7.0Hz,1H),5.11(dd,J=12.3,7.7Hz,1H),3.76-3.60(m,1H),3.44(d,J=9.0Hz,1H),3.13(dd,J=7.7,5.6Hz,1H),3.03-2.94(m,1H),2.89(s,4H),2.34(s,3H),2.15-2.06(m,1H),2.04(d,J=1.4Hz,3H),1.65(s,3H),1.57(dddd,J=14.1,12.0,6.9,3.2Hz,3H),0.94(d,J=7.0Hz,3H),0.65(d,J=6.8Hz,3H),0.43(s,5H),0.43-0.32(m,4H)。¹³C NMR(151MHz,C₆D₆:CDCl₃ 3:1,60℃) δ193.8,184.4,174.3,171.8,168.9,168.3,166.6,158.1,158.0,144.9,144.8,143.4,141.8,140.6,133.3,131.6,126.4,120.1,115.6,114.8,113.2,112.7,108.1,107.8,99.7,99.5,94.9,94.7,79.1,78.4,73.8,73.4,56.3,41.3,40.2,37.3,33.2,22.2,20.8,20.4,16.9,11.2,11.0,7.7。

[0121] 实施例4二甲基氨基哌啶基利福霉素IVa

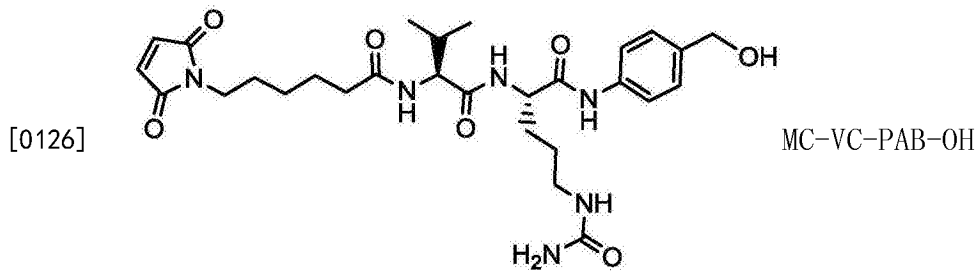
[0122]



[0123] 将无水THF (135g) 和F-利福霉素I (10.0g, 12.2mmol) 在氮气下加入反应器。将反应内容物冷却到0-5℃, 随后历经0.5小时加入N,N-二甲基哌啶-4-胺 (2.3g, 17.9mmol), 同时保持内温 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 。加完后, 将反应内容物加温到20-25℃, 并维持2小时。加入EtOAc (135g), 并将混合物搅拌0.5小时。将内容物过滤并用EtOAc (25g) 洗涤。将合并的滤液真空蒸馏到25mL体积。在冷却到20-25℃后, 加入EtOAc (185g), 随后加入7%NaHCO₃水溶液 (45g)、25%NaCl水溶液 (45g) 和纯水 (45g)。在相分离后, 除去水层, 向有机相中加入25%NaCl水溶液 (45g) 和纯水 (45g)。除去水层, 将有机层用7%NaHCO₃水溶液 (45g)、25%NaCl水溶液 (45g) 和纯水 (45g) 处理。在相分离后, 除去水层, 向有机相中加入25%NaCl水溶液 (45g) 和纯水 (45g)。过滤有机相, 将滤液浓缩至25mL体积, 随后用庚烷 (90g) 稀释。进一步浓缩到25mL体积, 然后用庚烷 (90g) 稀释, 并最终浓缩到25mL体积。过滤混悬液, 用庚烷 (2x 20g) 洗涤滤饼, 得到固体, 其真空干燥后得到二甲基氨基哌啶基利福霉素IVa (10.6g, 93.5%产率)。¹H NMR (600MHz, 甲苯-d₈) δ 16.53 (s, 1H), 11.59 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.47-6.32 (m, 1H), 6.21 (d, J=11.9Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.44 (d, J=11.4Hz, 1H), 5.30-5.18 (m, 1H), 4.87 (dd, J=14.6, 10.0Hz, 1H), 3.58 (d, J=7.7Hz, 1H), 3.26-3.11 (m, 2H), 3.03 (d, J=10.9Hz, 1H), 2.91 (d, J=12.1Hz, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.28 (s, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.04 (s, 6H), 2.00 (s, 1H), 1.97-1.89 (m, 1H), 1.79 (d, J=28.4Hz, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.64 (s, 5H), 1.17 (d, J=6.9Hz, 6H), 0.78 (d, J=6.3Hz, 3H), 0.49 (d, J=6.5Hz, 5H)。¹³C NMR (151MHz, Tol) δ 193.0, 182.6, 175.7, 175.1, 171.5, 171.2, 158.0, 157.2, 146.4, 145.2, 144.5, 142.2, 131.5, 131.0, 130.9, 128.9, 128.0, 119.6, 114.0, 112.6, 111.5, 109.4, 107.7, 106.3, 95.0, 92.9, 79.9, 79.0, 74.8, 73.8, 61.5, 55.2, 47.0, 46.4, 44.1, 42.4, 42.3, 37.3, 33.1, 29.2, 29.0, 23.6, 23.1, 21.4, 16.4, 13.2, 13.0, 11.7, 8.5。

