



# SINTESI DI PAYLOAD-LINKER ALTAMENTE ATTIVI

**Gli ADCs rappresentano una delle classi terapeutiche più emergenti nell'ambito anti-tumorale. La produzione (GMP) della loro porzione altamente attiva definita Payload-Linker (PL) richiede rigidi protocolli di contenimento. Inoltre, la complessità strutturale del PL rende necessari approcci sintetici e protocolli di purificazione non triviali, ad esempio cromatografie, SPE e liofilizzazioni.**

## Cosa sono i Payload-Linker?

I *Payload-Linker* (PL) sono una porzione, solitamente ripetuta, degli *Antibody-Drug Conjugate* (ADC), ossia anticorpi altamente ingegnerizzati in grado di veicolare delle citotossine (*payload*) presso una cellula o un tessuto target [1]. Comunemente, l'ADC viene internalizzato nella cellula a seguito dell'interazione con un antigene. Nella cellula, viene promosso il distacco del payload dall'ADC così da confinare l'attività citotossica all'interno della cellula neoplastica [2].

I payload più comuni e/o già presenti in ADC commerciali sono ascrivibili all'interno delle seguenti classi: auristatine, maitansinoidi, tubulolisine, ca-

licheamicine, duocarmicine, exatecani, pirrolo-benzodiazepine. Queste strutture sono in grado di promuovere l'inibizione della polimerizzazione della tubulina o di provocare danni irreversibili alla struttura del DNA con potenze che, nei casi più eclatanti, raggiungono valori sub-picomolari [3].

D'altra parte, i *linker* costituiscono un sottoinsieme molto più eterogeneo dei payload in termini strutturali, sono generalmente atossici e costituiscono l'elemento di connessione tra l'anticorpo e il payload [4].

Il processo produttivo di un ADC prevede due fasi distinte che convergono nella coniugazione tra PL e anticorpo: la sintesi dell'anticorpo e la sintesi del PL [5].

## Come si manipola un composto High Potent?

Come anticipato, le tossine che compongono il PL e i loro derivati inclusi gli stessi ADC sono composti altamente attivi (*High Potent*). In quanto tali, sono associati a specifiche bande di esposizione occupazionale (Occupational Exposure Band, OEB) [6]. Per OEB si intendono range di concentrazioni ( $\mu\text{g}$  o  $\text{ng}/\text{m}^3$ ) dedotte da studi *on paper*, *in vitro*, *in vivo* e *in silico* all'interno delle quali inserire prodotti farmaceutici e loro intermedi sulla base della loro tossicità. L'OEB è uno strumento indispensabile al *Risk Assessment* nell'ambito di una programmazione produttiva, in quanto aiuta a stabilire quali siano i protocolli operativi opportuni per manipolare un certo composto [7].

Passando da una banda all'altra, la manipolazione dei composti viene via via trattata con protocolli

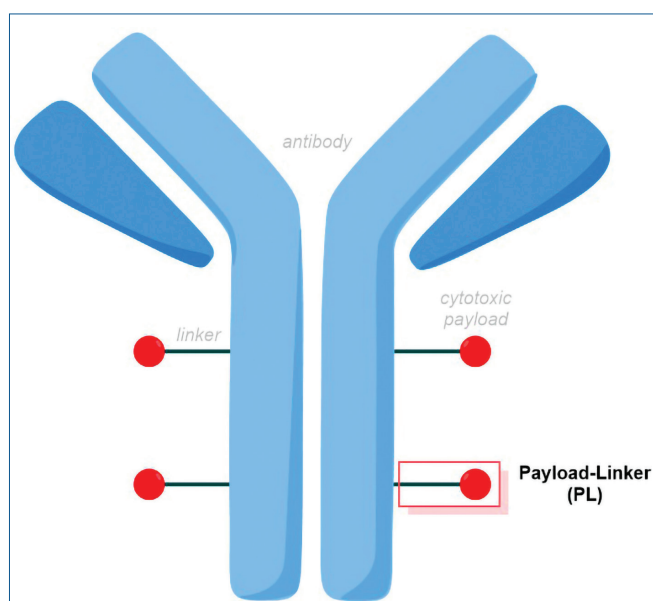


Fig. 1 - Struttura generica di un ADC

A Lorenzo Pontini è stato conferito il premio "Premio alla Ricerca Junior in Chimica Organica per lo Sviluppo di Processi e Prodotti nell'Industria 2025" dalla Divisione di Chimica Organica della SCI.



sempre più rigidi supportati da valutazioni sperimentali del contenimento dell'*equipment* e dell'operatività prevista. Comunemente, si ricorre ai cosiddetti esami SMEPAC (*Standardized Measurement of Equipment Particulate Containment*) per valutare la capacità contenitiva di un particolare set-up operativo.

Nella pratica, i composti altamente attivi vengono manipolati, a livello di ricerca e sviluppo, controllo qualità e produzione, in camere contenitive in acciaio a pressione negativa di azoto (gli *isolatori*) in cui vengono condotti protocolli di pulizia e lavaggio meticolosi.

In Procos SpA, i protocolli e i sistemi di contenimento permettono la manipolazione di composti altamente attivi ben al di sotto del limite di esposizione occupazionale (*Occupational Exposure Limit, OEL*) di  $10 \text{ ng/m}^3$ .

#### Quali sono le sfide sintetiche?

I PL sono solitamente associati a strutture che superano comunemente il kDa, sono dotati di numerosissimi centri chirali, gruppi funzionali labili o reattivi, solubilità limitatissime e scarsa tendenza alla cristallizzazione. Tutto ciò si traduce in sforzi sintetici e tecnologici senza precedenti.



