

# 含 Ala-Gln 结构连接子的核酸适体偶联药物的合成、稳定性和细胞增殖抑制研究

孙悦<sup>1</sup>, 常珍<sup>2</sup>, 张旭<sup>2</sup>, 曹爽<sup>2</sup>, 雷蕾<sup>2</sup>, 祝江业<sup>2</sup>, 李文燕<sup>1\*</sup>, 安明<sup>2\*</sup>

1. 河北师范大学 化学与材料科学学院 河北省有机功能分子重点实验室, 河北 石家庄 050024

2. 北京华睿鼎信科技有限公司, 北京 100023

**摘要:** **目的** 合成含有新型二肽连接子的核酸适体偶联药物, 评估其血清稳定性和细胞增殖抑制活性。 **方法** 合成连接子 MC-Ala-Gln-PABC-PNP (**6a**), 并引入 PEG8 得到连接子 MC-PEG8-Ala-Gln-PABC-PNP (**6b**)。将连接子的两端分别与单甲基澳瑞他汀 E、靶向 c-Met 的核酸适配体连接, 合成核酸适体偶联药物。在胎牛血清中研究核酸适体偶联药物的体外血清稳定性, 利用 CCK-8 检测细胞活力。 **结果** 合成的核酸适体偶联药物 **1a**、**1b**、**1a'**、**1b'** 具有相对良好的血清稳定性, 表现出较明显的特异性细胞增殖抑制活性。 **结论** 可以通过改变二肽并同时加入 PEG8 片段来提高核酸适体偶联药物的稳定性和特异性细胞增殖抑制活性。

**关键词:** 核酸适体偶联药物; 连接子; 合成; 稳定性; 细胞增殖

中图分类号: R914; R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)05-1143-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.05.007

## Synthesis, stability, and cell proliferation inhibition of nucleic acid aptamer-drug conjugates containing Ala-Gln structural linkers

SUN Yue<sup>1</sup>, CHANG Zhen<sup>2</sup>, ZHANG Xu<sup>2</sup>, CAO Shuang<sup>2</sup>, LEI Lei<sup>2</sup>, ZHU Jiangye<sup>2</sup>, LI Wenyan<sup>1</sup>, AN Ming<sup>2</sup>

1. Hebei Key Laboratory of Organic Functional Molecules, College of Chemistry and Materials Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

2. Beijing Horicin Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100023, China

**Abstract: Objective** To synthesize nucleic acid aptamer-drug conjugates containing a novel dipeptide linkers and evaluate their serum stability and cell proliferation inhibitory activity. **Methods** The linker MC-Ala-Gln-PABC-PNP (**6a**) was synthesized and PEG8 was introduced to obtain the linker MC-PEG8-Ala-Gln-PABC-PNP (**6b**). The two ends of the linkers were connected to monomethyl auristatin E and a c-Met-targeting aptamer, respectively, to synthesize nucleic acid aptamer coupled drugs. Serum stability *in vitro* of nucleic acid aptamer-drug conjugates in fetal bovine serum were studied, and cell viability was detected using CCK-8 method. **Results** The synthesized nucleic acid aptamer-drug conjugate **1a**, **1b**, **1a'**, and **1b'** had relatively good serum stability and exhibited significant specific cell proliferation inhibition activity. **Conclusion** The stability and specific cell proliferation inhibition activity of nucleic acid aptamer-drug conjugates can be improved by changing dipeptide and simultaneously adding PEG8 fragments.

**Key words:** nucleic acid aptamer-drug conjugates; linker; synthesis; stability; cell proliferation

核酸适体偶联药物 (ApDC) 是由核酸适体、连接子和细胞毒素分子 3 个部分组成的一类新型药物形式, 在治疗癌症领域展现出巨大潜力<sup>[1-2]</sup>。在核酸适体偶联药物中, 连接子作为连接核酸适体和细胞毒素分子的枢纽和桥梁, 是必不可少的重要组成部分。目前连接子的主流研究为基于组织蛋白酶水解

的可裂解型连接子, 其中如缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit)、缬氨酸-丙氨酸 (Val-Ala) 等特定的二肽序列连接子, 当核酸适体偶联药物被肿瘤细胞摄取后, 细胞内的组织蛋白酶会识别连接子上的二肽序列, 并进行切割使连接子断裂, 释放出细胞毒素分子<sup>[3-4]</sup>。尽管上述的二肽连接子被广泛应用于抗体药

收稿日期: 2025-02-19

作者简介: 孙悦, 女, 硕士研究生。E-mail: 15614183900@163.com

\*通信作者: 李文燕 E-mail: wyl8512@hebtu.edu.cn

安明, 男, 博士。E-mail: anminguv@126.com

物偶联物中，但其在啮齿动物血液中的稳定性欠佳，导致药物提前释放，降低药物对肿瘤细胞的特异性，增加了对正常组织的毒性<sup>[5-6]</sup>。因此，提高酶可裂解型连接子在血液循环中的稳定性是一个具有重要意义的研究方向。丙氨酸-组氨酰氨 (Ala-Gln) 作为合成连接子的二肽，其结构灵活，易于进行化学修饰和功能性，能够方便地与不同的药物分子和核酸适体连接，构建多功能药物偶联物；除此，Ala-Gln 是一种天然存在的二肽，具有良好的生物相容性，能够减少免疫原性和毒性。本研究基于可裂解型连接子中二肽序列设计的原则设计并合成了具有新型二肽结构的连接子 MC-Ala-Gln-PABC-PNP (**6a**)。研究表明，当抗体药物偶联物类药物连接子引入 8 个及以上的 PEG 时，能够明显提高抗体药物偶联物类药物的水溶性。鉴于此，实验通过引入 PEG8 对以上新型二肽组合结构进行修饰，得到连接子 MC-PEG8-Ala-Gln-PABC-PNP (**6b**)，并由此合成出含有新型二肽连接子的核酸适体偶联药物 ApDC **1a**、**1a'**、**1b**、**1b'**。通过体外实验评估连接子中二肽序列的变化以及是否引入 PEG8 对核酸适体偶联药物的结合能力、细胞增殖抑制活性和血清稳定性的影响。

