



天冬酰胺类抗体-药物偶联物连接子的合成新工艺

林子健,曹小冬

(浙江理工大学理学院,杭州 310018)

摘要: 为了提高抗体-药物偶联物(Antibody-drug conjugate, ADC)的连接子 4-N-(N-(L-丙氨酰-L-丙氨酰)-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺酰基)-氨基苯甲醇(NH₂-AAN(Trt)-PAB)的合成效率,设计了一条新的合成路线。以 N-苄甲氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺为起始原料,经过氨基酸缩合、氨基脱保护 4 步反应,高效合成了 NH₂-AAN(Trt)-PAB。LCMS、¹H NMR 分析表征结果表明成功合成了 NH₂-AAN(Trt)-PAB。该研究具有操作简便、条件温和可控、合成效率高、总产率较高等特点,有利于 NH₂-AAN(Trt)-PAB 的放大生产及其在 ADC 药物研发中的应用,同时对其他蛋白酶可裂解连接子的合成具有借鉴意义。

关键词: 抗体-药物偶联物;连接子;天冬酰胺;氨基酸缩合;氨基脱保护;可裂解连接子

中图分类号: O622.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2023)09-0612-06

引文格式: 林子健,曹小冬.天冬酰胺类抗体-药物偶联物连接子的合成新工艺[J].浙江理工大学学报(自然科学),2023,49(5):612-617.

Reference Format: LIN Zijian, CAO Xiaodong. A novel synthetic technology of asparagine antibody-drug conjugate linker[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2023, 49(5): 612-617.

A novel synthetic technology of asparagine antibody-drug conjugate linker

LIN Zijian, CAO Xiaodong

(School of Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To improve the synthesis efficiency of the linker NH₂-AAN(Trt)-PAB of antibody-drug conjugate (ADC), we designed a new synthetic route. With Fmoc-Asn(Trt)-OH as the raw material, NH₂-AAN(Trt)-PAB was efficiently synthesized through four steps including amino acid condensation and amino deprotection. The results of LCMS and ¹H NMR analysis indicate the successful synthesis of NH₂-AAN(Trt)-PAB. This synthesis route has many advantages, such as simple operation, mild condition, high efficiency, and high yield, which is conducive to the scale-up production of NH₂-AAN(Trt)-PAB and its application in ADC drug research and development. It has reference significance for the synthesis of other protease cleavable linkers.

Key words: ADC; linker; asparinate; amino acid condensation; amino deprotection; cleavable linker

0 引言

抗体偶联药物(Antibody drug conjugate, ADC)是由靶向特异性抗原的单克隆抗体与小分子细胞毒性药物通过连接子连接而成,具有传统小分

子化疗的强大杀伤效应和抗体药物的肿瘤靶向性^[1-3]。随着 ADC 开发技术的迭代和临床试验的积累,偶联连接子已被公认是整个 ADC 设计的关键要素,在抗体-药物偶联物的合成过程中起着至关重要的作用^[4-6]。

收稿日期:2023-05-03 网络出版日期:2023-06-07

作者简介:林子健(1997—),男,安徽宣城人,硕士研究生,主要从事有机合成方面的研究。

通信作者:曹小冬, sheidon.cao@eubulusbio.com

4-N-(N-(L-丙氨酰-L-丙氨酰)-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺酰基)-氨基苯甲醇 (NH_2 -AAN(Trt)-PAB) 是合成新一代抗体-药物偶联物的连接子。由于其具有优越的体内稳定性以及能够在肿瘤细胞内快速裂解释放药物等特点,成功应用于多种新型偶联药物的开发中,尤其是抗体-药物偶联物的开发^[7]。许多使用 NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的抗体-药物偶联物在肿瘤模型中显示出优异的抗肿瘤疗效^[8-11]。

NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的合成方法通常以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺和 N-叔丁氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺作为起始原料,经过 2 次氨基酸缩合以及 2 次氨基脱保护得到目标产物。然而,通过多次重复文献^[12-13]报道的合成路线,发现这两条路线中存在很多问题:a) 在以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺作为起始原料的合成路线中,采用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)为缩合试剂,在此条件下反应需要过夜、反应时间较长;其次,该路线采用 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为缩合反应的溶剂,反应完成后用乙醚打浆,反应产生的杂质无法完全除去。该合成路线耗时较长且纯化困难,最终的合成收率较低,且乙醚安全系数低,对大量生产不利。b) 在以 N-叔丁氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺作为起始原料的合成路线中,第二步采用三氟乙酸脱去叔丁氧羰基,这一过程会有大量副产物产生,导致纯化困难,最终收率不高。

