

维布妥昔单抗关键中间体的合成工艺优化

杨 柳^{1,2} 谢文博^{2,3} 孙 雪² 李艳杰^{1*}

(¹ 长春中医药大学药学院 长春 130117; ² 吉林省博大伟业药物研究有限公司 长春 130117;

³ 吉林大学生命科学学院 长春 130012)

摘 要 对维布妥昔单抗关键中间体(**1**)的合成工艺进行了改进与优化。以苄甲氧羰基-L-缬氨酸琥珀酰亚胺酯(**2**)为起始原料,先后经酯的氨解反应、酰胺化、Fmoc 脱保护、酰胺化与酯交换反应制得目标化合物**1**,总收率 11.6%,纯度 99.2%,产物结构经¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 表征。优化后的工艺路线具有反应条件温和、可操作性强、生产过程更安全的特点。在初步放大试验中,首步投料量达百克级别,并完成三批工艺验证,适合于工业化生产。

关键词 抗体偶联药物 维布妥昔单抗 中间体 工艺优化

Improved Synthetic Process of the Key Intermediate of Brentuximab Vedotin

Yang Liu^{1,2}, Xie Wenbo^{2,3}, Sun Xue², Li Yanjie^{1*}

(¹ College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, 130117;

² Jilin Province Broadwell Pharmaceutical Co. Ltd, Changchun, 130117; ³ College of Life Science, Jilin University, Changchun, 130012)

Abstract An improved synthetic process of **1**, the key intermediate of antibody-drug conjugates brentuximab vedotin, was reported in this paper. Using fluorene methoxycarbonyl-L-valine succinimide ester (**2**) as raw material, **1** was prepared *via* multi-step reactions including ammonolysis of esters, amidation, Fmoc deprotection, amidation and transesterification with an overall yield of 11.6% (based on **2**) and a purity of 99.2%. The target compound was identified by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. Compared with literature methods, this optimized process route has the advantage of mild reaction conditions, easy work-up and safe in productive process. In preliminary scale-up experiment, the first step of feeding amount reached the level of 100 grams, and three batches of process validation have been completed, which is more suitable for industrial production.

Keywords Antibody-drug conjugates, Brentuximab vedotin, Intermediate, Process optimization

维布妥昔单抗(brentuximab vedotin,图式 1),商品名 adcetris[®],是由美国 Seattle Genetice 公司和日本武田制药联合研发的一种抗体偶联药物,用于霍杰金淋巴瘤(HL)和系统性间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)的治疗^[1-3]。该药于 2011 年被美国 FDA 批准上市,由于它兼具抗体药物的精准靶向性和小分子细胞毒剂的高效杀伤性的特点^[4-6],可以达到高效低毒的治疗目标,因此在抗肿瘤医药市场上取得了巨大成功^[7]。维布妥昔单抗化学结构由单克隆抗体(antibody)、连接子(linker)和细胞毒性药物(cytotoxin)三部分组成^[8,9]。其连接子部分含有可切割的二肽缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)结构单元,属于可切割型连接子,这使得药物分子整体具有良好的释放行为、血浆稳定性和化学可牵引性^[10,11]。连接子是合成维布妥昔单抗的关键中间体,也是研发该药物的核心因素之一^[12]。

目前,关于连接子 Mc-Val-Cit-PABC-PNP(目标化合物**1**)的合成,有文献^[13]报道是以苄甲氧羰基-L-缬氨酸为起始物料,先后经酯化、酯的氨解、酰胺化、Fmoc 脱保护、酰胺化、酰化共 6 步反应得到目标化合物。该方法可操作性较强,但有

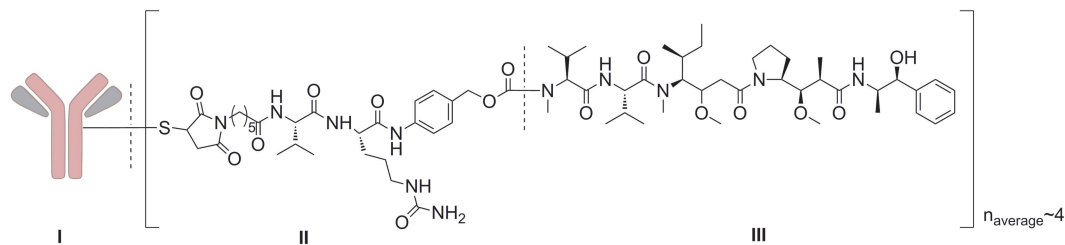
* 联系人,李艳杰 女,博士,副教授,主要从事药物化学研究。E-mail:76226774@qq.com