## 1 仪器与材料

NanoDrop One 型超微量紫外分光光度计购自美国赛默飞公司；LC-20AR 型高效液相色谱仪、LC-MS 2020 型液质联用质谱购自日本岛津公司；400 MHz 核磁共振分析仪购自美国 Bruker 公司；Amersham ImageQuant 80 型荧光剂化学发光成像系统购自美国 GE Healthcare 公司；synergyH1M 型多功能酶标仪购自美国 Biotek 公司；HY-1000 型倒置显微镜购自宁波舜宇仪器有限公司；DYY-3C 型电泳仪购自北京六一生物科技有限公司；BG-thermoRT 型恒温金属浴购自北京百晶生物技术有限公司。

单甲基澳瑞他汀 E (MMAE) 购自上海皓元医药股份有限公司；L-丙氨酸-L-谷氨酰胺 (Ala-Gln) 购自安徽泽升有限公司；超干二氯甲烷 (DCM)、超干甲醇 (MeOH)、超干 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>)、*N,N*-二异丙基乙胺 (DIEA)、1-羟基苯并三唑 (HOBt)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自北京伊诺凯科技有限公司；1,4-二氧六环 (Dioxane) 购自天津市津东天正精细化学试剂厂；对氨基苯甲醇 (PABA)、2-乙氧基-1-乙氧碳酰

基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司；苄氧羰酰氯 (Fmoc-Cl)、6-马来酰亚胺基己酸 (MC-OSu)、双对硝基苯碳酸酯 (NPC)、二乙胺 (DEA)、磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、乙酸三乙胺 (TEAA) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司；马来酰亚胺-八聚乙二醇-丙烯酸琥珀酰亚胺酯 (Mal-PEG8-NHS ester) 购自上海毕得医药科技股份有限公司；RMPI 1640 培养基、IMDM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、青霉素-链霉素-胎牛血清 (FBS) 均购自美国赛默飞世尔公司；CCK-8 购自北京翱擎生物科技有限公司；尿素、5×Tris-硼酸电泳缓冲液、PBS 购自北京索莱宝科技有限公司；DNA 凝胶加样缓冲液、40% 丙烯酰胺均购自北京得莱德科技有限公司；乙二胺四乙酸二钠购自天津市光复科技发展有限公司；水购自杭州娃哈哈集团有限公司；其余试剂均为市售分子纯、色谱纯。

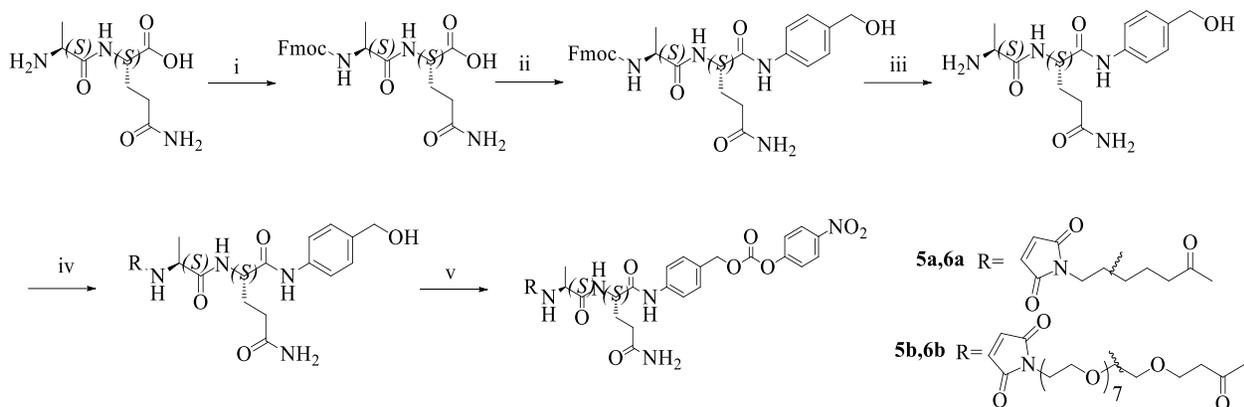
SNU-5、MV-4-11 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；EBC-1 细胞购自博辉生物科技 (广州) 有限公司；MKN-45 细胞购自中国科学院化学研究所；HEK-293A 购自上海细胞库。

## 2 方法与结果

### 2.1 连接子的合成

**2.1.1 合成思路** 采用新型二肽序列 Ala-Gln 为起始原料，经过 Fmoc 基团保护、酰胺缩合反应、脱保护反应、氨解反应和酯交换共 5 步反应，得到连接子 **6a**、**6b**<sup>[7]</sup>。合成路线见图 1。