针对上述情况,本文设计了一条 NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的合成新路线,即以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺为起始原料,经过氨基酸缩合、氨基脱保护 4 步反应,高效合成 NH_2 -AAN(Trt)-PAB,并通过优化反应条件得到最佳合成路线。采用

LCMS、¹H-NMR 对产物的结构进行表征和分析。该合成新路线具有操作简便、条件温和和可控、合成效率高、总产率较高等特点,有利于 NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的放大生产及其在 ADC 药物研发中的应用,同时对其他蛋白酶可裂解连接子的合成具有借鉴意义。

1 实验部分

1.1 实验主要材料

四氢呋喃(THF)、二氯甲烷(DCM)、甲醇(MeOH)、二甲胺(DMA)、哌啶(Piperidine)和甲基叔丁基醚等均为分析纯,购于上海炎泽化工有限公司;N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)为分析纯,购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺、对氨基苄醇、N-(N-苄氧羰基-L-丙氨酰)-L-丙氨酸、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)购于上海麦克林生化科技股份有限公司;TLC 薄层板购于天津市北联精细化学品开发有限公司。

1.2 实验主要仪器

AVANCE AV400 MHz 型核磁共振波谱仪、Micromass Quattro Micro 液质联用质谱仪、Biotage Isolera Prime 型快速制备液相色谱和 UV-2600 型紫外分光光度仪。

1.3 天冬酰胺类连接子 NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的合成

以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺为起始原料,经过氨基酸缩合、氨基脱保护基四步反应合成天冬酰胺类连接子 NH_2 -AAN(Trt)-PAB(5),合成路线如图 1 所示。

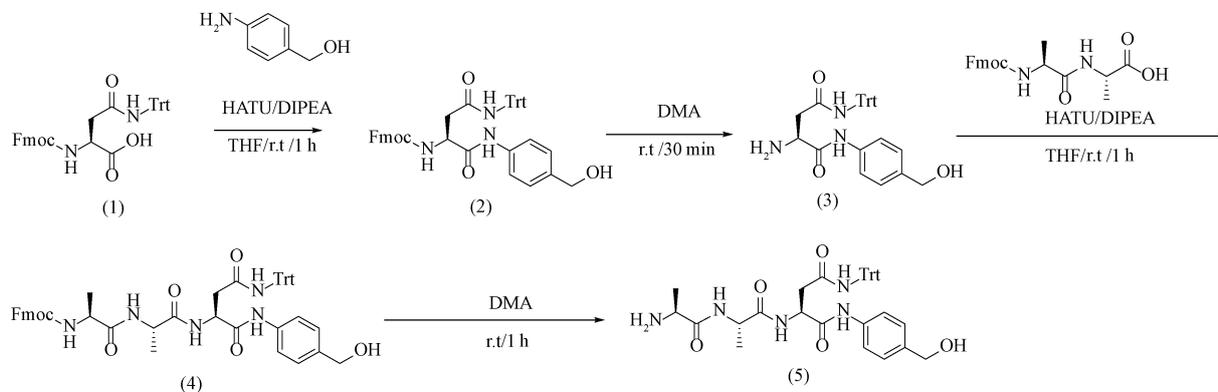


图 1 天冬酰胺类连接子 NH_2 -AAN(Trt)-PAB 的合成路线

1.3.1 中间体(2)的合成

将 20.00 g (33.52 mmol) N-苄氧羰基-N'-三

苯甲基-L-天冬酰胺溶于 THF (240.0 mL) 中,加入 19.12 g (50.28 mmol) HATU 和 14.1 mL

(83.80 mmol) DIPEA。随后,在混合物中加入 4.12 g (33.52 mmol) 对氨基苄醇,在室温下搅拌 1 h。反应完成后用 DCM 萃取溶液,将溶液干燥和浓缩,然后用硅胶色谱柱进行纯化(MeOH 与 DCM 的体积比为 1:10),得到 19.50 g 白色固体产物。产物为中间体(2),产率 83%,LCMS[M+H]⁺ = 703。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.01 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.33 ~ 7.12 (m, 22H), 5.09 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.31 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H), 2.68 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H)。

