



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102597773 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080041653. 4

(72) 发明人 M·史密斯 S·凯迪克 J·贝克

(22) 申请日 2010. 08. 09

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(30) 优先权数据

0913967. 6 2009. 08. 10 GB

0913965. 0 2009. 08. 10 GB

0914321. 5 2009. 08. 14 GB

代理人 丁香兰 庞东成

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 19

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/58 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/001499 2010. 08. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02011/018611 EN 2011. 02. 17

(71) 申请人 UCL 商业有限公司

地址 英国伦敦

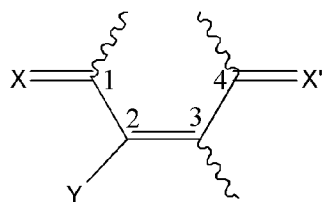
权利要求书 10 页 说明书 123 页 附图 7 页

(54) 发明名称

功能性分子的可逆的共价连接

(57) 摘要

本发明涉及一种包含式 (I) 的结构体的化合物作为连接用试剂的应用, 所述连接用试剂将包含式 F_1 的第一功能性结构体的式 R_1-H 的化合物连接至式 F_2 的第二功能性结构体,

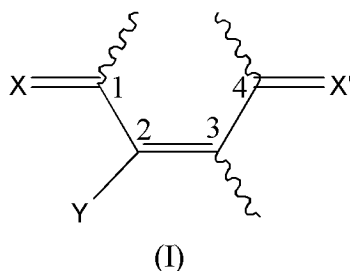


其中 X、X'、Y、 R_1 、 F_1 和

(I)

F_2 如本文中所限定。本发明还提供相关的方法和产物。本发明可用于生成功能性的偶联化合物, 特别是其中至少一个组成分子具有硫醇基的偶联物。

1. 一种包含式 (I) 的结构体的化合物作为连接用试剂的应用, 所述连接用试剂将包含式 F_1 的第一功能性结构体的式 R_1-H 的化合物连接至式 F_2 的第二功能性结构体,



其中:

-X 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基;

-Y 为亲电子的离去基团;

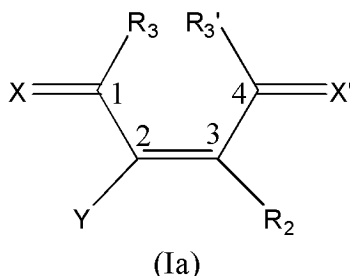
- R_1 是式 $-F_1$ 或 $-S-L-F_1$ 的基团, 其中 L 是接头基团, 并且 R_1-H 包含至少第一 SH 基团;

和

- 所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体相同或不同, 并各自选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA;

其中, 经由所述式 R_1-H 的化合物中的第一 SH 基团对所述式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而使基团 R_1 与所述式 (I) 的结构体连接, 从而使位于所述 2- 位的基团 Y 被所述基团 R_1 替代。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其中, 所述包含式 (I) 的结构体的化合物是式 (Ia) 的化合物,



其中:

-X 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基;

-Y 为亲电子的离去基团;

-:

- R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团; 或

- R_3 和 R_3' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33'})$ 的基团, 其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团; 或

- R_3 和 R_3' 共同形成式 $-N(R_{33'})-N(R_{33'})-$ 的基团, 其中各个 $R_{33'}$ 相同或不同, 并表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团;

- R_2 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团;

- 式 E 和 Y 的各基团相同或不同,并表示亲电子的离去基团 ;
- 式 Nu 的各基团相同或不同,并表示选自 -OH、-SH、-NH₂ 和 -NH(C₁₋₆ 烷基) 的亲核试剂 ;

- 式 L 的各基团相同或不同,并表示接头基团 ;

- 式 Z 的各基团相同或不同,并表示与式 L 的基团连接的反应性基团,所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应,从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连 ;

-n 为 1、2 或 3 ;和

- 式 IG 的各基团相同或不同,并表示作为 C₁₋₂₀ 烷基、C₂₋₂₀ 烯基或 C₂₋₂₀ 炔基的结构体,其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基,并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C₆₋₁₀ 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、C₃₋₇ 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 -CH₂- 基团由选自 -O-、-S-、-S-S-、-C(O)- 和 H-N(C₁₋₆ 烷基)- 的基团替代,其中 :

(i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷硫基、-N(C₁₋₆ 烷基) (C₁₋₆ 烷基)、硝基和磺酸基的取代基 ;和

(ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 -C(O)- 基团替代。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用,其中,Y 是卤素原子或三氟甲磺酸基、甲苯磺酸基、甲磺酸基、N- 羟基琥珀酰亚胺基、N- 羟基磺基琥珀酰亚胺基、C₁₋₆ 烷硫基、5 元至 10 元杂环硫醇、C₆₋₁₀ 芳基硫醇、C₃₋₇ 碳环硫醇、-OC(O)CH₃、-OC(O)CF₃、苯氧基、-NR_xR_yR_z⁺ 或 -PR_xR_yR_z⁺ 基团,其中,R_x、R_y、和 R_z 相同或不同,并选自氢原子和 C₁₋₆ 烷基和苯基。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的应用,其中,E 是卤素原子或 C₁₋₆ 烷氧基、硫醇、C₁₋₆ 烷硫基、-N(C₁₋₆ 烷基) (C₁₋₆ 烷基)、三氟甲磺酸基、甲苯磺酸基、甲磺酸基、N- 羟基琥珀酰亚胺基、N- 羟基磺基琥珀酰亚胺基、咪唑基、苯氧基或硝基苯氧基。

5. 如前述权利要求中任一项所述的应用,其中,L 表示作为 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基或 C₂₋₂₀ 亚炔基的结构体,其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基,并且所述取代基中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C₆₋₁₀ 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、C₃₋₇ 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 -CH₂- 基团由选自 -O-、-S-、-S-S-、-C(O)- 和 -N(C₁₋₆ 烷基)- 的基团替代,其中 :

(i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷硫基、-N(C₁₋₆ 烷基) (C₁₋₆ 烷基)、硝基和磺酸基的取代基 ;和

(ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 -C(O)- 基团替代。

6. 如前述权利要求中任一项所述的应用,其中,L 表示作为不具有取代基的 C₁₋₆ 亚烷基、C₂₋₆ 亚烯基或 C₂₋₆ 亚炔基的结构体,所述结构体中 (a) 0 或 1 个碳原子由选自亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、C₅₋₆ 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基的基团替代,其中所述亚苯基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或两个选自卤素原子和 C₁₋₄ 烷基和 C₁₋₄ 烷氧基的取代基,和 (b) 0、1 或 2 个 -CH₂- 基团由选自 -O-、-S- 或 -C(O)- 基团的基团替代。

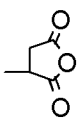
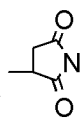
7. 如权利要求 2 ~ 6 中任一项所述的应用,其中 Z 表示 :