**2.1.2** {[*(9H*-苄-9-基)甲氧基]羰基}-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺 (**2a**) 的合成 向 250 mL 圆底三口瓶中加入 SM1 (10.0 g, 46.06 mmol, 1.0 eq)，在室温下加入 Dioxane-H<sub>2</sub>O (1 : 1) 200 mL 溶解，向反应体系中分别加入 Fmoc-Cl (15.3 g, 50.69 mmol, 1.1 eq) 和 NaHCO<sub>3</sub> (7.7 g, 92.16 mmol, 2.0 eq)，于室温下搅拌 16 h，LC-MS 监控反应结束后，减压浓缩除去 Dioxane，水相用醋酸乙酯萃取 3 次后，有机相饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥后浓缩。粗产物经过正相纯化[固定相：100 目硅胶，流动相：DCM-MeOH (15 : 1)]，得到白色固体 **2a** 16.4 g，收率：81.3%。ESI-MS *m/z*: 440.1 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.61 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.0, 6.9 Hz, 2H), 7.33 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.31~4.17 (m, 3H), 4.11 (dt, *J* = 21.4, 7.7 Hz, 2H),



i-Fmoc-Cl, NaHCO<sub>3</sub>, Dioxane, H<sub>2</sub>O, 25 °C, 16 h; ii-PABA, EEDQ, DCM, MeOH, 25 °C, 6 h; iii-DEA, DMF, 25 °C, 3 h; iv-(5a) MC-OSu, DMF, 25 °C, 3 h; (5b) Mal-PEG8-NHS ester, DMF, 25 °C, 3 h; v-NPC, DIEA, DMF, 25 °C, 7 h.

图 1 连接子的合成路线图

Fig. 1 Synthetic route of linkers

2.11 (q,  $J = 11.1, 9.9$  Hz, 2H), 1.94 (dq,  $J = 13.9, 7.6$  Hz, 1H), 1.77 (dt,  $J = 14.3, 7.7$  Hz, 1H), 1.22 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H)。

**2.1.3** (9*H*-苄-9-基)甲基((*S*)-1-(((*S*)-5-氨基-1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1,5-二氧杂烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸酯 (**3a**) 的合成 向 500 mL 圆底三口瓶中加入 **2a** (12.0 g, 27.32 mmol, 1.0 eq), 在室温下加入 DCM-MeOH (2 : 1) 360 mL 溶解, 向反应体系中分别加入 EEDQ (13.5 g, 54.64 mmol, 2.0 eq)、PABA (7.5 g, 54.64 mmol, 2.0 eq), 于室温下搅拌 6 h, LC-MS 监控反应结束后, 抽滤, 滤饼用甲基叔丁基醚打浆两次 (500 mL, 2 h), 经过滤、干燥后, 得到白色固体 **3a** 11.1 g, 收率: 74.4%。ESI-MS  $m/z$ : 545.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.94 (s, 1H), 8.15 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.91 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.75 (dd,  $J = 10.4, 7.4$  Hz, 2H), 7.59 (dd,  $J = 11.9, 7.8$  Hz, 3H), 7.48~7.40 (m, 2H), 7.39~7.30 (m, 3H), 7.26 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 5.13 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.46 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.39 (td,  $J = 8.1, 5.4$  Hz, 1H), 4.35~4.19 (m, 3H), 4.20~4.08 (m, 1H), 2.24~2.09 (m, 2H), 2.05~1.81 (m, 2H), 1.27 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H)。

**2.1.4** (*S*)-2-[(*S*)-2-氨基丙酰胺]-N<sub>1</sub>-[4-(羟甲基)苯基]戊二酰胺 (**4a**) 的合成 在 250 mL 圆底烧瓶中, 将 **3a** (9.0 g, 16.53 mmol, 1.0 eq) 溶解于 DMF (100 mL) 中, 向反应体系中滴加 DEA (12.1 g, 165.30 mmol, 10.0 eq), 于室温下搅拌 3 h, LC-MS 监控反应结束后, 经过反相纯化 (固定相: C-18 柱, 流动相: H<sub>2</sub>O-ACN), 得到白色固体 **4a** 4.6 g, 收率:

86.4%。ESI-MS  $m/z$ : 323.2 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 10.07 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.46 (s, 3H), 3.32 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H), 2.14 (ddd,  $J = 8.9, 6.5, 2.1$  Hz, 2H), 1.97 (td,  $J = 8.5, 4.4$  Hz, 1H), 1.91~1.81 (m, 1H), 1.17 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H)。

**2.1.5** (*S*)-2-[(*S*)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己萘酰胺)丙酰胺]-N<sub>1</sub>-[4-(羟甲基)苯基]戊二酰胺 (**5a**) 的合成 在 100 mL 圆底烧瓶中, 将 **4a** (3.8 g, 11.80 mmol, 1.0 eq) 溶解于 DMF (40 mL) 中, 向反应体系后总加入 MC-OSu (4.0 g, 12.98 mmol, 1.1 eq), 于室温下搅拌 3 h, LC-MS 监控反应结束后, 经过正相纯化[固定相: 100 目硅胶, 流动相 DCM - MeOH (20 : 1)], 得到白色固体 **5a** 5.0 g, 收率: 82.3%。ESI-MS  $m/z$ : 516.3 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.84 (s, 1H), 8.12 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 8.08 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.37~7.31 (m, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.02 (s, 2H), 6.85~6.78 (m, 1H), 5.13 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.46 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.35 (td,  $J = 8.1, 5.1$  Hz, 1H), 4.26 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.40 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 2.21~2.12 (m, 4H), 2.05~1.94 (m, 1H), 1.93~1.82 (m, 1H), 1.50 (dq,  $J = 15.5, 7.8$  Hz, 4H), 1.24 (d,  $J = 7.3$  Hz, 4H)。