1.3.2 中间体(3)的合成

将 19.50 g (27.78 mmol) 中间体(2)加入 DMA (100.0 mL) 中,在室温下搅拌 30 min。反应完成后用 DCM 萃取溶液,之后将溶液干燥浓缩,加入甲基叔丁基醚 (100.0 mL) 并洗涤 3 次。洗涤完成后倒出甲基叔丁基醚层,烘干,得到 11.40 g 白色固体产物。产物为中间体(3),产率 86%,LCMS[M+H]⁺ = 480。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.25 (s, 1H), 8.76 (s, 2H), 8.18 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.28 ~ 7.14 (m, 17H), 5.09 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J* = 8.2, 5.1 Hz, 1H), 2.65 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H)。

1.3.3 中间体(4)的合成

将 11.40 g (23.77 mmol) 中间体(3)溶于 THF (240.0 mL) 中,加入 10.84 g (28.52 mmol) HATU 和 8.0 mL (47.54 mmol) DIPEA。随后,在混合物中加入 9.09 g (23.77 mmol) N-(N-苄氧羰基-L-丙氨酸)-L-丙氨酸,混合物在室温下搅拌 1 h。反应完成后将溶液干燥和浓缩,然后用硅胶色谱柱进行纯化(MeOH 与 DCM 的体积比为 3:5),得到 16.65 g 浅黄色固体产物。产物为中间体(4),产率 83%,LCMS[M+H]⁺ = 845。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.72 (s, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.20 (t, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.62 ~ 7.51 (m, 4H), 7.42 ~ 7.07 (m, 22H), 5.75 (s, 1H), 5.12 ~ 5.02 (m, 1H), 4.64 (dd, *J* = 14.1, 7.6 Hz, 4H), 4.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H), 2.80 ~ 2.62 (m, 2H), 1.23 (ddd, *J* = 24.3, 11.4, 5.1 Hz, 6H)。

1.3.4 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)的合成

将 16.65 g (19.73 mmol) 中间体(4)加入

DMA (180.0 mL) 中,在室温下搅拌 1 h。反应完成后将溶液干燥浓缩,加入甲基叔丁基醚 (100.0 mL) 并洗涤 3 次,洗涤完成后倒出甲基叔丁基醚层,烘干,得到 10.43 g 淡黄色固体产物。产物为 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5),产率 85%,LCMS[M+H]⁺ = 623。

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.77 (s, 1H), 8.69 (s, 2H), 8.36 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 8.35 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.28 ~ 7.13 (m, 17H), 5.09 (s, 1H), 4.64 (dd, *J* = 13.7, 8.0 Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.33 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.67 (s, 1H), 2.74 ~ 2.64 (m, 2H), 1.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)。

1.4 测试与表征

1.4.1 质谱测试

用乙腈作为流动相,采用液质联用质谱仪测试天冬酰胺类连接子合成过程中中间体(2)、(3)、(4)以及目标产物(5)的质谱。

制样方法:取待测样品 5 mg 于离心管中,加入乙腈 1 mL,超声助溶,用滤头过滤制得待测试滤液样品。

1.4.2 薄层层析法

将待分析样品 5 mg 溶解于 1 mL THF,然后用毛细管在 TLC 薄层板上点样,随后在甲醇和二氯甲烷配置的展开剂上进行展开(甲醇与二氯甲烷的体积比例为 1:10)。最后 TLC 薄层板在 254 nm 紫外灯下找出吸收斑点。

2 结果与讨论

2.1 中间体(2)、(3)、(4)和 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)的质谱分析

对中间体(2)、(3)、(4)和 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)进行质谱分析测试,结果如图 2 所示。由图 2(a)可知:在质谱正离子模式下中间体(2)出现较强的[M+H]⁺ 分子离子峰 *m/z* 703,与中间体(2)的理论分子量 701.82 相吻合。由图 2(b)可知:在质谱正离子模式下中间体(3)出现较强的[M+H]⁺ 分子离子峰 *m/z* 481,与中间体(3)的理论分子量 479.58 相吻合。由图 2(c)可知:在质谱正离子模式下中间体(4)出现较强的[M+H]⁺ 分子离子峰 *m/z* 845,与中间体(4)的理论分子量 843.98 相吻合。图 2(d)可知:在质谱正离子模式下出现较强的[M+H]⁺ 分子离子峰 *m/z* 623,与 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)的理论分子量 621.74 相吻合。