[0124] 实施例5 N-((S)-1-(((S)-1-((4-(氯甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺V

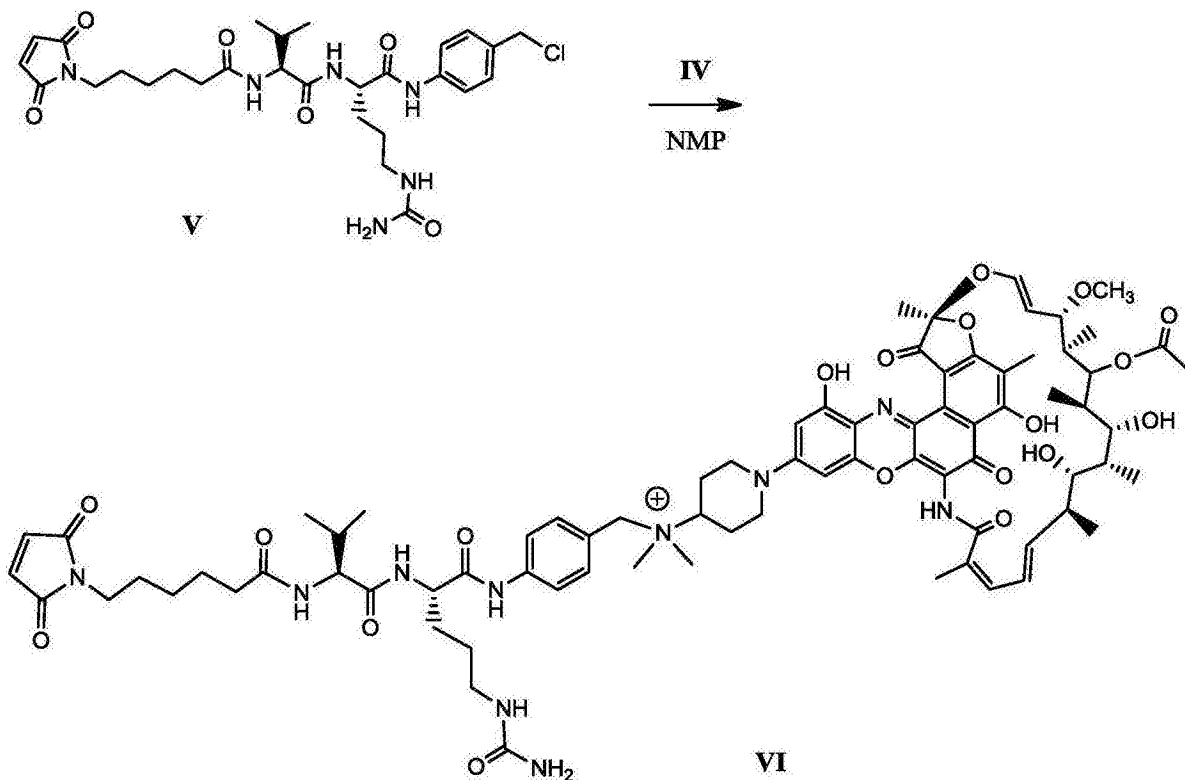
[0125] 将干燥的N-甲基吡咯烷酮、NMP (55g) 和6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺 (MC-VC-PAB-OH) (10.0g, 17.5mmol) 在氮气下装入反应器。