**2.1.6** 4-[(*S*)-5-氨基-2-[(*S*)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己萘酰胺)丙酰胺基]-5-氧代戊酰胺基]苄基(4-硝基苯基)碳酸酯 (**6a**) 的合成 在 100 mL 三口圆底瓶中, 将 **5a** (5.0 g, 9.70 mmol, 1.0 eq)

溶解于 DMF (50 mL) 中, 向反应体系中加入 NPC (5.9 g, 19.40 mmol, 2.0 eq) 和 DIEA (3.8 g, 29.10 mmol, 3.0 eq), 于室温下搅拌 7 h, LC-MS 监控反应结束后, 经过正相纯化[固定相: 100 目硅胶, 流动相 DCM-MeOH (30 : 1)], 得到白色固体 **6a** 3.9 g, 收率: 59.1%。ESI-MS  $m/z$ : 681.4 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.96 (s, 1H), 8.33~8.28 (m, 2H), 8.13 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.71~7.65 (m, 2H), 7.61~7.54 (m, 2H), 7.45~7.38 (m, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.78 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.33 (td,  $J = 8.1, 5.3$  Hz, 1H), 4.24 (td,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.13 (tq,  $J = 9.0, 4.8, 4.4$  Hz, 4H), 2.03~1.93 (m, 1H), 1.90~1.79 (m, 1H), 1.48 (tt,  $J = 15.7, 7.5$  Hz, 4H), 1.25~1.19 (m, 5H)。

**2.1.7** (S)-2-((S)-1-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-29-甲基-27-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28-氮杂三十二烷-30-氨基)-N<sub>1</sub>-(4-(羟甲基)苯基)戊二酰胺 (**5b**) 的合成 **5b** 合成与 **5a** 相似, 仅原料不同。**4a** 和 Mal-PEG8-NHS ester 在 DMF 中于室温反应生成 **5b**, 收率 80.5%, ESI-MS  $m/z$ : 826.4 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.80 (s, 1H), 8.12 (dd,  $J = 14.4, 7.2$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.24 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.03 (s, 4H), 6.77 (s, 1H), 5.09 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.43 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.36~4.22 (m, 2H), 3.71 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.64~3.50 (m, 30H), 2.92 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.40 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.12 (dq,  $J = 9.6, 5.7$  Hz, 2H), 1.23 (d,  $J = 4.2$  Hz, 3H)。

**2.1.8** 4-((2*S*,3*S*)-32-(3-氨基-3-氧代丙基)-1-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)-29-甲基-27,30-二氧代-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂-28,31-二氮杂三十三烷-33-氨基)苄基 (4-硝基苄基) 碳酸酯 (**6b**) 的合成 **6b** 合成与 **6a** 相似, 仅原料不同。**5b** 与 NPC、DIEA 在 DMF 中于室温反应生成 **6b**, 收率 57.6%, ESI-MS  $m/z$ : 991.4 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.97 (s, 1H), 8.38~8.29 (m, 2H), 8.15 (dd,  $J = 7.2, 3.5$  Hz, 2H), 7.74~7.67 (m, 2H), 7.63~7.55 (m, 2H), 7.47~7.41 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.85~6.77 (m, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.41~4.23 (m, 2H), 3.67~3.56 (m, 3H), 3.54~3.48 (m, 25H), 3.34 (s, 6H), 2.43 (td,  $J = 6.6, 4.7$  Hz, 2H), 2.21~2.12 (m, 2H), 2.01 (dt,  $J = 15.6, 7.2$  Hz, 1H), 1.87 (dt,  $J = 11.5, 7.4$  Hz, 1H), 1.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H)。

## 2.2 核酸适体偶联药物的合成

**2.2.1** 合成思路 将得到的连接子的对硝基苯酯端与细胞毒素分子 MMAE 的仲胺端发生氨解反应, 得到连接子-药物偶联物 **7a**、**7b**; 其连接子-药物偶联物中连接子的马来酰亚胺端与未标记的核酸适体 (A<sub>1</sub>) 巯基端发生迈克尔加成反应, A<sub>1</sub> 为未标记的核酸适体序列, 得到 ApDC **1a**、**1b**, 用于体外细胞增殖抑制活性试验。ApDC **1a'**、**1b'** 为连接子-药物偶联物 **7a**、**7b** 与荧光标记的核酸适体 (A<sub>1-1</sub>) 进行加成反应所得, A<sub>1-1</sub> 为在 24T 碱基上进行 FAM 标记的核酸适体序列, 合成的 ApDC **1a'**、**1b'** 用于体外结合试验与体外稳定性试验。核酸适体药物偶联物的合成路线图见图 2。修饰核酸适体 A<sub>1</sub>、A<sub>1-1</sub> 由苏州贝信生物医药技术有限公司完成。在核酸适体偶联药物的合成过程中, 通过将核酸适体偶联药物样品注入液相色谱-质谱 (LC-MS) 系统, 分离出不同 DAR 的组分, 然后利用质谱检测其相对分子质量, 从而计算出每个 ApDC 分子中连接的药物分子数量, 最终确定 DAR。核酸适体序列见表 1。