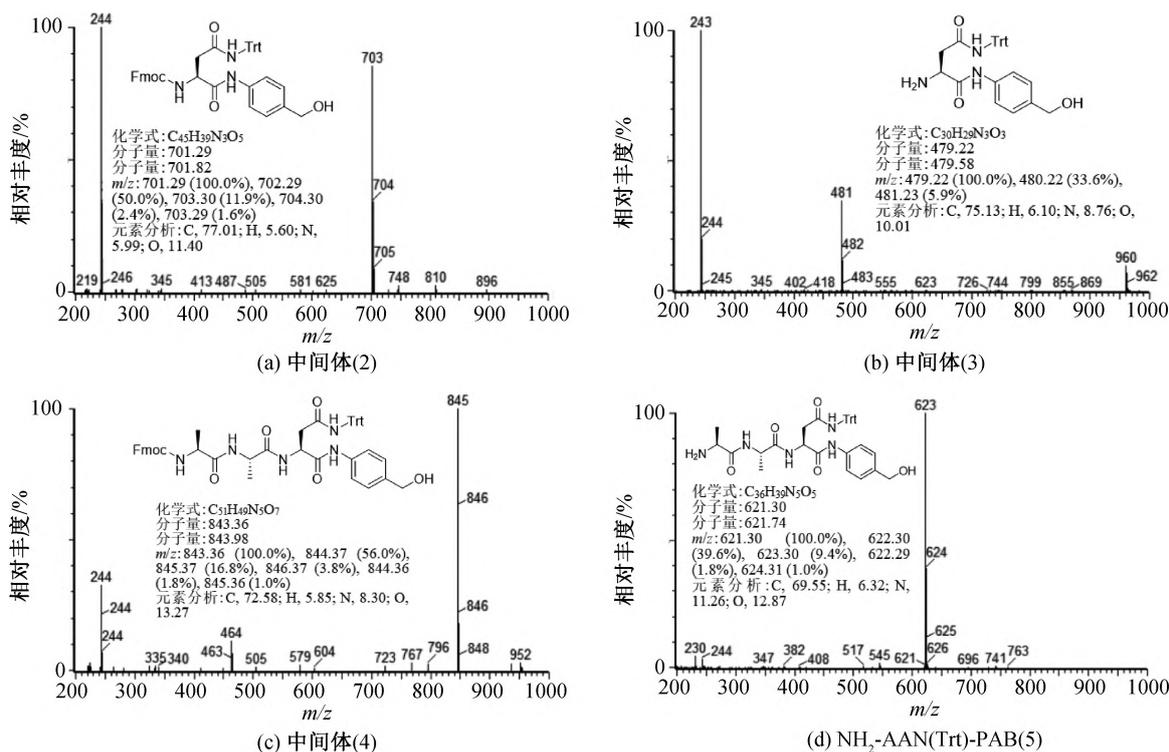


图 2 中间体(2)、中间体(3)、中间体(4)及天冬酰胺类连接子(5)的质谱谱图

2.2 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)的核磁谱图

采用核磁氢谱对 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)进

行核磁表征,结果如图 3 所示。根据峰的位置、裂分情况、耦合常数和氢的个数可以确定为目标产物。

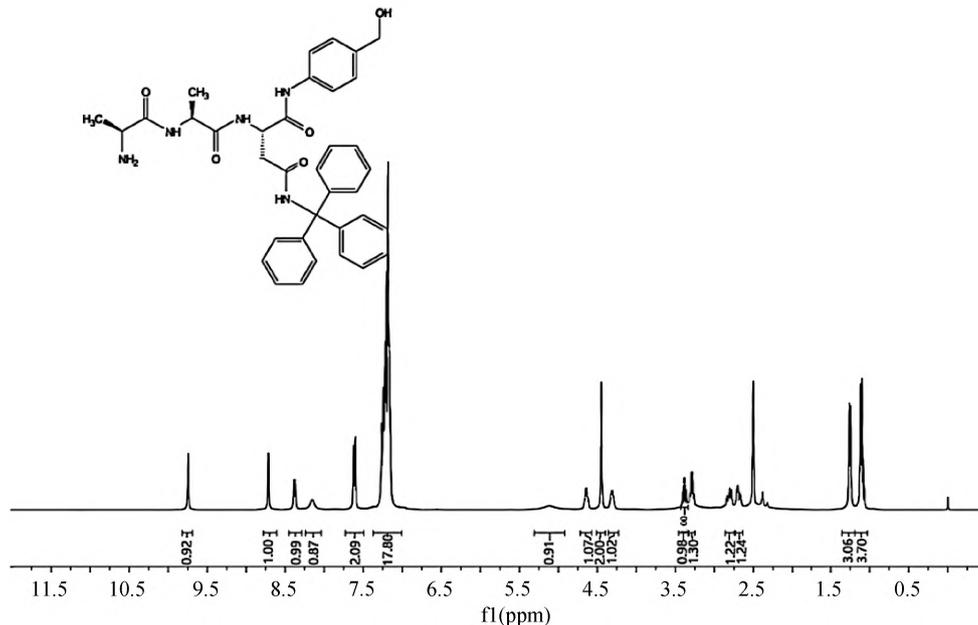


图 3 NH₂-AAN(Trt)-PAB(5)的核磁谱图

2.3 天冬酰胺类连接子 NH₂-AAN(Trt)-PAB 的合成过程分析

本文尝试多种起始原料进行反应合成 NH₂-AAN(Trt)-PAB,发现以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺和 N-叔丁氧羰基-N'-三苯甲基-L-天

冬酰胺作为起始原料的反应均存在副产物较多、纯度低、收率低的问题。而在以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺作为起始原料的合成路线中,纯化难度大大降低、产物的纯度和收率显著提升。因此本文选用 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬

胺作为起始原料进行反应。第一步为 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺与对氨基苄醇的缩合过程,本文尝试了多种缩合试剂,最终确定以 HATU 为缩合试剂,该步骤反应迅速,产率良好,避免了在 HBTU 条件下耗时长的问题,大大提高了合成效率。且第一步选用 THF 作为溶剂,后处理过程中杂质容易除去,避免了以 DMF 作为溶剂后处理困难的问题。