吉林省辽源市医药健康产业发展项目(202100010)资助

2022-10-16 收稿,2022-11-09 接受

多步反应使用高沸点溶剂 *N*-甲基吡咯烷酮,使后处理难度加大;还利用易制毒化学品乙醚对产品洗涤、打浆,危险系数高;且投料规模小,仅为毫克级别,总收率仅 8.6% (以化合物 **2** 计)。李卓荣等^[14]对上述合成工艺进行改进,以 DMF 代替 *N*-甲基吡咯烷酮作为反应溶剂,尽管后处理难度降低,但仍多次使用乙醚。另有文献^[15]报道是以苄

甲氧羰基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸(化合物 **3**)为原料,经 4 步反应得目标化合物,该条合成路线所使用的羧酸活化试剂氯甲酸乙酯为剧毒品。综上所述,现有的合成方法存在多次使用高沸点溶剂 *N*-甲基吡咯烷酮、易制毒化学品乙醚和剧毒品氯甲酸乙酯,难以进行后处理与产品纯化,且规模小、收率偏低的问题。



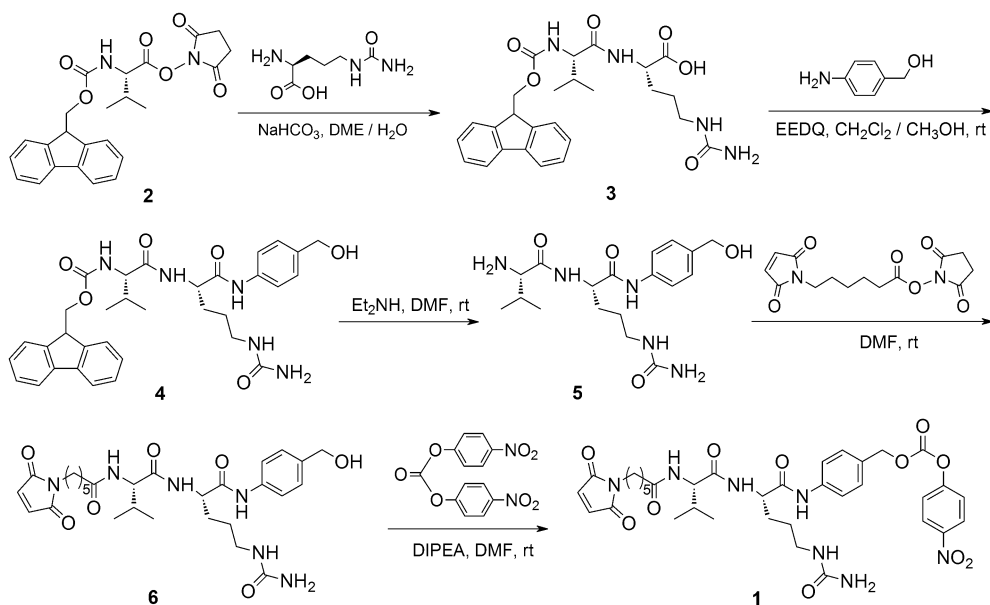
注: I: 单克隆抗体(抗 CD30 嵌合抗体 cAC10); II: 连接器(Mc-Val-Cit-PABC); III: 细胞毒性药物(一甲基奥瑞他汀 E)

图式 1 维布妥昔单抗的化学结构式

Scheme 1 The chemical structure of brentuximab vedotin

本研究结合文献方法,以化合物 **2** 为起始原料,先后经酯的氨解、酰胺化、Fmoc 脱保护、酰胺化和酯交换共 5 步反应制得目标化合物(见图式 2)。通过实验确定了较优的反应条件,尤其对反应所用溶剂及中间体的纯化方法进行了研究,使产品的纯度和收率均得到提高,总收率

11.6% (以化合物 **2** 计),纯度 99.2%。优化后的合成路线反应条件温和、可操作性强,生产过程更安全;开展放大实验,首步投料量达百克级别。该合成工艺适用于工业化生产连接器 Mc-Val-Cit-PABC-PNP (目标化合物 **1**),以便为后续研发抗体偶联药物提供重要参考。



图式 2 化合物 1 的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of compound 1

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苄甲氧羰基-L-缬氨酸琥珀酰亚胺酯(Fmoc-

Val-OSu)、L-瓜氨酸(L-Cit)、4-氨基苄醇(PABOH)、2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯(EEDQ)、6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(MC-OSu)、二(对硝基苯)碳酸酯(NPC)及 *N,N*-