Fig. 3 - Modulo produttivo High Potent GMP in Procos SpA

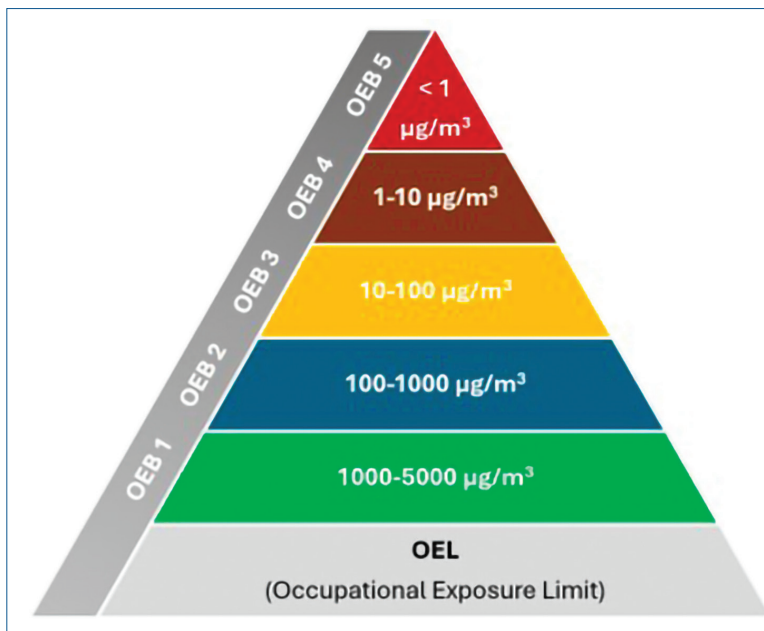


Fig. 2 - Esempio di sistema di classificazione OEB a cinque bande

La sintesi del PL solitamente prevede lo step convergente di *coupling* tra il linker e il payload. Questo è solitamente l'ultimo step della sequenza e viene condotto in presenza di moltissime funzionalità de-protette e reattive.

Il *coupling* può fornire miscele complesse (<50% di purezza) e la scarsissima solubilità dei PL, la loro labilità termica e la forte tendenza degli stessi a separarsi come oli (*oiling out*) rende la loro purificazione lo step più sfidante in assoluto.

D'altra parte, i due sintoni sono prodotti per mezzo di lunghe sequenze sintetiche e nel caso della tossina sono comuni manipolazioni semisintetiche di derivati di fermentazione.

#### Come si purifica un Payload-Linker?

Come accennato, molti intermedi o il PL non sono isolabili come solidi per insolubilizzazione o cristallizzazione e alcuni approcci non canonici, come l'adsorbimento su supporti, stanno prendendo piede [8]. Inoltre, nella produzione di PL, è comune includere una o più purificazioni cromatografiche, come nel caso di un derivato auristatnico recentemente pubblicato [9].



Fig. 4 - Alcune tecniche impiegate per la purificazione e l'isolamento di PL in Procos SpA: la liofilizzazione e la nanofiltrazione

La purificazione cromatografica, spesso in fase inversa, richiede un lavoro di sviluppo dedicato. Uno dei metodi più efficienti per ottimizzare questo step è quello di impiegare un approccio *bottom-up* e una miniaturizzazione del problema su set up analitici. A seguito di questa prima fase, l'attività di sviluppo passa su sistemi modello preparativi. L'utilizzo di additivi acidi nelle fasi mobili è solitamente indispensabile per migliorare la prestazione della purificazione, incrementare la solubilità e la stabilità del prodotto purificato nelle sue frazioni.

Per isolare il prodotto dalle sue frazioni purificate, a volte basta effettuare estrazioni con solventi organici, evitando concentrazioni per distillazione. La distillazione, infatti, è solitamente critica poiché espone il prodotto a stress termico. Delle valide alternative sono la nanofiltrazione e l'estrazione in fase solida (*Solid-Phase Extraction*, SPE).

Quando il prodotto non può essere recuperato dalla sua soluzione concentrata per estrazione/insolubilizzazione/cristallizzazione, questa può essere congelata e liofilizzata.

In conclusione, l'approccio verso sintesi, purificazione e isolamento di PL può richiedere la messa a punto di tecniche poco comuni. Il chimico di processo deve orientarsi tra svariati protocolli modellati *ad hoc* su queste molecole all'interno di uno spazio fisico ad elevato contenimento, il quale rende la manipolazione di questi prodotti altamente attivi tanto sfidante quanto entusiasmante.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] P.G. Bulger *et al.*, *OPRD*, 2023, **27**(7), 1248.
- [2] Z. Fu *et al.*, *Sig. Transduct. Target Ther.*, 2022, **7**, 93.
- [3] P. Gogia *et al.*, *Cancers*, 2023, **15**, 3886.
- [4] R. Sheyi *et al.*, *Pharmaceutics*, 2022, **14**, 396.
- [5] M. Li *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 2024, **41**, 419.
- [6] EMA, Guideline on setting health-based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities, 2012.
- [7] ISPE, Good Practice Guide: Containment for Potent Compounds, 2022.
- [8] P.J. Moon *et al.*, *Org. Lett.*, 2025, **27**, 6127.
- [9] a) N. Porter *et al.*, *OPRD*, 2024, **28**(10), 3772;  
b) K. Payne *et al.*, *OPRD*, 2024, **28**(10), 3780.

### Synthesis of High Potent Payload-Linkers

ADCs represent one of the most emerging therapeutic tools in the anti-tumour treatment landscape. The (GMP) manufacturing of their high potent portion termed Payload-Linker (PL) requires stringent containment protocols. Furthermore, the structural complexity of PLs leads to the use of non-trivial synthetic and purification protocols, e.g., chromatographic purifications, SPE and lyophilization.