第二步为中间体(2)氨基脱保护的过程,由于苄氧羰基为碱敏感保护基,这步尝试了多种脱保护基的条件,发现在二甲胺的条件下反应优良,后处理的过程中选用甲基叔丁基醚对产物进行洗涤操作,避免了乙醚安全系数低的问题。第三步为中间体(3)接二肽的过程,也是该合成路线中最关键的一步,尝试了多种缩合条件,在以 HATU 为缩合试剂的条件下有着良好的收率。最后一步为中间体(4)脱氨基保护基的过程,在二甲胺的条件下有着良好的收率。通过优化反应条件,目标产物的总产率可达 50%。

2.4 反应条件对缩合反应的影响

化合物(3)与 N-(N-苄氧羰基-L-丙氨酰)-L-丙氨酸反应合成中间体(4)是合成 NH₂-AAN(Trt)-PAB 的关键步骤。在反应条件的筛选中,发现缩合剂及时间对结果有重要的影响,结果如表 1 所示。由表 1 可以看出:以 DCC 和 EDCI 作为缩合剂时,产率较低,以 HATU 做缩合剂时有较高的收率;在以 HATU 作为缩合剂的条件下,随着反应的进行产率逐渐提高,当反应进行 1 h 产率达到 83%,最佳条件为以 HATU 作为缩合剂在四氢呋喃溶液中反应 1 h。

表 1 中间体(4)合成过程的反应条件筛选

序号	缩合剂	催化剂	碱	溶剂	时间/h	产率/%
1	HATU		DIPEA	THF	0.5	56
2	HATU		DIPEA	THF	1.0	83
3	HATU		DIPEA	THF	2.0	80
4	HATU		DIPEA	DCM	1.0	71
5	HATU		DIPEA	DMF	1.0	72
6	DCC	DMAP		THF	1.0	68
7	EDCI	HOBT		THF	1.0	66

2.5 反应条件对脱苄氧羰基的影响

中间体(4)脱苄氧羰基的过程中尝试了多种条件,发现碱的选择以及反应时间对反应有着重要的影响,结果如表 2 所示。由表 2 可以看出:中间体(4)在 Piperidine 和 DIPEA 的条件下反应 30 min 有一定的脱除效果,但这 2 种试剂不是最理想的碱