- (a) 式 $-LG$ 、 $-C(O)-LG$ 、 $-C(S)-LG$ 或 $-C(NH)-LG$ 的基团, 其中 LG 是亲电子的离去基团;
- (b) 选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 和 $-C(O)NHNH_2$ 基团的亲核试剂 Nu' ;
- (c) 环状结构体 Cyc , 其能够与亲核试剂进行开环亲电子反应;
- (d) 式 $-S(O_2)(Hal)$ 的基团, 其中 Hal 是卤素原子;
- (e) 式 $-N=C=O$ 或 $-N=C=S$ 的基团;
- (f) 式 $-S-S(IG')$ 的基团, 其中 IG' 表示如权利要求 2 中限定的式 IG 的基团;
- (g) 基团 AH , 其是取代有一个或多个卤素原子的 C_{6-10} 芳基;
- (h) 能够通过暴露在紫外光下而活化的光反应性基团;
- (i) 式 $-C(O)H$ 或 $-C(O)(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的基团;
- (j) 马来酰亚胺基团;
- (k) 式 $-C(O)CHCH_2$ 的基团;
- (l) 式 $-C(O)C(N_2)H$ 或 $-PhN_2^+$ 的基团, 其中 Ph 表示苯基; 或
- (m) 环氧化物基团。

8. 如权利要求 7 所述的应用, 其中:

$-LG$ 选自卤素原子和 $-O(IG')$ 、 $-SH$ 、 $-S(IG')$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(IG')$ 、 $-N(IG')$ (IG'')、 $-N_3$ 、三氟甲磺酸基、甲苯磺酸基、甲磺酸基、 N -羟基琥珀酰亚胺基、 N -羟基磺基琥珀酰亚胺基、咪唑基和叠氮化物基团, 其中, IG' 和 IG'' 相同或不同, 并各自表示如权利要求 2 中限定的式 IG 的基团; 和 / 或

$-Nu'$ 选自 $-OH$ 、 $-SH$ 和 $-NH_2$ 基团; 和 / 或

$-Cyc$ 选自基团  和  和 / 或

$-Hal$ 是氯原子; 和 / 或

$-AH$ 是取代有至少一个氟原子的苯基; 和 / 或

- 所述光反应性基团选自:

(a) C_{6-10} 芳基, 所述 C_{6-10} 芳基取代有至少一个式 $-N_3$ 的基团并可选地还取代有一个或多个卤素原子;

(b) 苯甲酮基团;

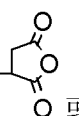
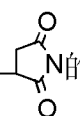
(c) 式 $-C(O)C(N_2)CF_3$ 的基团; 和

(d) 式 $-PhC(N_2)CF_3$ 的基团, 其中 Ph 表示苯基。

9. 如权利要求 2 ~ 8 中任一项所述的应用, 其中, Z 选自:

(a) 式 $-LG$ 、 $-C(O)-LG$ 和 $-C(S)-LG$ 的基团, 其中 LG 选自卤素原子和 $-O(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-SH$ 、 $-S(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、三氟甲磺酸基、甲苯磺酸基、甲磺酸基、 N -羟基琥珀酰亚胺基和 N -羟基磺基琥珀酰亚胺基;

(b) 式 $-OH$ 、 $-SH$ 和 $-NH_2$ 的基团;

(c) 式  或  的基团; 和

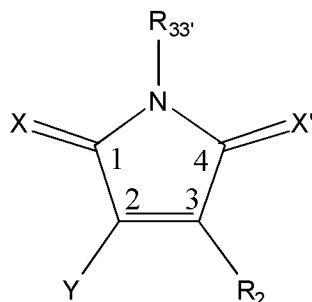
(d) 马来酰亚胺基团。

10. 如权利要求 2 ~ 9 中任一项所述的应用, 其中 IG 表示作为不具有取代基的 C_{1-6} 烷

基、 C_{2-6} 烯基或 C_{2-6} 炔基的结构体,所述结构体中 (a) 0 或 1 个碳原子由选自亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、 C_{5-6} 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基的基团替代,其中所述亚苯基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或两个选自卤素原子和 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基的取代基,和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-C(O)-$ 基团的基团替代。

11. 如权利要求 2 ~ 10 中任一项所述的应用,其中, n 为 1。

12. 如权利要求 2 ~ 11 中任一项所述的应用,其中,所述式 (Ia) 的化合物是式 (Ib) 的化合物,



(Ib)

其中, X 、 X' 、 Y 、 R_2 和 $R_{33'}$ 均如权利要求 2 ~ 11 中任一项所限定。

13. 如权利要求 12 所述的应用,其中:

$-X$ 和 X' 各自表示氧原子;

$-R_{33'}$ 表示氢原子或 C_{1-6} 烷基;

$-Y$ 表示卤素原子;和

$-R_2$ 表示氢或卤素原子或 C_{1-6} 烷基。

14. 如前述权利要求中任一项所述的应用,其中:

$-R_1$ 是式 $-F_1$ 的基团;

$-F_1$ 是包含至少第一半胱氨酸残基的肽或蛋白质;和

- 经由所述第一半胱氨酸残基的硫醇基对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击,而使所述基团 R_1 与所述式 (I) 的结构体连接,从而使基团 Y 由所述基团 R_1 中的所述第一半胱氨酸残基中的硫醇基替代。

15. 如权利要求 14 所述的应用,其中:

- 包含式 (I) 的结构体的化合物是如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定的式 (Ia) 的化合物;

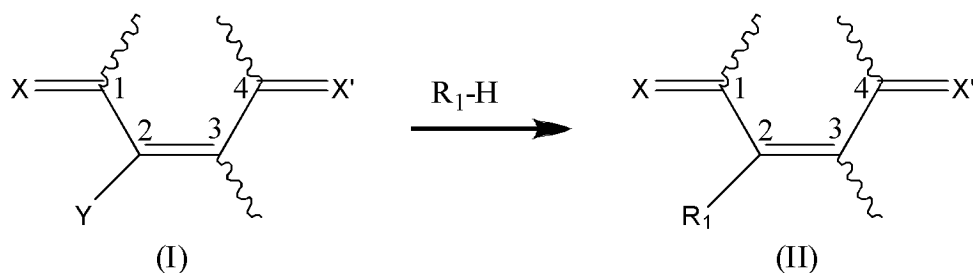
$-R_2$ 是式 Y 的基团;

$-R_1$ 还包含至少第二半胱氨酸残基;和

- 经由所述第二半胱氨酸残基的硫醇基对式 (Ia) 的结构体的 3- 位的亲核攻击,而使基团 R_1 进一步与式 (Ia) 的结构体连接,从而使基团 R_2 由所述基团 R_1 中的所述第二半胱氨酸残基中的硫醇基替代。

16. 一种用于产生偶联物的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 使包含式 (I) 的结构体的化合物与式 R_1-H 的化合物反应,由此制得包含式 (II) 的结构体的化合物,



(ii) 随后使式 F_2 的结构体与所述式 (II) 的结构体连接；

其中，步骤 (i) 涉及经由式 R_1-H 的化合物中的第一 SH 基团对所述式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而连接基团 R_1 ，从而使所述 2- 位的基团 Y 被所述基团 R_1 替代，