二异丙基乙胺(DIPEA)购自上海 Adamas 试剂公司;二乙胺、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、甲基叔丁基醚、二氯甲烷、吗啉及二环己胺购自上海麦克林生化科技有限公司,预先经分子筛干燥备用;其他试剂均为市售分析纯或化学纯级。

Bruker AVANCE-400MHz 型核磁共振波谱仪和 Bruker ApexII 型高分辨质谱仪(瑞士布鲁克公司);LC-2030 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);X-5 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司)。

1.2 合成与表征

1.2.1 *N*-[(9*H*-苝-9-甲氧基)羰基]-*L*-缬氨酸-*N*⁵-(氨基羰基)-*L*-鸟氨酸(**3**)

在 5L 三颈烧瓶中加入 52.2g(0.30mol) *L*-瓜氨酸、25.1g(0.30mol) 碳酸氢钠和 600mL 水,搅拌至全部溶解,反应体系温度降至-5~5℃,冷却 10min。将 100g(0.23mol) 化合物 **2** 溶于 800mL 乙二醇二甲醚,倒入上述三颈烧瓶中,随后加入 800mL 四氢呋喃,搅拌至体系澄清,通入氮气,在室温下搅拌 40h, TLC 监测反应进程。反应完毕,加入 1.1L 15% 柠檬酸,用乙酸乙酯/异丙醇混合溶剂(体积比 9:1)萃取(800mL×3),合并有机相,并用水洗涤(800mL×3),减压浓缩得到白色固体,40℃ 下真空干燥至恒重。转入 2L 圆底烧瓶中,用甲基叔丁基醚打浆(1L×3),再超声 5min,抽滤,得白色固体 89.1g,收率 78.3%,熔点 166.3~168.1℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.48(s, 1H), 8.20(d, *J* = 7.2Hz, 1H), 7.90(d, *J* = 7.6Hz, 2H), 7.76(t, *J* = 7.2Hz, 2H), 7.43(t, *J* = 7.6Hz, 2H), 7.33(t, *J* = 7.2Hz, 2H), 5.96(bris, 1H), 5.40(bris, 2H), 4.29~4.26(m, 1H), 4.25~4.22(m, 2H), 4.15(t, *J* = 5.2Hz, 1H), 3.93(t, *J* = 16.4Hz, 1H), 2.98~2.94(m, 2H), 2.01~1.96(m, 1H), 1.71~1.56(m, 2H), 1.42~1.40(m, 2H), 0.87(dd, *J* = 13.2、6.8Hz, 6H); HRMS(ESI⁺), *m/z*: C₂₆H₃₂N₄O₆ [M+H]⁺, 理论值 497.2395, 实测值 497.2404。

1.2.2 *N*-[(9*H*-苝-9-甲氧基)羰基]-*L*-缬氨酸-*N*⁵-(氨基羰基)-*N*-[4-(羟甲基)苯基]-*L*-鸟氨酸酰胺(**4**)

在 5L 三颈烧瓶中加入 72.0g(0.15mol) 化合物 **3**、36.0g(0.29mol) 4-氨基苄醇、72.0g(0.29mol) 2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯和干燥的 2.2L 二氯甲烷/甲醇混合溶剂(体积比

2:1), 通入氮气, 在室温下搅拌 16h, TLC 监测反应进程。反应完毕, 减压浓缩得白色至淡黄色固体, 研磨成粉末状, 加入 1.2L 甲基叔丁基醚搅拌 1h, 抽滤, 洗涤。滤饼用 DMF/甲基叔丁基醚混合溶剂(体积比 1:20) 重结晶得固体。用甲基叔丁基醚打浆(1.2L×3), 抽滤, 洗涤, 减压干燥, 得白色固体 72.2g, 收率 82.7%, 熔点 185.2~187.1℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.99(bris, 1H), 8.13(d, *J* = 7.2Hz, 1H), 7.89(d, *J* = 7.2Hz, 2H), 7.75(t, *J* = 8.0Hz, 2H), 7.54(d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.47~7.40(m, 2H), 7.31(t, *J* = 7.2Hz, 2H), 7.23(d, *J* = 8.4Hz, 2H), 5.99(t, *J* = 5.2Hz, 1H), 5.42(bris, 2H), 5.12(t, *J* = 5.6Hz, 1H), 4.44~4.42(m, 3H), 4.31~4.26(m, 1H), 4.25~4.22(m, 2H), 3.94(t, *J* = 7.2Hz, 1H), 3.04~2.93(m, 2H), 2.02~1.96(m, 1H), 1.69~1.59(m, 2H), 1.47~1.35(m, 2H), 0.87(dd, *J* = 11.2、6.8Hz, 6H); HRMS(ESI⁺), *m/z*: C₃₃H₃₉N₅O₆ [M+H]⁺, 理论值 602.2973, 实测值 602.2953。