[0127] 将内容物加温到50-55℃,持续1小时,然后冷却到0-5℃。向反应器中历经1小时加入亚硫酸氯(2.6g,21.9mmol),同时温度 $\leq 5^\circ\text{C}$ 。在加完后,将反应器内容物加温到20-25℃,保持1小时。由于LC显示原料剩余,将该批次冷却到0-5℃,向反应器中历经1小时加入更多的亚硫酸氯(0.2g,1.7mmol)。在加完后,将反应器内容物加温到20-25℃,保持1小时。将该批次冷却到0-5℃,向反应器中加入水(170g),同时维持温度 $\leq 5^\circ\text{C}$ 。将所得浆体过滤,滤饼用水(2x 30g)洗涤。接着将滤饼用EtOAc(30g)、CH₃CN(2x 30g)和MTBE(1x 30g)洗涤。在20-25℃真空干燥湿滤饼,得到浅色固体(8.3g,80%产率)。¹H NMR(600MHz,DMSO-d₆,28℃) δ 10.02(s,1H),8.06(d,7.5,1H),7.78(d 8.7,1H),7.60(d,8.6,2H),7.36(d,8.6,2H),6.99(s,2H),5.98(bs,1H),5.40(vbs,1H),4.71(s,2H),4.38(m,1H),4.19(dd,.5,6.9,1H),3.37(t,7.1,2H),3.03(m,1H),2.94(m,1H),2.18(m,1H),2.12(m,1H),1.97(m,1H),1.70(m,1H),1.60(m,1H),1.48(m,5H),1.37(m,1H),1.19(pen,7.7,2H),0.85(d,6.8,3H),0.82(d,6.8,3H)。¹³C NMR(151MHz,DMSO-d₆,28deg C) δ 172.2,171.2,170.9,170.6,158.8,138.9,134.3,132.2,129.4,119.0,57.5,53.0,46.1,38.5,36.9,34.8,30.3,29.2,27.7,26.7,25.7,24.8,19.1,18.1。

[0128] 实施例6连接体-抗生素VI

[0129]



[0130] 在氮气下向反应器中装入NMP (495g)、二甲基氨基哌啶基利福霉素IVa (90.0g, 97.1mmol) 和N-((S)-1-(((S)-1-((4-(氯甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺V (60.0g, 101.5mmol)。将内容物加热到55-60℃持续12小时。冷却后,加入EtOAc (1.2kg),并将内容物老化4小时。过滤浆体,将滤饼用EtOAc (158g) 洗涤。在真空下于20-25℃干燥滤饼,得到粗的连接体-抗生素VI,为暗蓝色固体 (137.1,93%产率)。

[0131] 纯化:将粗的连接体-抗生素VI (113.3g) 溶于含有0.05%甲酸的 (FA) 1:1的乙腈 (ACN)/水 (8.5L) 中。将溶液通过 **Celite®** (200g) 过滤,并将滤液用0.05%FA的水溶液 (34.0L) 处理。将稀释的溶液加载到预平衡的柱上,随后用以下的流动相成分进行洗脱:

[0132]

洗脱剂	组分% (ACN/水/FA)	流速 (L/min)	时间 (min)	收集的流分 (数目 x L)
1	10/90/0.05	4.0	79	--
2	30/70/0.05	3.9	128	19x 25
3	40/60/0.05	3.9	83	47x 5
4	90/10/0.05	3.9	53	--
5	50/50/0.05	3.9	58	--
6	10/90/0.05	3.9	73	--

[0133] 向柱中装填HP20SS树脂 (DIAION™HP20SS, Mitsubishi Chemical), 其包括高度交联的水合聚苯乙烯; 30-70%苯, 二乙烯基-, 具有乙烯基苯和乙烯基乙基苯的聚合物。浓缩步骤通过以下操作开始进行: 首先将粗的连接体-抗生素VI溶液用0.05%FA的水溶液 (165L) 稀释, 达到ACN/H₂O/FA: 10/90/0.05的组成。将稀释的溶液随后以0.8L/min的速率加载到预平衡的树脂 (10/90/0.05) 上。以0.8L/min用90/10/0.05洗脱37分钟。当蓝色条带开始洗脱出柱时, 收集产物, 所有的蓝色物质收集在一个流分中。所捕获部分的纯度为94.4% (~10L)。将该柱用60:40MeOH/水 (22.4L) 清洗。