而且其中，X、X'、Y、 R_1 、 F_2 和所述包含式 (I) 的结构体的化合物均如权利要求 1 ~ 15 中任一项所限定。

17. 如权利要求 16 所述的方法，所述方法包括经由 F_2 对式 (II) 的 2- 位和 3- 位之间的碳碳双键的亲电子加成反应而使 F_2 连接至所述式 (II) 的结构体。

18. 如权利要求 16 所述的方法，其中，所述包含式 (I) 的结构体的化合物是如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定的式 (Ia) 的化合物，并且：

(a) 当 R_3 和 R_3' 共同形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团时， $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团，并且所述方法包括经由 F_2 与 (i) 式 $-N(R_{33'})$ 的结构体的氮原子或 (ii) 所述式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团之间的反应而使 F_2 连接至所述式 (II) 的结构体；或

(b) 当 R_3 和 R_3' 未共同形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团时， R_3 和 R_3' 中的至少一个表示式 E、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团，并且所述方法包括经由 F_2 与所述式 E、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团之间的反应而使 F_2 连接至所述式 (II) 的结构体。

19. 如权利要求 16 所述的方法，其中：

- 所述包含式 (I) 的结构体的化合物是如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定的式 (Ia) 的化合物；

- R_2 表示式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团；而且

- 所述方法包括经由 F_2 与所述式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团之间的反应而使 F_2 连接至所述式 (II) 的结构体。

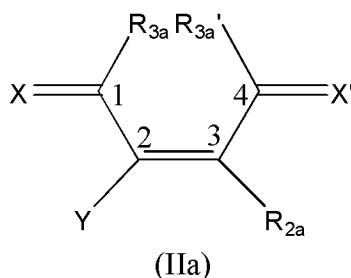
20. 一种用于产生偶联物的方法，所述方法包括使式 R_1-H 的化合物与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个式 F_2 的结构体的化合物反应，其中：

- 所述式 (I) 的结构体和 F_2 各自如权利要求 1 中所限定；

- R_1 如权利要求 1、14 和 15 中任一项所限定；和

- 所述方法涉及经由所述式 R_1-H 的化合物中的第一 SH 基团对所述式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而连接基团 R_1 ，从而使所述 2- 位的基团 Y 被所述基团 R_1 替代。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其中，所述包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个式 F_2 的结构体的化合物是式 (IIa) 的化合物，



其中：

-：

-R_{3a} 表示式 R₃ 的基团或式 F₂ 或 -L(F₂)_m(Z)_{n-m} 的基团，并且 R_{3a}' 独立地表示式 R₃' 的基团或式 F₂ 或 -L(F₂)_m(Z)_{n-m} 的基团；或

-R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 -O- 或 -N(R_{33a'}) 的基团，其中 R_{33a'} 表示式 R_{33'} 的基团或式 F₂ 或 -L(F₂)_m(Z)_{n-m} 的基团；或

-R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 -N(R_{33a'})-N(R_{33a'})- 的基团，其中，各 R_{33a'} 相同或不同，并表示式 R_{33'} 的基团或式 F₂ 或 -L(F₂)_m(Z)_{n-m} 的基团；

-R_{2a} 表示式 R₂ 的基团或式 F₂ 或 -L(F₂)_m(Z)_{n-m} 的基团；

-m 为具有 0 至 n 的值的整数；

-式 (IIa) 的化合物包含至少一个式 F₂ 的基团；

-F₂ 如权利要求 1 中所限定；而且

-X、X'、R₃、R₃'、R_{33'}、R₂、L、Z 和 n 均如权利要求 2～13 中任一项所限定。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中，在式 (IIa) 的化合物中：

-：

-R_{3a} 表示式 R₃ 的基团或式 F₂ 的基团，并且 R_{3a}' 独立地表示式 R₃' 的基团或式 F₂ 的基团；或

-R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 -N(R_{33a'}) 的基团，其中，R_{33a'} 表示式 R_{33'} 的基团或式 F₂ 的基团；和

-R_{2a} 表示式 R₂ 的基团或式 F₂ 的基团。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法，其中，式 (IIa) 的化合物包含一个式 F₂ 的基团。

24. 如权利要求 16～23 中任一项所述的方法，所述方法还包括使一个或多个另外的功能性结构体与所述偶联物连接，其中，各个另外的功能性结构体相同或不同，并选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

25. 一种方法，所述方法包括：

(i) 提供包含式 (II) 的结构体的化合物；和

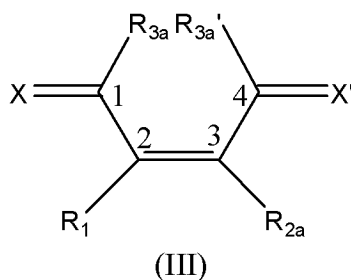
(ii) 使基团 R₁ 与所述式 (II) 的结构体的 2- 位的碳原子之间的键断裂；

其中：

-R₁ 如权利要求 1、14 和 15 任一项所限定；和

-所述式 (II) 的结构体如权利要求 16 所限定。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中，所述包含式 (II) 的结构体的化合物是式 (III) 的化合物，



其中：

-：

$-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

$-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团, 其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

$-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团, 其中, 各 $R_{33a'}$ 相同或不同并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

$-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

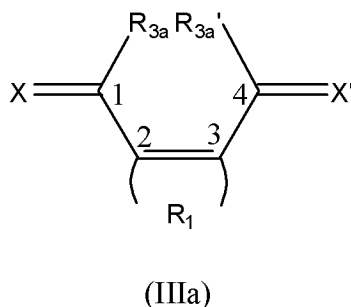
$-m$ 是具有 0 至 n 的值的整数 ;

$-R_1$ 如权利要求 1、14 和 15 中任一项所限定 ;

$-F_2$ 如权利要求 1 中所限定 ; 和

$-X$ 、 X' 、 R_3 、 R_3' 、 $R_{33'}$ 、 R_2 、 L 、 Z 和 n 均如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定。

27. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, 所述包含式 (II) 的结构体的化合物是式 (IIIa) 的化合物



其中：

-：

$-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

$-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团, 其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

$-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团, 其中, 各 $R_{33a'}$ 相同或不同并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

$-m$ 是具有 0 至 n 的值的整数 ;

$-R_1$ 如权利要求 1、14 和 15 中任一项所限定, 并且其中 R_1 包含至少第一硫醇基和第二硫醇基, 所述第一硫醇基连接至式 (IIIa) 的化合物的 2- 位, 并且所述第二硫醇基连接至式 (IIIa) 的化合物的 3- 位 ;

-F₂ 如权利要求 1 中所限定；

-X、X'、R₃、R₃'、R₃₃'、L、Z 和 n 如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定；

- 步骤 (ii) 还涉及使基团 R₁ 与式 (IIIa) 的结构体的 3- 位的碳原子之间的键断裂。

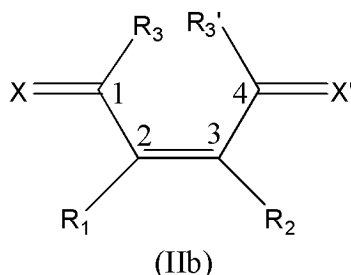
28. 如权利要求 25 或 27 中任一项所述的方法, 其中, 所述包含式 (II) 的结构体的化合物还包含至少一个式 F₂ 的功能性结构体。