**2.2.2** 4-((S)-5-氨基-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1*H*-吡咯-1-基)己萘酰胺)-5-氧代戊酰胺基)苄基 ((S)-1-(((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((S)-2-((1*R*,2*R*)-3-((1*S*,2*R*)-1-羟基-1-苯丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧基丙烷-1-吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代杂基-4-基)(甲基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)(甲基)氨基甲酸酯 (**7a**) 的合成 在 5 mL 样品瓶中, 将 **6a** (200.0 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) 溶解于 DMF (2 mL) 中, 向反应体系中加入 HOBt (35.8 mg, 0.26 mmol, 0.9 eq) 和 MMAE (311.9 mg, 0.44 mmol, 1.5 eq), 于室温下搅拌 16 h, LC-MS 监控反应结束后, 经过反相纯化[固定相: C<sub>18</sub> 柱, 流动相: H<sub>2</sub>O (50 mmol/L TEAA) - ACN], 得到白色固体 **7a** 149.7 mg, 收率: 72.2%。ESI-MS  $m/z$ : 1 259.9 [M+H]<sup>+</sup>。

**2.2.3** ApDC **1a** 的合成 在 1 mL 样品瓶中, 将 Aptamer (10 OD, 18.6 nmol, 1.0 eq) 溶解于 40  $\mu$ L PBS 中, 向反应体系中加入 20 mmol/L **7a**-DMSO 溶液 (5.4  $\mu$ L, 186 nmol, 10.0 eq), 振摇 2 h 后, 用纯化水稀释, 进样体积约为 500  $\mu$ L, 使溶液中有有机溶剂 DMSO 的占比在 15% 以下, 采用 HPLC 纯化[固定相: C<sub>18</sub> 柱, 流动相: H<sub>2</sub>O (50 mmol/L TEAA) - ACN], 经低温浓缩离心机浓缩后, 得到白色固体 ApDC **1a** 10.1  $\mu$ g, 收率: 43.9%, ESI-MS: 20 808.0。

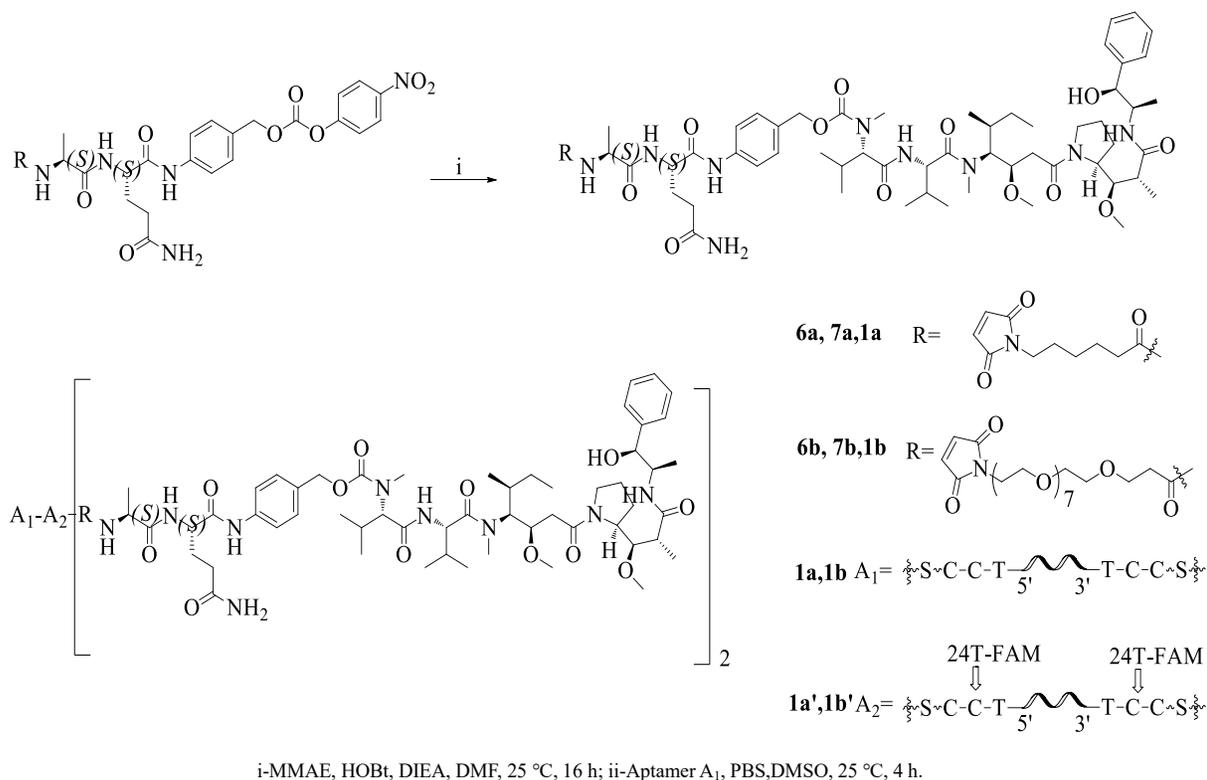


图 2 核酸适体偶联药物的合成路线图

Fig. 2 Synthetic route of ApDC

表 1 核酸适体序列

Table 1 Aptamer sequences

名称	编号	序列 (5'-3')
HF3-58-SH	$A_1$	Thiol Modifier C6-TTGGAGCAGCGTGGAGGATATGCTTCCGACCGTGTTCGTTT GTTATAACGCTGCTCC-Thiol Modifier C6
HF3-58-24T-FAM-SH	$A_{1-1}$	Thiol Modifier C6-TTGGAGCAGCGTGGAGGATATGC/int-6-FAM-d T/TCCGACCGTGTTCGTTTGTATAACGCTGCTCC-Thiol Modifier C6