[0134] 含有产物连接体-抗生素VI的流分在最高温度25℃下真空浓缩, 直到没有观察到溶剂 (ACN) 冷凝。将浓缩物转移到用注射用水 (WFI, 0.5L) 清洗过的蒸馏瓶中。将稀释的浓缩物过滤, 将滤液冷冻干燥, 得到纯化的连接体-抗生素VI, 为暗蓝色固体 (45.6g, 40.2%产率)。¹H NMR (600MHz, CD₂Cl₂:d₄-MeOH 9:1, 4deg C) δ7.80 (d, 8.4, 2H), 7.42 (d, 8.3, 2H), 6.74 (dd, 15.9, 11.2, 1H), 6.69s, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.34 (d, 10.6, 1H), 6.17 (d, 12.8, 1H), 6.15 (dd, 15.9, 7.5, 1H), 4.96 (dd, 12.7, 7.5, 1H), 4.86 (d, 10.8, 1H), 4.49 (dd, 9.6, 4.0, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.23 (m, 4H), 4.08 (d, 7.2, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.61 (d, 10.4, 1H), 3.45 (t, 7.2, 2H), 3.25 (d, 7.3, 1H), 3.18 (m, 5H), 3.07 (m, 1H), 2.93 (s, 9H), 2.09 (m, 1H), 2.41 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (m, 4H), 1.94 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.69 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.54 (m, 3H), 1.27 (m, 2H), 1.22 (m, 1H), 0.92 (m, 9H), 0.81 (d, 6.6, 3H), 0.79 (m, 1H), 0.02 (d, 6.8, 3H), -0.40 (d, 6.6, 3H)。¹³C NMR (600MHz, CD₂Cl₂:d₄-MeOH 9:1, 4deg C) δ193.9, 183.2, 175.3, 174.7, 173.1, 172.0, 171.9, 171.8, 169.8, 161.2, 158.0, 156.1, 147.0, 145.4, 143.9, 141.6, 140.1, 134.6, 134.1, 133.6, 132.4, 132.0, 126.5, 121.7, 120.7, 119.3, 118.9, 112.5, 112.1, 110.6, 108.8, 108.1, 96.0, 91.5, 77.0, 76.8, 74.7, 74.1, 71.2, 65.9, 59.8, 57.0, 47.4, 46.6, 46.5, 40.3,

38.2, 38.0, 37.4, 36.2, 33.3, 31.0, 29.4, 28.8, 26.9, 26.1, 25.7, 22.5, 21.1, 20.5, 19.5, 18.6, 18.5, 10.6, 9.4, 8.3, 7.8。

[0135] 实施例7在制备抗WTA抗体-抗生素缀合物中的连接体-抗生素VI和抗体的缀合

[0136] 如先前针对其它抗体所报道的(WO2014/194247, 引入作为参考; Junutula, 等人, 2008b Nature Biotech., 26 (8) :925-932), 构建和生产抗-WTA抗体的半胱氨酸工程化的(THIOMAB™, Genentech) 变体。简言之, 在抗WTA重链的Ala 118位置处改造半胱氨酸残基以产生其cys 118THIOMAB™变体(HC A118C)。通过将半胱氨酸工程化的抗WTA抗体与连接体-抗生素VI中间体缀合来制备抗WTA抗体-抗生素缀合物。在缀合之前, 根据WO 2004/010957中描述的方法(其教导为此目的并入本文作为参考), 使用标准方法用TCEP部分还原半胱氨酸工程化的抗WTA抗体。根据已描述的方法, 例如Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21: 778-784和US 2005/0238649, 使用标准方法将部分还原的抗体与连接体-抗生素VI中间体缀合。简言之, 将部分还原的抗体与VI合并以允许连接体-抗生素中间体与抗体的还原半胱氨酸残基缀合。猝灭缀合反应, 并纯化AAC。测定每种AAC的抗生素载荷(每抗体的抗生素部分的平均数), 对于用单半胱氨酸突变位点工程化的抗壁磷壁酸抗体而言, 抗生素载荷为约1至约2。