29. 如权利要求 25 ~ 28 中任一项所述的方法, 其中, 步骤 (ii) 通过使所述化合物与膦或硫醇温育而实现。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其中, 所述膦是三 (2- 羧乙基) 膦盐酸盐, 所述硫醇是谷胱甘肽、1,2- 乙二硫醇、二硫苏糖醇或 2- 巯基乙醇。

31. 如权利要求 21 ~ 23 中任一项所限定的式 (IIa) 的化合物。

32. 式 (IIb) 的化合物,



其中, R₁ 如权利要求 1、14 和 15 中任一项所限定, 并且 X、X'、R₂、R₃ 和 R₃' 如权利要求 2 ~ 13 中任一项所限定,

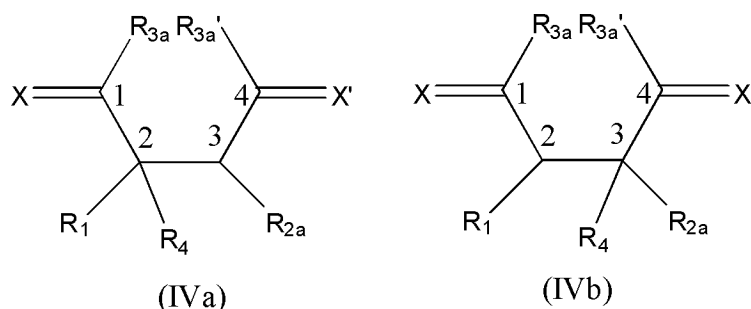
条件是 R₃ 和 R₃' 并不共同形成式 -N(R₃₃') 的基团。

33. 如权利要求 26 所限定的式 (III) 的化合物, 所述化合物包含至少一个式 F₂ 的基团, 并且其中 R_{2a} 不是氢原子。

34. 如权利要求 27 所限定的式 (IIIa) 的化合物。

35. 如权利要求 34 所述的化合物, 所述化合物包含至少一个式 F₂ 的基团。

36. 式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物,



其中：

-R₁ 如权利要求 1、14 和 15 中任一项所限定；

-X、X'、R_{2a}、R_{3a} 和 R_{3a}' 如权利要求 26 中所限定；

-R₄ 是卤素原子、羟基、C₁₋₆ 烷氧基、硫醇、C₁₋₆ 烷硫基或 C₁₋₆ 烷基羰氧基或式 F₂ 的基团；

- 基团 R_{2a} 和 R₄ 中的至少一个包含式 F₂ 的基团；和

-F₂ 如权利要求 1 中所限定。

37. 一种用于产生如权利要求 36 所述的式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物的方法, 所述方法包括：

(i) 提供如权利要求 26 中所限定的式 (III) 的化合物 ; 和

(ii) 使所述式 (III) 的化合物与式 R_4-H 的化合物反应, 其中 R_4 如权利要求 36 中所限定。

38. 一种用于检测一种物质是否存在于样品中的方法, 所述方法包括 :

- 提供如权利要求 33、35 和 36 中任一项所限定的化合物, 其中, 所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体中的一个能够产生可检测信号的功能性结构体, 所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体中的另一个是能够与所述物质相互作用的功能性结构体 ;

- 将所述样品与所述化合物温育 ; 和

- 在允许由能够产生可检测信号的所述功能性结构体产生可检测信号的条件下监测信号。

39. 一种用于由样品中纯化式 R_1-H 的化合物的方法, 所述方法包括 :

- 将所述样品与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个亲和标签的化合物温育, 以实施权利要求 20 ~ 23 中任一项所述的方法, 并由此获得包含基团 R_1 和亲和标签的偶联物 ; 和

- 在允许由所述样品中纯化所述偶联物的条件下将所述偶联物与包含至少一个亲和标签配对物的化合物温育。

40. 一种用于识别物质是否与式 R_1 的功能性结构体相互作用的方法, 所述方法包括 :

- 通过执行如权利要求 16 ~ 24 中任一项所述的方法来产生包含 (a) 所述式 R_1 的功能性结构体和 (b) 能够产生能够被所述物质修饰的信号的可检测结构体的偶联物 ;

- 将所述偶联物与所述物质温育 ;

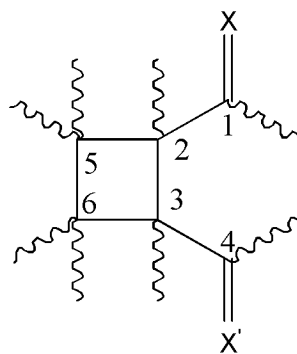
- 由所述可检测结构体获得信号 ; 和

- 使所述信号与所述偶联物未与所述物质接触时得到的对照信号进行比较, 由此确定所述物质是否与所述偶联物相互作用。

41. 如权利要求 33、35 和 36 中任一项所述的化合物, 所述化合物用于进行通过外科手术或疗法来治疗人体或动物体的方法或对人体或动物体实施的诊断方法。

42. 如权利要求 16 ~ 24 中任一项所述的方法, 其中, 所述偶联物包含马来酰亚胺环, 并且所述方法还包括实现所述马来酰亚胺环的开环。

43. 一种包含式 (VI) 的结构体和与其连接的功能性结构体的化合物,



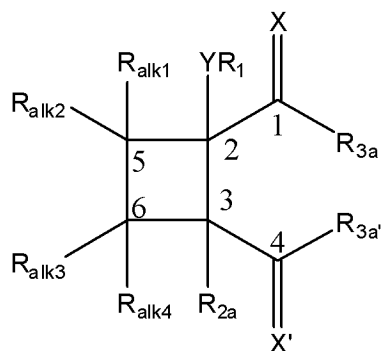
(VI)

其中 :

-X 和 X' 相同或不同,并各自表示氧、硫或式 = NQ 的基团,其中 Q 是氢、羟基、C₁₋₆ 烷基或苯基;和

-所述功能性结构体选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

44. 如权利要求 43 所述的化合物,其中,所述化合物具有式 (VIa),



(VIa)

其中:

-YR₁ 是式 Y 或 R₁ 的基团;

-X、X'、R₁ 和 Y 如权利要求 1 ~ 15 中任一项所限定;

-R_{2a}、R_{3a} 和 R_{3a'} 各自如权利要求 21 中所限定;

-R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3} 和 R_{alk4} 中的每一个相同或不同,并且是如权利要求 21 中所限定的式 R_{2a} 的基团,条件是 R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3} 和 R_{alk4} 中的至少一个包含式 F₂ 的基团;