1.2.3 *L*-缬氨酸-*N*⁵-(氨基羰基)-*N*-[4-(羟甲基)苯基]-*L*-鸟氨酸酰胺(**5**)

在 1L 三颈烧瓶中加入 63.0g(0.10mol) 化合物 **4** 和 735mL DMF, 搅拌至溶解, 通入氮气, 随后加入 217mL(2.10mol) 二乙胺, 在室温下搅拌 16h, TLC 监测反应进程。反应完毕, 减压浓缩, 得油状物, 加入 525mL 二氯甲烷, 轻刮瓶壁使油状物固化, 抽滤。将滤饼研磨成粉末状, 并置于 1L 圆底烧瓶中, 用二氯甲烷打浆(500mL×3), 再超声 5min, 抽滤, 得白色至浅灰色粉末 38.0g, 收率 95.4%, 熔点 95.1~98.3℃。¹H NMR(400MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.08(bris, 1H), 8.19(d, *J* = 7.2Hz, 1H), 7.54(d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.23(d, *J* = 8.4Hz, 2H), 6.04(t, *J* = 5.3Hz, 1H), 5.45(bris, 2H), 5.12(bris, 1H), 4.55~4.46(m, 3H), 4.43(s, 2H), 3.05(d, *J* = 6.7Hz, 2H), 2.98~2.85(m, 1H), 1.97~1.94(m, 1H), 1.68~1.57(m, 2H), 1.43~1.34(m, 2H), 0.84(dd, *J* = 39.6、7.8Hz, 6H); HRMS(ESI⁺), *m/z*: C₁₈H₂₉N₅O₄ [M+H]⁺, 理论值 380.2292, 实测值 380.2304。

1.2.4 *N*-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧-1*H*-吡咯-1-基)-1-己酰基]-*L*-缬氨酸-*N*⁵-(氨基羰基)-*N*-[4-(羟甲基)苯基]-*L*-鸟氨酸酰胺(**6**)

在 1L 三颈烧瓶中加入 38.0g(0.10mol) 化合物 **5**、37.0g(0.12mol) 6-(马来酰亚胺基)己酸琥

珀酰亚胺酯和 560mL DMF, 搅拌至溶解, 通入氮气, 室温下搅拌 24h, 用 TLC 监测反应。反应完毕, 减压浓缩, 得油状物, 加入 700mL 甲基叔丁基醚, 轻刮瓶壁使油状物固化, 抽滤。将滤饼研磨成粉末状, 随后用 DMF/甲基叔丁基醚混合溶剂(体积比 1:20)重结晶, 析出晶体用甲基叔丁基醚(700mL×3)打浆处理 5min, 抽滤, 得白色粉末 53.2g, 收率 92.7%, 熔点 184.4~185.2℃。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.92 (brs, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.6Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.01 (brs, 2H), 5.98 (t, *J* = 5.6Hz, 1H), 5.42 (brs, 2H), 5.11 (t, *J* = 5.6Hz, 1H), 4.42 (d, *J* = 5.2Hz, 2H), 4.40 ~ 4.35 (m, 1H), 4.19 (t, *J* = 8.0Hz, 1H), 3.38 ~ 3.33 (m, 2H), 3.03 ~ 3.00 (m, 2H), 2.20 ~ 2.09 (m, 2H), 1.99 ~ 1.94 (m, 1H), 1.68 ~ 1.33 (m, 8H), 1.22 ~ 1.16 (m, 2H), 0.84 (dd, *J* = 12.8、6.8Hz, 6H); HRMS (ESI⁺), *m/z*: C₂₈H₄₀N₆O₇ [M + H]⁺, 理论值 573.3031, 实测值 573.3038。

1.2.5 *N*-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧-1*H*-吡咯-1-基)-1-氧己基]-*L*-缬氨酸-*N*⁵-(氨基羰基)-*N*-[4-[[[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基]甲基]苯基]-*L*-鸟氨酸酰胺(**1**)