**7b** 和 ApDC **1b** 的合成与 **7a**、ApDC **1a** 相似, 仅原料不同。**6b** 和 MMAE 反应生成 **7b**, 收率 68.7%, ESI-MS  $m/z$ : 1 569.90  $[M+H]^+$ ; **7b** 与未标记的核酸适体 ( $A_1$ ) 反应生成 ApDC **1b**: ESI-MS 21 425.0。

ApDC **1a'**、ApDC **1b'** 的合成与 ApDC **1a**、ApDC **1b** 相似, 仅原料核酸适体不同, **7a** 和 **7b** 分别与带荧光标记的核酸适体 ( $A_{1-1}$ ) 反应, 得到相应的 ApDC **1a'**: ESI-MS: 21 317.1、ApDC **1b'**: ESI-MS: 21 938.0。

### 2.3 体外结合试验

在不同浓度梯度下, 选取 c-Met 高表达细胞系人胃癌细胞 (SNU-5)、人肺腺癌细胞 (EBC-1)、人胃癌细胞 (MKN-45) 和 c-Met 低表达对照细胞系人急性单核细胞白血病细胞 (MV-4-11)、人胚胎肾细胞 (HEK-293A) 对合成的 ApDC **1a'**、**1b'** 采用流式

细胞术法检测结合阳性率, 结果见图 3。对于 c-Met 高表达细胞系 EBC-1、SNU-5、MKN-45, **1a'** 的  $EC_{50}$  值分别为 11.21、17.35、20.07 nmol/L; **1b'** 的  $EC_{50}$  值分别为 7.267、23.23、26.79 nmol/L, **1a'**、**1b'** 的  $EC_{50}$  值差异在一个数量级内, 结合能力相当。对于 c-Met 低表达的细胞 MV-4-11, **1a'** 的  $EC_{50}$  值为 2 319 nmol/L; 对于 c-Met 低表达的细胞 HEK-293A, **1b'** 的  $EC_{50}$  值为 46.03 nmol/L, **1a'**、**1b'** 均表现出较弱的结合能力。因此, 新二肽序列的核酸适体偶联药物仍具备 c-Met 靶点特异性结合能力。

### 2.4 体外稳定性试验

将 ApDC **1a'**、**1b'** 置于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C 恒温水浴孵育, 在 0、1、2、4、8、12、24、48、72 h 不同时间点取样, 装入 10%

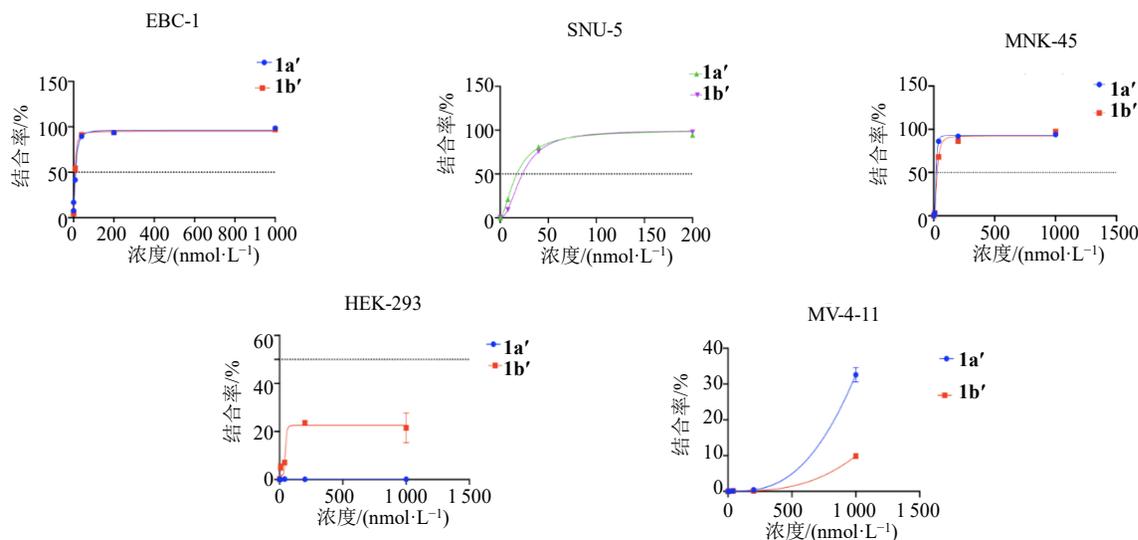


图 3 核酸适体偶联药物 1a'、1b'分别与 EBC-1、SNU-5、MKN-45、HEK-293A、MV-4-11 的结合率  
Fig. 3 Binding rate between ApDC (1a' and 1b') and EBC-1, SNU-5, MKN-45 HEK-293A, and MV-4-11

尿素 - 聚丙烯酰胺胶, 在 200 V 电压和 1×TBE 缓冲液中运行 1.5 h。电泳结束后, 凝胶成像仪拍照观察, 采用 Image J 软件统计灰度值<sup>[8-10]</sup>。ApDC 1a' 在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基孵育 72 h 的稳定性结果见图 4。结果表明, ApDC 1a' 主条带灰度值随着孵育时间的延长呈现递减趋势, 副条带 band 1、band 2、band 3 的灰度值随着孵育时间的延长呈现递增趋势。孵育 72 h 后, ApDC 1a' 主条带留存约 40%, 表明 ApDC 1a' 在 72 h 内发生降解, 但仍具有