-F₁ 和式 F₂ 的任何基团相同或不同,并各自选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

功能性分子的可逆的共价连接

[0001] 引言（技术领域 & 背景技术）

[0002] 众所周知，将两个以上的各自具有特定的功能性性质的分子连接在一起可能是合乎需要的。这样，有可能生成称为偶联物的新分子，其具有组合的其成分的特性。该技术提供了诱人的手段以用于以可控的且广泛适用的方式来修饰功能性可用分子的现有性质，或给这类分子添加全新的功能方面。

[0003] 将两个以上的功能性化合物偶联在一起的可能性在生物技术领域激发了特别浓厚的兴趣。生物分子如蛋白质或生物活性分子如药物与第二种功能性化合物的偶联已经用于极为广阔的应用范围，包括检测技术、蛋白质组学研究、纯化方法和疾病的诊断及治疗。这些方法论无处不在，以至于现在已有专门探讨这一主题的教科书。这类教科书中的一本是“生物偶联技术”（“Bioconjugate Techniques”，Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996），其内容以引用的方式全文并入本文中。

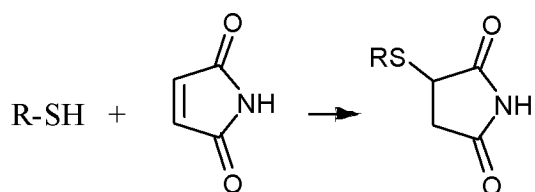
[0004] 将不同的功能性化合物连接在一起的方法通常侧重于相对于小的交联剂分子的使用。这一类型的连接试剂包含至少两个官能团。这些官能团中的每一个均能够与功能性分子反应，从而生成最终的交联的偶联物分子。

[0005] 已经开发出了用于交联剂试剂的种类非常广泛的官能团，以便与存在于将结合在一起的功能性分子上的特定的目标官能团反应。例如，包含活性酯基团（如 N- 羟基琥珀亚胺酯基）的交联剂长期以来一直用于与包含反应性胺基的功能性结构体（如蛋白质）反应。包含酰肼的交联剂（例如，己二酸二酰肼）已经用于使诸如糖蛋白等含有羧基的功能性分子官能化。

[0006] 一个功能性分子与另一个功能性分子的交联也可以通过以功能性分子中的反应性硫醇作为目标来实现。当所探讨的功能性分子是肽或蛋白质时该方法特别具有吸引力。其原因之一是含有硫醇的半胱氨酸残基在蛋白质中的天然丰度通常较低，由此开启了具有高度选择性的修饰过程的可能性。标准的定点突变技术也允许在蛋白质中的特定位置容易地插入半胱氨酸残基，由此生成反应性硫醇，该基团随后可经由合适的交联剂而由功能性结构体修饰。

[0007] 已经使用了作为能够与硫醇反应的连接剂的各种化合物。这些试剂包括 1,2- 二羰基乙烯衍生物、 α 卤代羰基化合物和硫代磺酸盐。其中，诸如马来酰亚胺等 1,2- 二羰基乙烯衍生物一般公认为是与硫醇，特别是与半胱氨酸结构体反应的最具选择性的试剂。含有硫醇的功能性分子（“R-SH”）中的硫醇与马来酰亚胺反应，以生成如下的硫醚连接：

[0008]



[0009] 马来酰亚胺中的反应性酰胺结构体可用于与另外的功能性化合物反应，由此生成偶联物，其中含有硫醇的功能性分子与另外的功能性结构体连接。马来酰亚胺试剂因而可

用于使含有半胱氨酸的蛋白质与各种第二种分子（例如，荧光团、生物素、聚乙二醇或糖）偶联。这些第二种分子往往通过具有化学惰性的连接剂物种而与马来酰亚胺环连接。

[0010] 然而，不幸的是，产生偶联物的该方法存在一些不利之处。例如，对反应产物的化学处理通常仅仅可在酰胺结构体进行。这意味着很难以单马来酰亚胺连接物将多于一个的另外的官能团添加至含有硫醇的化合物中。此外，含有硫醇的功能性分子和马来酰亚胺交联剂之间形成的硫醚键是不可逆的。因此，经交联剂而实现的衍生化是永久性的，不可能使天然的含有硫醇的试剂再生。

[0011] 含有硫醇的试剂与含有马来酰亚胺的交联剂之间的已知的衍生化反应的不可逆性可能会对其在蛋白质纯化、定量蛋白质组学分析、探针结合位点、进行结构研究和药物输送等领域中的实际应用带来严重的局限性。例如，在涉及生成含有硫醇的蛋白质与亲和标签（如生物素）的偶联物的纯化方法中，在进行纯化之后将不可能通过与马来酰亚胺的分离而使天然蛋白质再生。当执行的过程涉及难以表达的蛋白质，如很多 GPCR（G-蛋白偶合的受体）时，无法再生含有硫醇的试剂也是严重的问题。交联过程的不可逆性也阻碍了生物偶联方法在交联剂与蛋白质之间形成的键的不稳定性极为重要的领域（例如，交联实体设计为用于仅在有限的、优选为可控的时期内阻断酶的活性的情况）中的开发应用。

[0012] 本发明基于令人惊讶的发现，其有利之处在于将亲电子的离去基团结合到了已知的 1,2-二羰基乙烯交联剂的 $C=C$ 双键上。该化学修饰能够使肽或蛋白质等含有硫醇的功能性结构体连接至交联剂，同时保留了 $C=C$ 双键。这具有以下优点：

[0013] - 交联剂与硫醇化合物之间的反应往往可以迅速进行，产率很高，而且仅使用基本上为化学计量的量的交联剂。

[0014] - 交联剂与含有硫醇的分子之间形成的硫醚键合很容易可逆，特别是能够在本领域的技术人员选定的时间以可控的方式断裂。

[0015] - 在使含有硫醇的功能性结构体与交联剂连接后得到的化合物中的双键的保留构成了用于连接另外的功能性化合物的反应位。因此更易于在偶联物上添加额外的功能性结构体。

[0016] 新交联法很容易适用于涉及功能性结构体的偶联的所有种类的已知方法，这些已知方法如今常用于现有技术中。

[0017] US 4,680,272 描述了使用卤化的马来酰亚胺及其衍生物作为荧光“染料”来检测具有胺基或硫醇的蛋白质。不过，US 4,680,272 并未公开将在 $C=C$ 双键上具有亲电子的离去基团的 1,2-二羰基乙烯交联剂用于建构偶联物分子，也未公开在硫醇化合物与该交联剂之间成键是容易可逆的而且通常能够在使用基本上为化学计量的量的交联剂的条件下以高产率进行。

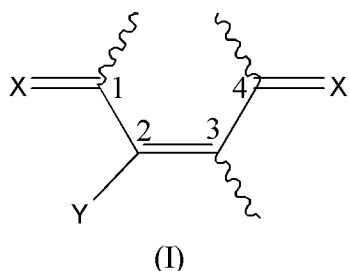
[0018] Hong 等 (J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (29), 9986 ~ 9994 页) 描述了基于 7-氧代降冰片二烯框架的用于硫醇的一类新的荧光探针。在该文中描述的一个特定试验中，具有丹酰荧光结构体的 7-氧代降冰片二烯与牛血清白蛋白反应。所得到的产物经历了逆向狄尔斯-奥尔德 (retro-Diels-Alder) 反应，以生成包含马来酰亚胺交联结构体的产物，其在 $C=C$ 双键的一个碳原子处具有牛血清白蛋白，而在该 $C=C$ 双键的另一个碳原子处具有氢原子。不过，Hong 等并未描述使用具有亲电子的离去基团的 1,2-二羰基乙烯作为用于构建偶联物分子的试剂。