性试剂;中间体(4)在 DMA 的条件下反应 30 min,可以达到较高的产率,且随着反应时间的进行,产率不再增加,因此反应的最佳条件为以 THF 作为溶剂,在 DMA 的条件下反应 30 min。

表 2 中间体(4)脱苄氧羰基过程的反应条件筛选

序号	碱	溶剂	时间/min	产率/%
1	DMA	THF	10	40
2	DMA	THF	30	85
3	DMA	THF	60	84
4	DMA	DCM	30	79
5	Piperidine	DCM	30	75
6	DIPEA	DCM	30	73

3 结论

本文以 N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-天冬酰胺为起始原料,经过氨基酸缩合、氨基脱保护四步反应,高效合成天冬酰胺类抗体-药物偶联物连接子 NH₂-AAN(Trt)-PAB,对合成工艺进行优化,并对 NH₂-AAN(Trt)-PAB 进行表征,主要得出以下结论:

a)合成了天冬酰胺类抗体-药物偶联物连接子 NH₂-AAN(Trt)-PAB,通过核磁氢谱和质谱证明了目标产物的成功合成,总产率为 50%。

b)优化的合成工艺中氨基酸缩合的条件为 THF 作溶剂、DIPEA 作碱、HATU 作缩合剂;氨基脱苄氧羰基的条件为 THF 作溶剂、DMA 作碱。

新合成路线具有高效、安全性高、操作简便以及产品纯度高等特点,适合放大生产,该路线对其他三肽类连接子的合成具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] Beck A, Haeuw J F, Wurch T, et al. The next generation of antibody-drug conjugates comes of age[J]. *Discovery Medicine*, 2010, 10(53): 329-339.
- [2] Tarantino P, Carmagnani Pestana R, Corti C, et al. Antibody-drug conjugates: smart chemotherapy delivery across tumor histologies[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2022, 72(2): 165-182.
- [3] Fu Z W, Li S J, Han S F, et al. Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(4): 1066-1090.
- [4] Salomon P L, Singh R. Sensitive ELISA method for the measurement of catabolites of antibody-drug conjugates

- (ADCs) in target cancer cells [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(6): 1752-1761.
- [5] Whiteman K R, Johnson H A, Sun X X, et al. Anti-tumor activity and pharmacokinetics of the anti-FOLR1-maytansinoid conjugate IMGN853 is maintained over a wide range of maytansinoid to antibody ratios[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(8): 4628-4628.
- [6] Moore K N, Martin L P, O'Malley D M, et al. Safety and activity of mirvetuximab soravtansine (IMGN₈₅₃), a folate receptor alpha-targeting antibody-drug conjugate, in platinum-resistant ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer: a phase I expansion study[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2017, 35(10): 1112-1118.
- [7] Chen H, Liu X, Clayman E S, et al. Synthesis and evaluation of a CBZ-AAN-Dox prodrug and its in vitro effects on SiHa cervical cancer cells under hypoxic conditions[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015, 86(4): 589-598.
- [8] Okeley N M, Miyamoto J B, Zhang X, et al. Intracellular Activation of SGN-35, a Potent Anti-CD30 Antibody-Drug Conjugate Released Drug from SGN-35 [J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(3): 888-897.
- [9] Miller J T, Vitro C N, Fang S T, et al. Enzyme-agnostic lysosomal screen identifies new legumain-cleavable ADC linkers [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2021, 32(4): 842-858.
- [10] Lerchen H G, Stelte-Ludwig B, Sommer A, et al. Tailored linker chemistries for the efficient and selective activation of ADCs with KSPi payloads[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2020, 31(8): 1893-1898.
- [11] Kirchoff D, Stelte-Ludwig B, Lerchen H G, et al. IL3ra-targeting antibody-drug conjugate BAY-943 with a kinesin spindle protein inhibitor payload shows efficacy in preclinical models of hematologic malignancies[J]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3464.
- [12] 刘辰, 刘源. 一种肿瘤微环境特异性激活的小分子靶向偶联体及其用途:CN104147612B[P]. 2017-05-24.
- [13] Bajjuri K M, Liu Y, Liu C, et al. The legumain protease-activated auristatin prodrugs suppress tumor growth and metastasis without toxicity [J]. *ChemMedChem*, 2011, 6(1): 54-59.

(责任编辑:张会巍)