相对良好的血清稳定性。ApDC 1b' 在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基孵育 72 h 的稳定性结果见图 4。通过 Image J 软件对其灰度值进行统计分析, 结果表明, ApDC 1b' 主条带灰度值随着孵育时间的延长呈现递减趋势, 副条带 band 1、band 2、band 3 灰度值随着孵育时间的延长呈现递增趋势。孵育 72 h 后, ApDC 1b' 主条带留存约 80%。可见 ApDC 1b' 在 72 h 内发生降解的比例较小, 具有非常良好的血清稳定性。

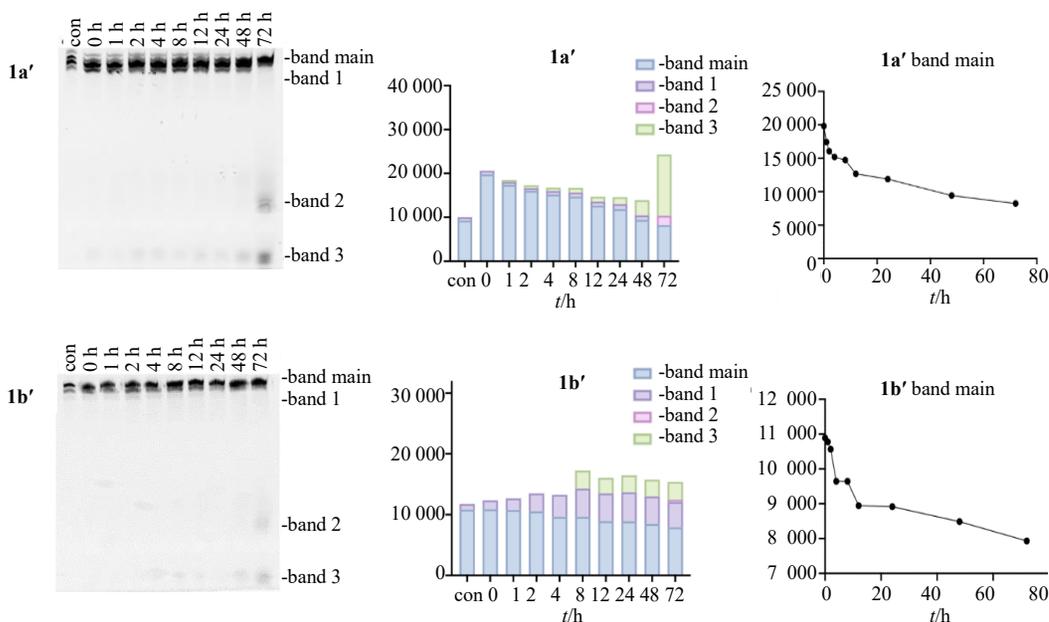


图 4 ApDC 1a'、1b'在含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中的凝胶电泳  
Fig. 4 Gel electrophoresis of ApDC 1a' and 1b' in RPMI 1640 medium containing 10% FBS

## 2.5 体外细胞增殖抑制活性实验

在不同浓度梯度下, 选取 c-Met 高表达细胞系和 c-Met 低表达细胞系与 ApDC **1a**、**1b** 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 72 h, 进行细胞增殖抑制活性实验, 采用 CCK-8 检测细胞活力, 计算细胞增殖抑制率, 通过非线性回归拟合得出 IC<sub>50</sub> 值, 结果见图 5。ApDC **1a** 对 c-Met 高表达细胞系 EBC-1、SNU-5 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 7.755、18.850 nmol/L, 表现出较强的细胞增殖抑制活性, 且其 IC<sub>50</sub> 值均低于药物连接子 **7a**, 表现出较明显特异性细胞增殖抑制活性; 而对

c-Met 低表达细胞 HEK-293A 的 IC<sub>50</sub> 值为 62.17 nmol/L, 其低于药物连接子 **7a**, 所有组的细胞增殖抑制活性均远低于 MMAE 组。**1b** 对 c-Met 高表达细胞系 EBC-1、SNU-5 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 12.72、15.66 nmol/L, 表现出较强细胞增殖抑制活性, 且其 IC<sub>50</sub> 值均低于药物连接子 **7b**, 而对 c-Met 低表达细胞 HEK-293A 的 IC<sub>50</sub> 值为 62.95 nmol/L, 其低于药物连接子 **7b**, 所有组的细胞增殖抑制活性均远低于 MMAE 组。综上所述, 新二肽序列的 ApDC **1a**、**1b** 均表现出较明显的特异性细胞增殖抑制活性。