[0019] US 7,504,430B2和Kar等(Mol. Cancer Ther 2006 ;5(6)2006年6月,1511~1519页)描述了用于产生含有马来酰亚胺的药物化合物的方法,其中3,4-二溴代马来酰亚胺衍生物与较小的、可选地具有取代基的巯基烷基化合物反应。不过,这些文献没有描述用于构建如本文中所限定的包含至少两个功能性结构体的偶联物分子的方法,也未描述在硫醇化合物与本发明的交联剂之间成键是容易可逆的而且通常能够在使用基本上为化学计量的量的交联剂的条件下以高产率进行。

发明内容

[0020] 本发明提供(1)包含式(I)的结构体的化合物作为连接用试剂的应用,所述连接用试剂将包含式 F_1 的第一功能性结构体的式 R_1-H 的化合物连接至式 F_2 的第二功能性结构体,

[0021]



[0022] 其中：

[0023] $-X$ 和 X' 相同或不同,并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团,其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基；

[0024] $-Y$ 为亲电子的离去基团；

[0025] $-R_1$ 是式 $-F_1$ 或 $-L-F_1$ 的基团,其中 L 是接头基团,并且 R_1-H 包含至少第一SH基团；和

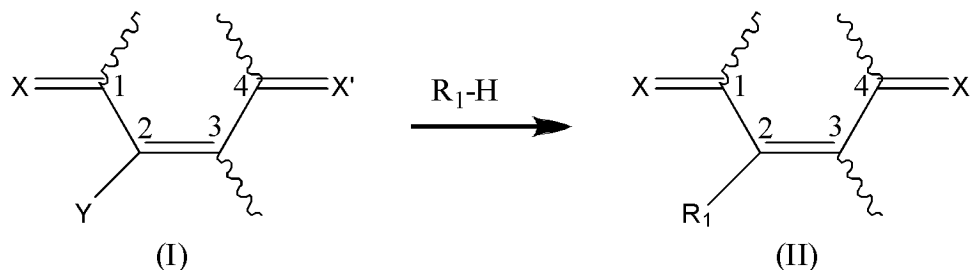
[0026] $-$ 所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体相同或不同,并各自选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA和RNA；

[0027] 其中,经由式 R_1-H 的化合物中的所述第一SH基团对式(I)的结构体的2-位的亲核攻击而使基团 R_1 与式(I)的结构体连接,从而使位于所述2-位的基团 Y 被所述基团 R_1 替代。

[0028] 本发明还提供(2)一种用于产生偶联物的方法,所述方法包括：

[0029] (i)使包含式(I)的结构体的化合物与式 R_1-H 的化合物反应,因此制得包含式(II)的结构体的化合物,

[0030]



[0031] (ii) 随后使式 F_2 的结构体与所述式 (II) 的结构体连接；

[0032] 其中，步骤 (i) 涉及经由式 R_1-H 的化合物中的所述第一 SH 基团对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而连接基团 R_1 ，从而使所述 2- 位的基团 Y 被所述基团 R_1 替代，

[0033] 而且其中，X、X'、Y、 R_1 、 F_2 和包含式 (I) 的结构体的化合物均如以上 (1) 中所限定。

[0034] 本发明还提供 (3) 一种用于产生偶联物的方法，所述方法包括使式 R_1-H 的化合物与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个式 F_2 的结构体的化合物反应，其中：

[0035] - 式 (I) 的结构体和 F_2 各自如以上 (1) 中所限定；

[0036] - R_1 如以上 (1) 中所限定；和

[0037] - 所述方法涉及经由式 R_1-H 的化合物中的所述第一 SH 基团对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而连接所述基团 R_1 ，从而使所述 2- 位的基团 Y 被基团 R_1 替代。

[0038] 进而，本发明提供 (4) 一种方法，所述方法包括：

[0039] (i) 提供包含式 (II) 的结构体的化合物；和

[0040] (ii) 使基团 R_1 与式 (II) 的结构体的 2- 位的碳原子之间的键断裂；

[0041] 其中：

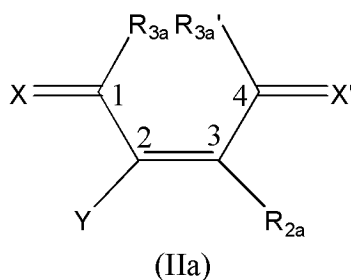
[0042] - R_1 如以上 (1) 中所限定；和

[0043] - 式 (II) 的结构体如以上 (2) 中所限定。

[0044] 对于化学领域普通技术人员而言，显而易见的是，基于在已知的二羰基乙烯交联剂的 C = C 双键上有利地引入亲电子的离去基团，可以将所有这些应用和方法都联系在一起。此外，涉及到这些应用和方法的许多中间物和产物据认为也是新颖的。本发明因而还提供下列实施方式 (5) ~ (9)。

[0045] 本发明提供 (5) 式 (IIa) 的化合物

[0046]



[0047] 其中：

[0048] -：

[0049] - R_{3a} 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团，并且 R_{3a}' 独立地

[0050] 表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；或

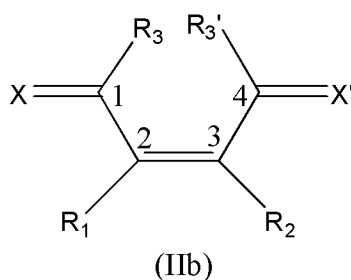
[0051] - R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团，其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；或

[0052] - R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团，其中，各 $R_{33a'}$ 相同或不同，并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；

[0053] - R_{2a} 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；

[0054] - m 为具有 0 至 n 的值的整数；

- [0055] - 式 (IIa) 的化合物包含至少一个式 F_2 的基团；
- [0056] $-F_2$ 如以上 (1) 中所限定；
- [0057] $-X$ 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基；
- [0058] - ；
- [0059] $-R_3$ 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或
- [0060] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团, 其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；
- [0061] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；
- [0062] - 式 E 和 Y 的各基团相同或不同, 并表示亲电子的离去基团；
- [0063] - 式 Nu 的各基团相同或不同, 并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂；
- [0064] - 式 L 的各基团相同或不同, 并表示接头基团；
- [0065] - 式 Z 的各基团相同或不同, 并表示与式 L 的基团连接的反应性基团, 所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应, 从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连；
- [0066] $-n$ 为 1、2 或 3；和
- [0067] - 式 IG 的各基团相同或不同, 并表示作为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体, 其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基, 并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代, 和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团替代, 其中：
- [0068] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基硫醇、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ (C_{1-6} 烷基)、硝基和磺酸基的取代基；和
- [0069] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团替代。
- [0070] 本发明也提供 (6) 式 (IIb) 的化合物,
- [0071]