在 5L 三颈烧瓶中加入 40.0g (69.89mmol) 化合物 **6**、26.8g (88.10mmol) NPC、15.4mL (88.29mmol) DIPEA 和 2L 干燥 DMF, 搅拌至溶解, 通入氮气, 室温下搅拌 40h, TLC 监测反应进程。反应完毕, 减压浓缩, 得油状物, 加甲基叔丁基醚, 轻刮瓶壁使油状物固化, 抽滤, 将滤饼研磨成粉末状, 用甲基叔丁基醚打浆 (1.6L×3), 再超声 5min, 抽滤、干燥, 得粗品。以二氯甲烷/甲醇混合溶剂(体积比 15:1)为洗脱剂, 硅胶柱层析纯化得白色粉末 10.4g, 收率 20.2%, 熔点 175.1~177.2℃。¹H NMR (400MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ: 9.52 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.8Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 8.0Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 3.2Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 3.2Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.8Hz, 4H), 6.75 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 4.57~4.54 (m, 1H), 4.18 (d, *J* = 7.2Hz, 1H), 3.51 (t, *J* = 6.8Hz, 2H), 3.24 ~ 3.11 (m, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.2Hz, 2H), 2.10~2.05 (m, 1H), 1.92~1.73 (m, 2H), 1.70~1.57 (m, 6H), 1.36~1.31 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 10.4Hz, 6H); ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ: 174.9, 172.8, 171.5, 171.0, 160.9, 155.9, 152.9,

145.7, 139.1, 134.5, 131.0, 129.9, 125.6, 122.2, 120.4, 71.0, 59.3, 53.6, 39.2, 37.9, 36.1, 30.9, 29.5, 28.5, 26.6, 25.5, 19.4, 18.5; HRMS (ESI⁺), *m/z*: C₃₅H₄₃N₇O₁₁ [M + H]⁺, 理论值 738.3093, 实测值 738.3091。

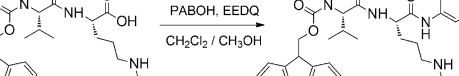
2 结果与讨论

2.1 投料比对酰胺化反应收率的影响

在化合物 **4** 的合成过程中, 偶联剂 2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯与反应原料的投料比, 对反应收率起到至关重要的作用。本研究结合文献方法, 分别将化合物 **3**、4-氨基苄醇与 2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯三者间物质量比以 1:1:1、1.5:1.5:1.5、2:2:2、2.5:2.5:2.5 等不同比例进行反应。考察三者投料量比对酰胺化反应收率的影响, 结果见表 1。

表 1 投料量比对酰胺化反应收率的影响

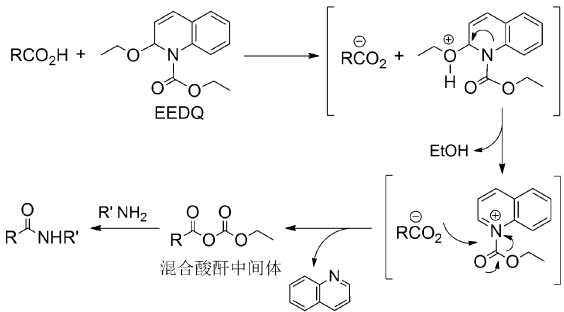
Tab.1 Effect of organic base on the yield of amidation reaction



Reaction scheme showing the conversion of compound **3** to compound **4** using PABOH and EEDQ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$.

序号	<i>n</i> (3): <i>n</i> (PABOH): <i>n</i> (EEDQ)	收率/%
1	1:1:1	54.3
2	1:1.5:1.5	73.4
3	1:2:2	82.7
4	1:2.5:2.5	83.0

由表 1 可知, 化合物 **3**、4-氨基苄醇与 2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯投料量比对酰化反应收率有较大影响。随着后两者投料比例增加, 收率显著提高; 当后两者投料比增大至 1:2:2 时, 反应收率达 82.7%; 继续增大后两者比例, 收率几乎没有变化, 故确定较优投料比 *n*(**3**):*n*(PABOH):*n*(EEDQ) 为 1:2:2。2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯是一种常用的酰胺化反应偶联剂, 优点是对同时还含有羟基侧链的胺类化合物 4-氨基苄醇, 在合成酰胺键的条件下, 不会形成羧酸酯, 无需进行羟基保护。其次, 由于此步反应属于胺的酰化反应, 羧酸化合物 **3** 直接作为酰化试剂较困难。以 2-乙氧基-1(2*H*)-喹啉羧酸乙酯作为偶联剂, 使其与化合物 **3** 先形成一个活化的混合酸酐中间体, 提高反应活性; 接下来生成的活化酸酐中间体再与胺类化合物 4-氨基苄醇反应得到酰胺衍生物(反应机理见图 3)。由此可见, 偶联剂是决定