[0137] 用于缀合的ThioMabs的还原/氧化:

[0138] 将在CHO细胞中表达的全长的半胱氨酸工程化的单克隆抗体(ThioMabs-Junutula等人, 2008b Nature Biotech., 26 (8) :925-932; Dornan等人(2009) Blood 114 (13) :2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen等人(2012) Nature Biotech., 30 (2) : 184-191; Junutula等人(2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52) 用约20-40倍过量的TCEP(三(2-羧乙基) 膦盐酸盐或DTT(二硫苏糖醇) 在50mM Tris pH 7.5中用2mM EDTA在37℃还原3小时或在室温下过夜(Getz等人(1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)。将还原的ThioMab稀释并加载到在pH5的10mM乙酸钠中的HiTrap S柱上, 并用含有0.3M氯化钠的PBS洗脱。或者, 通过加入1/20体积的10%乙酸酸化抗体, 用pH5的10mM琥珀酸盐稀释, 加载到柱上, 然后用10倍柱体积的琥珀酸盐缓冲液洗涤。用50mM Tris pH7.5, 2mM EDTA洗脱柱子。

[0139] 用15倍摩尔过量的DHAA(脱氢抗坏血酸) 或200nM硫酸铜水溶液(CuSO₄) 处理洗脱的还原的ThioMab。链间二硫键的氧化在约3小时或更长时间内完成。环境空气氧化也是有效的。将再氧化的抗体透析到20mM琥珀酸钠pH5, 150mM NaCl, 2mM EDTA中, 并在-20℃下冷冻保存。

[0140] Thio-Mab抗体与连接体-抗生素中间体VI的缀合: 靶向于壁磷壁酸(抗-WTA) 的解封闭的、再氧化的硫代抗体(ThioMab) 与过量的、例如6-8倍摩尔过量的连接体-抗生素中间体VI(来自浓度约为20mM的DMSO储备液) 在50mM Tris, pH8中进行反应, 在含水混合物中直至反应完成(16-24小时), 其通过反应混合物的LC-MS分析确定。缀合反应的含水混合物可包括选自丙二醇、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA) 和二甲基亚砜(DMSO) 的溶剂。

[0141] 然后在用20mM琥珀酸钠(pH5) 稀释后将粗的抗体-抗生素缀合物(AAC) 施加于阳离子交换柱。用至少10倍柱体积的20mM琥珀酸钠(pH5) 洗涤柱子, 并用PBS洗脱抗体。使用凝胶过滤柱将AAC配制成20mM His/乙酸盐, pH5, 含有240mM蔗糖。AAC通过UV光谱法测定蛋白质

浓度,分析型SEC(尺寸排阻色谱)用于聚集体分析,以及在使用赖氨酸C内肽酶处理之前和之后用LC-MS进行表征。

[0142] 尺寸排阻色谱使用Shodex KW802.5柱在0.2M磷酸钾pH 6.2中用0.25mM氯化钾和15%IPA以0.75ml/min的流速进行。通过在280nm处测定的洗脱的峰面积吸光度的积分来确定AAC的聚集状态。

[0143] 使用Agilent QTOF 6520ESI仪器进行LC-MS分析。例如,将使用该化学方法产生的AAC用1:500w/w蛋白内切酶Lys C(Promega)在Tris,pH7.5中在37°C处理30分钟。将得到的切割片段加载到加热至80°C的1000Å、8µm PLRP-S柱上,并在5分钟内用30%B至40%B梯度洗脱。流动相A:含0.05%TFA的H₂O。流动相B:含有0.04%TFA的乙腈。流速:0.5ml/min。在电喷雾电离和MS分析之前,通过280nm处的UV吸光度监测蛋白质洗脱。通常可实现未缀合的Fc片段、残余未缀合的Fab和抗生素-Fab的色谱分离。使用Mass Hunter™软件(Agilent Technologies)对获得的m/z谱进行解卷积,以计算抗体片段的质量。