- [0072] 其中：
- [0073] $-R_1$ 如以上 (1) 中所限定；
- [0074] $-X$ 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基；
- [0075] - ；

[0076] $-R_3$ 和 R_3' 相同或不同,并各自表示氢原子或式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;或

[0077] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33'})$ 的基团,其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;或

[0078] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-N(R_{33'})-N(R_{33'})-$ 的基团,其中各个 $R_{33'}$ 相同或不同,并表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;

[0079] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;

[0080] $-$ 式 E 和 Y 的各基团相同或不同,并表示亲电子的离去基团 ;

[0081] $-$ 式 Nu 的各基团相同或不同,并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂 ;

[0082] $-$ 式 L 的各基团相同或不同,并表示接头基团 ;

[0083] $-$ 式 Z 的各基团相同或不同,并表示与式 L 的基团连接的反应性基团,所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应,从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连 ;

[0084] $-n$ 为 1、2 或 3 ;和

[0085] $-$ 式 IG 的各基团相同或不同,并表示作为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体,其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基,并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团替代,其中 :

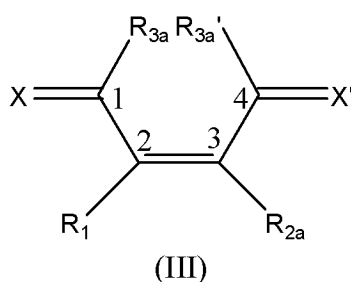
[0086] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ (C_{1-6} 烷基)、硝基和磺酸基的取代基 ;和

[0087] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团替代 ;

[0088] 条件是 R_3 和 R_3' 不共同形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团。

[0089] 本发明还提供 (7) 式 (III) 的化合物

[0090]



[0091] 其中 :

[0092] $-$:

[0093] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团,并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;或

[0094] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;或

[0095] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团,其中,各 $R_{33a'}$ 相同或不同,并

表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；

[0096] $-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；

[0097] $-m$ 为具有 0 至 n 的值的整数；

[0098] $-R_1$ 如以上 (1) 中所限定；

[0099] $-F_2$ 如以上 (1) 中所限定；

[0100] $-X$ 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基；

[0101] $-$ ；

[0102] $-R_3$ 和 $R_{3'}$ 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0103] $-R_3$ 和 $R_{3'}$ 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33'})$ 的基团, 其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0104] $-R_{3a}$ 和 $R_{3a'}$ 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团, 其中, 各 $R_{33a'}$ 相同或不同并表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团

[0105] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；

[0106] $-$ 式 E 和 Y 的各基团相同或不同, 并表示亲电子的离去基团；

[0107] $-$ 式 Nu 的各基团相同或不同, 并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂；

[0108] $-$ 式 L 的各基团相同或不同, 并表示接头基团；

[0109] $-$ 式 Z 的各基团相同或不同, 并表示与式 L 的基团连接的反应性基团, 所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应, 从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连；

[0110] $-n$ 为 1、2 或 3；和

[0111] $-$ 式 IG 的各基团相同或不同, 并表示作为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体, 其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基, 并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代, 和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团替代, 其中：

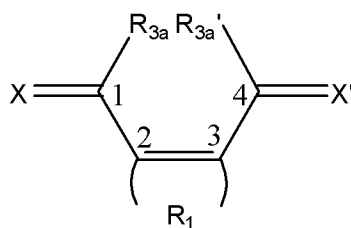
[0112] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ ($C_{1-6} \text{ 烷基}$)、硝基和磺酸基的取代基；和

[0113] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团替代；

[0114] 所述化合物包含至少一个式 F_2 的基团, 并且其中 R_{2a} 不是氢原子。

[0115] 进而, 本发明提供 (8) 式 (IIIa) 的化合物,

[0116]



(IIIa)

[0117] 其中：

[0118] -：

[0119] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团，并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；或

[0120] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a}')$ 的基团，其中 R_{33a}' 表示式 R_{33}' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；或

[0121] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a}')-N(R_{33a}')-$ 的基团，其中，各 R_{33a}' 相同或不同，并表示式 R_{33}' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团；

[0122] $-m$ 为具有 0 至 n 的值的整数；

[0123] $-R_1$ 如以上 (1) 中所限定，并且其中 R_1 包含至少第一硫醇和第二硫醇，所述第一硫醇连接至式 (IIIa) 的化合物的 2- 位，所述第二硫醇连接至式 (IIIa) 的化合物的 3- 位；

[0124] $-F_2$ 如以上 (1) 中所限定；

[0125] $-X$ 和 X' 相同或不同，并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团，其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基；

[0126] -：

[0127] $-R_3$ 和 R_3' 相同或不同，并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0128] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33}')$ 的基团，其中， R_{33}' 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0129] $-R_3$ 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33}')-N(R_{33}')-$ 的基团，其中各个 R_{33}' 相同或不同，并表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；

[0130] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；

[0131] $-$ 式 E 和 Y 的各基团相同或不同，并表示亲电子的离去基团；

[0132] $-$ 式 Nu 的各基团相同或不同，并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂；

[0133] $-$ 式 L 的各基团相同或不同，并表示接头基团；

[0134] $-$ 式 Z 的各基团相同或不同，并表示与式 L 的基团连接的反应性基团，所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应，从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连；

[0135] $-n$ 为 1、2 或 3；和

[0136] $-$ 式 IG 的各基团相同或不同，并表示 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体，其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基，并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环

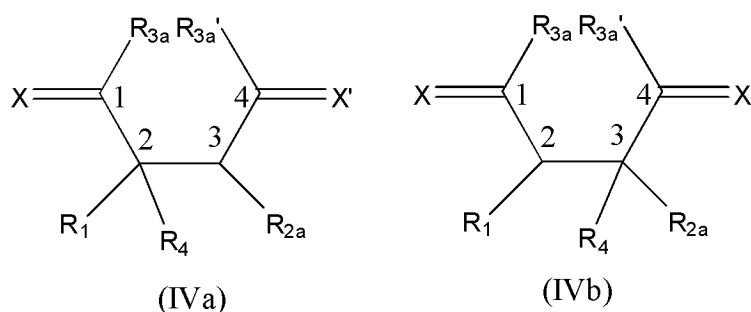
烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 $-\text{CH}_2-$ 基团由选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 和 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})-$ 的基团替代,其中:

[0137] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、硝基和磺酸基的取代基;和

[0138] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-\text{C}(\text{O})-$ 基团替代。

[0139] 本发明提供 (9) 式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物,

[0140]



[0141] 其中:

[0142] $-\text{R}_1$ 如以上 (1) 中所限定;

[0143] $-\text{X}$ 和 X' 相同或不同,并各自表示氧、硫或式 $=\text{NQ}$ 的基团,其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基;