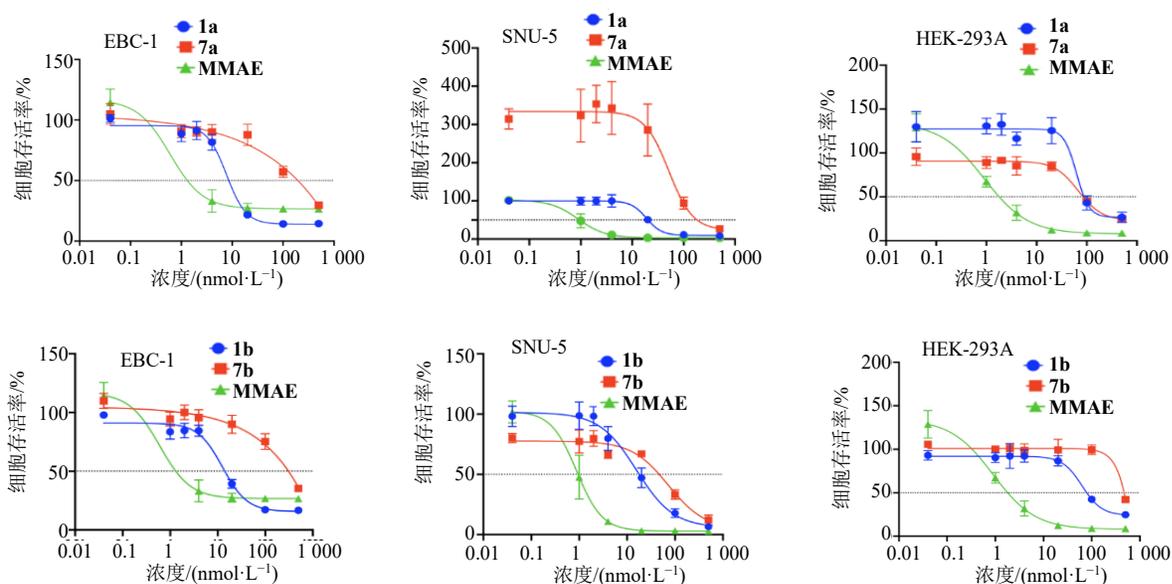


图 5 ApDC **1a**、**7a**、**1b**、**7b**、MMAE 与细胞孵育 72 h 后的 IC<sub>50</sub> 拟合曲线

Fig. 5 IC<sub>50</sub> fitting curve of ApDC **1a**, **7a**, **1b**, **7b**, MMAE after 72 h incubation with cells

## 3 讨论

在合成连接子过程中, 实验对反应条件进行了摸索。在 Ala-Gln 与 PABA 发生缩合过程中, Ala-Gln 中的氨基和羧基会发生自身缩合。因此使用 Fmoc-Cl 将 Ala-Gln 中的氨基保护, 再与 PABA 发生缩合反应, 提高了合成收率。体外结合试验、体外细胞增殖抑制活性试验的结果表明, 合成的具有新二肽序列的连接子对核酸适体偶联药物的 c-Met 靶点特异性结合能力、c-Met 高表达细胞系特异性增殖抑制活性无明显影响, 合成的核酸适体偶联药物仍具有非常好的 c-Met 靶点特异性结合能力和 c-Met 高表达细胞系特异性增殖抑制活性。体外稳定性试验结果表明, 连接子中二肽序列的变化对核酸适体偶联药物的血清稳定性无明显的影响, 但当连接子中引入 PEG8 后, 孵育 72 h 后核酸适体偶

联药物主条带的剩余率从 40% 提高到了 80%。在相同实验条件下, **1a'**、**1b'** 的差异仅表现在是否具有 PEG8, 可见 **1a'**、**1b'** 稳定性上的差异就是因为 PEG8 的引入。然而其他因素如连接子的化学结构、药物与适体的结合方式以及血清中蛋白酶的种类和质量浓度也可能影响核酸适体偶联药物的稳定性。但 PEG8 的引入是主要因素, 且其他因素也不容忽视。

基于以上结果, 可以通过改变二肽并同时加入 PEG8 片段来提高核酸适体偶联药物的稳定性。在药物研发领域, 这种稳定性的提高有望使核酸适体偶联药物在体内的作用时间延长, 从而减少给药次数, 提高患者的依从性, 同时也可能降低药物的不良反应。在生物医学工程方面, 可以利用其稳定性更好地构建生物传感器或靶向运输载体, 实现对特定细胞或组织更精准、高效的检测和治疗干预。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 181-202.
- [2] Nimjee M S, White R R, Becker C R, *et al.* Aptamers as therapeutics [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57(1): 61-79.
- [3] Jiang F, Liu B, Lu J, *et al.* Progress and challenges in developing aptamer-functionalized targeted drug delivery systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 23784-23822.
- [4] Asuthkar S, Stepanova V, Lebedeva T, *et al.* Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(17): 2620-2632.
- [5] Bargh D J, Walsh J S, Isidro-Llobet A, *et al.* Sulfatase-cleavable linkers for antibody-drug conjugates [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(9): 2375-2380.
- [6] Mondal D, Ford J, Pinney G K. Improved methodology for the synthesis of a cathepsin B cleavable dipeptide linker, widely used in antibody-drug conjugate research [J]. *Tetrahedron Lett*, 2018, 59(40): 3594-3599.
- [7] 杨柳. 抗体偶联药物连接器 Mc-Val-Cit-PABC-PNP 的合成与优化 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [8] Xiong H, Yan J, Cai S, *et al.* Aptamer-pyropheophorbide a conjugates with tumor spheroid targeting and penetration abilities for photodynamic therapy [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(8): 2882-2890.
- [9] Yeon H J, Hyeri K, Myunghwa L, *et al.* Development of HER2-specific aptamer-drug conjugate for breast cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9764.
- [10] Adam P, Karen W, Krishan K. Comparison of *in vitro* mouse serum stability of Ga-68-labeled PSMA targeting conjugates of acyclic and macrocyclic chelators [J]. *J Nucl Med*, 2020, 61(Sup1): 1.

[责任编辑 解学星]