[0144] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实施例更详细地描述了上述发明,但是描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。因此,可以认为所有合适的修改和等同物都落入由所附权利要求限定的本发明的范围内。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容以其整体明确地并入本文作为参考。

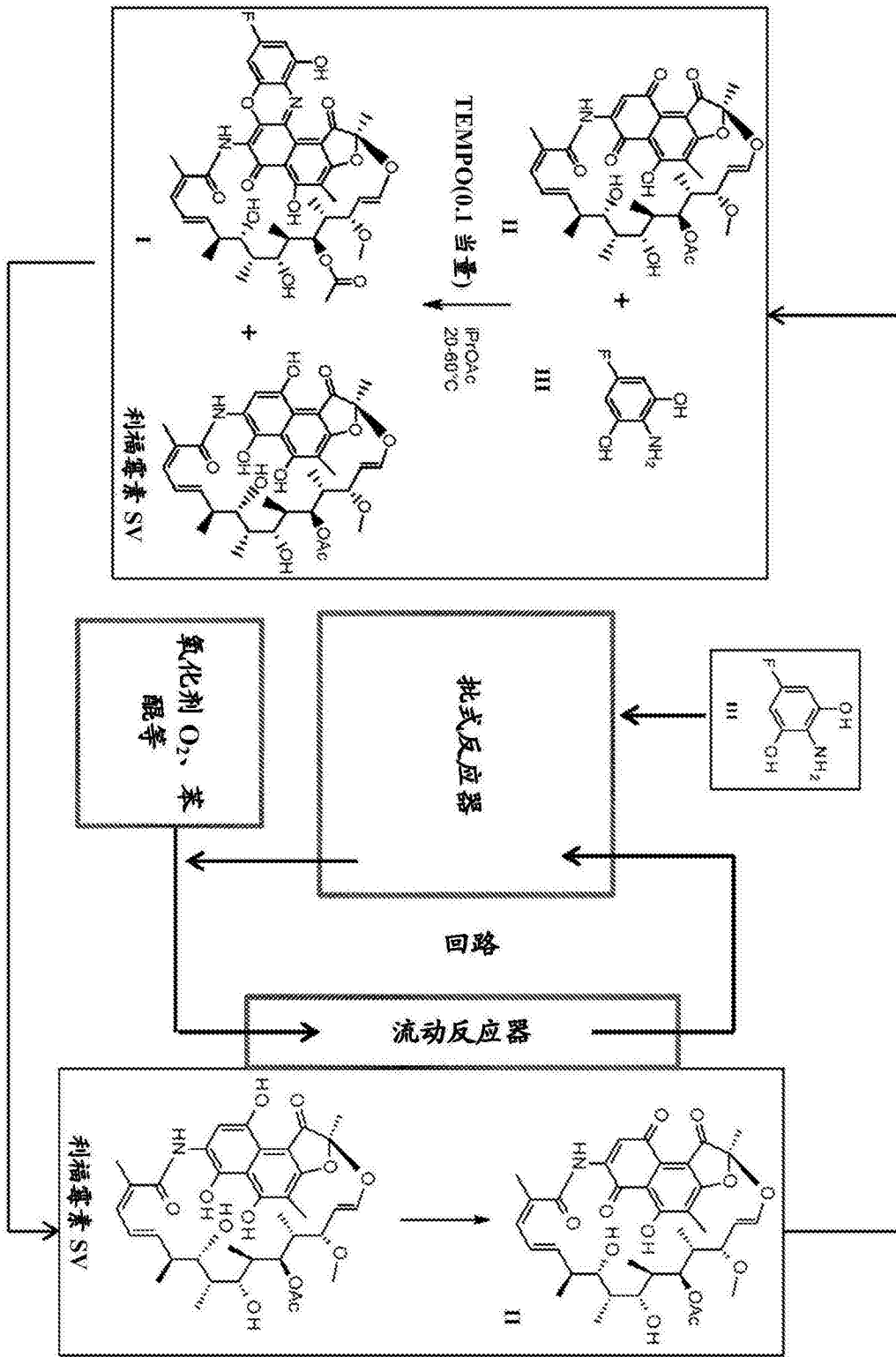


图1