图式 3 EEDQ 参与羧酸和胺类化合物的酰胺化反应
Scheme 3 Directed amidation of carboxylic acids
with amines using EEDQ

此步反应产率高低的因素。

2.2 不同有机碱对 Fmoc 脱保护反应收率的影响

在化合物 5 的合成过程中,有机碱的种类对反应收率有至关重要的作用。本研究结合文献方法,分别选用吗啉、二环己胺、二乙胺及 DIPEA 作为碱性催化剂。考察不同有机碱对 Fmoc 脱保护反应收率的影响,结果见表 2。

表 2 不同有机碱对水解反应收率的影响

Tab.2 Effect of organic base on the yield of hydrolysis reaction

有机碱种类		收率/%
1	吗啉	90.8
2	二环己胺	90.2
3	二乙胺	95.4
4	DIPEA	42.8

合成方法如 1.2.3 节所示,在反应温度为 25℃、反应时间为 16h 的条件下,改变此步水解反应有机碱的种类,考察了不同种类有机碱对化合物 5 反应收率的影响。由表 2 可知,在使用二乙胺作为碱性催化剂时,收率最高,达 95.4%;当使用吗啉或二环己胺作为碱性催化剂时,反应收率相接近,分别为 90.8%和 90.2%;当使用 DIPEA 时收率较低,仅为 42.8%。分析其原因是 DIPEA 为叔胺且具有较大空间位阻,影响 Fmoc 保护基的脱去。综合考虑生产成本及后处理等因素,故

确定最佳有机碱催化剂为二乙胺。

3 结论

本研究以苄氧羰基-L-缬氨酸琥珀酰亚胺酯(化合物 2)为起始原料,经酯的氨解反应、酰胺化反应、Fmoc 脱保护、酰胺化和酯交换反应步骤得到目标化合物 1。针对原有工艺多次使用高沸点溶剂 N-甲基吡咯烷酮和易制毒化学品乙醚的弊端,将其分别以 DMF 和甲基叔丁基醚替代,有利于进行产品纯化与后处理操作。采用单因素试验对合成工艺中关键步骤的投料比及有机碱种类等重要参数进行优化。开展放大实验,首步投料量达百克级别,并已完成了三批验证性试验,总收率提高至 11.6%,产品纯度达 99.2%。综上所述,优化后的合成工艺路线稳定,原料试剂易得,生产工艺简单、可控,条件温和、环境友好,有较好的工业化实施基础,为后续研发抗体偶联药物提供了重要参考。

参 考 文 献

[1] 丁锦希, 吴逸飞, 李佳明, 等. 中国新药杂志, 2020, 29 (15): 1691~1696.

[2] Scott L J. Drugs, 2017, 77(4): 435~445.

[3] van der Weyden C, Dickinson M, Whisstock J, et al. Expert Rev. Hematol., 2019, 12(1): 5~19.

[4] 苗庆芳, 邵荣光, 甄永苏. 药学报, 2012, 47(10): 1261~1268.

[5] 杜德平, 郑忠辉, 任福龙, 等. 化学试剂, 2015, 37(10): 941~944.

[6] 夏紫金, 王颖钊, 陈俊. 科学通报, 2020, 65(z2): 3091~3099.

[7] Hafeez U, Parakh S, Gan H K, et al. Molecules, 2020, 25 (20): 4764.

[8] Drago J Z, Modi S, Chandarlapaty S. Nat. Rev. Clin. Oncol., 2021, 18(6): 327~344.

[9] Chau C H, Steeg P S, Figg W D. Lancet, 2019, 394 (10200): 793~804.

[10] Tsuchikama K, An Z Q. Protein cell, 2018, 9(1): 33~46.

[11] 季双敏, 王玉珠, 杨进波. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(6): 777~782.

[12] Birrer M J, Moore K N, Betella I, et al. J. Natl. Cancer Inst., 2019, 111(6): 538~549.

[13] Dubowchik G M, Firestone R A, Padilla L, et al. Bioconjugate Chem., 2002, 13(4): 855~869.

[14] 李卓荣, 胡馨月, 苗庆芳, 等. CN: 109200291 A, 2019.

[15] 马涛, 何运强, 孙昱飞, 等. CN: 106380508 A, 2017.