[0144] $-\text{R}_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0145] $-\text{R}_{3a}$ 和 $\text{R}_{3a'}$ 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0146] $-\text{R}_{3a}$ 和 $\text{R}_{3a'}$ 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0147] $-\text{R}_{3a}$ 和 $\text{R}_{3a'}$ 共同形成式 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})-\text{N}(\text{R}_{33a'})-$ 的基团,其中,各 $\text{R}_{33a'}$ 相同或不同,并表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;

[0148] $-\text{R}_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;

[0149] $-\text{m}$ 为具有 0 至 n 的值的整数;

[0150] $-\text{R}_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0151] $-\text{R}_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0152] $-\text{R}_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})$ 的基团,其中 $\text{R}_{33a'}$ 表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;或

[0153] $-\text{R}_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-\text{N}(\text{R}_{33a'})-\text{N}(\text{R}_{33a'})-$ 的基团,其中各个 $\text{R}_{33a'}$ 相同或不同,并表示式 $\text{R}_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;

[0154] $-\text{R}_2$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-\text{L}(\text{F}_2)_m(\text{Z})_{n-m}$ 的基团;

[0155] $-\text{E}$ 和 Y 的各基团相同或不同,并表示亲电子的离去基团;

[0156] $-\text{Nu}$ 的各基团相同或不同,并表示选自 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{NH}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 的亲核试剂;

[0157] $-\text{L}$ 的各基团相同或不同,并表示接头基团;

[0158] $-\text{Z}$ 的各基团相同或不同,并表示与式 L 的基团连接的反应性基团,所述反应性

基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应,从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连;

[0159] $-n$ 为 1、2 或 3;和

[0160] $-$ 式 IG 的各基团相同或不同,并表示作为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体,其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基,并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6}$ 烷基) $-$ 的基团替代,其中:

[0161] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6}$ 烷基)(C_{1-6} 烷基)、硝基和磺酸基的取代基;和

[0162] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团替代;

[0163] $-R_4$ 是卤素原子、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、硫醇、 C_{1-6} 烷硫基或 C_{1-6} 烷基羰氧基或式 F_2 的基团;

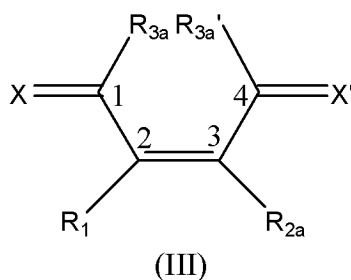
[0164] $-$ 基团 R_{2a} 和 R_4 中的至少一个包含式 F_2 的基团;和

[0165] $-F_2$ 如以上 (1) 中所限定。

[0166] 本发明也提供 (10) 一种用于产生如以上 (9) 中所限定的式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物的方法,所述方法包括:

[0167] (i) 提供式 (III) 的化合物;和

[0168]



[0169] (ii) 使式 (III) 的所述化合物与式 R_4-H 的化合物反应,其中 R_4 如以上 (9) 中所限定;

[0170] 其中:

[0171] $-$:

[0172] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团,并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团;或

[0173] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团;或

[0174] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团,其中,各 $R_{33a'}$ 相同或不同,并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团;

[0175] $-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团;

[0176] $-m$ 为具有 0 至 n 的值的整数;

[0177] $-R_1$ 如以上 (1) 中所限定;

[0178] $-F_2$ 如以上 (1) 中所限定；

[0179] $-X$ 和 X' 相同或不同，并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团，其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基，

[0180] $-$ ；

[0181] $-R_3$ 和 R_3' 相同或不同，并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0182] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33'})$ 的基团，其中， $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；或

[0183] $-R_3$ 和 R_3' 共同形成式 $-N(R_{33'})-N(R_{33'})-$ 的基团，其中各个 $R_{33'}$ 相同或不同，并表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；

[0184] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团；

[0185] $-$ 式 E 和 Y 的各基团相同或不同，并表示亲电子的离去基团；

[0186] $-$ 式 Nu 的各基团相同或不同，并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂；

[0187] $-$ 式 L 的各基团相同或不同，并表示接头基团；

[0188] $-$ 式 Z 的各基团相同或不同，并表示与式 L 的基团连接的反应性基团，所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应，从而使所述第二功能性结构体与所述式 L 的基团相连；

[0189] $-n$ 为 1、2 或 3；和

[0190] $-$ 式 IG 的各基团相同或不同，并表示 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体，其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基，并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代，和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团替代，其中：

[0191] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ ($C_{1-6} \text{ 烷基}$)、硝基和磺酸基的取代基；和

[0192] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团替代。

[0193] 本发明还提供 (11) 一种用于检测样品中的式 R_1-H 的化合物的方法，所述方法包括在允许检测所述样品中的所述式 R_1-H 的化合物的条件下，将所述样品与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的式 F_2 的化合物的化合物温育，其中：

[0194] $-$ 包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的式 F_2 的化合物的化合物如以上 (3) 中所限定；

[0195] $-$ 式 F_2 的化合物是可检测结构体，其能够产生可由式 R_1 的基团修饰的信号。

[0196] 进而，本发明提供 (12) 一种用于检测一种物质是否存在于样品中的方法，所述方法包括：

[0197] $-$ 提供如以上 (7)、(8) 和 (9) 中任一项所限定的化合物，条件是如 (8) 中所限定的化合物包含至少一个式 F_2 的基团，其中，所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体中的一个能够产生可检测信号的功能性结构体，所述第一功能性结构体和所述第二功能性结构体中的另一个是能够与所述物质相互作用的功能性结构体；

[0198] - 将所述样品与所述化合物温育 ; 和

[0199] - 在允许由能够产生可检测信号的所述功能性结构体产生可检测信号的条件下监测信号。

[0200] 本发明也提供 (13) 一种用于识别物质是否与式 R_1 的功能性结构体相互作用的方法, 所述方法包括 :

[0201] - 通过执行如以上 (2) 和 (3) 中任一个所述的方法来产生包含 (a) 所述式 R_1 的功能性结构体和 (b) 能够产生能够被所述物质修饰的信号的可检测结构体的偶联物 ;

[0202] - 将所述偶联物与所述物质温育 ;

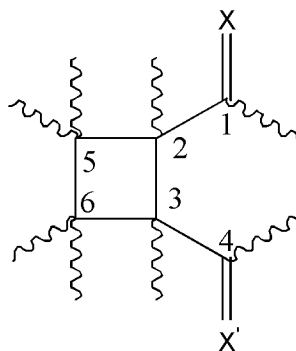
[0203] - 由所述可检测结构体获得信号 ; 和

[0204] - 使所述信号与所述偶联物未与所述物质接触时得到的对照信号进行比较, 由此确定所述物质是否与所述偶联物相互作用。

[0205] 此外, 本发明提供 (14) 用于通过外科手术或疗法来治疗人体或动物体的方法或对人体或动物体实施的诊断方法的如以上 (7)、(8) 和 (9) 中任一项所限定的化合物, 条件是如 (8) 中限定的化合物包含至少一个式 F_2 的基团。

[0206] 本发明也提供包含式 (VI) 的结构体和与其连接的功能性结构体的化合物,

[0207]



(VI)

[0208] 其中 :

[0209] -X 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 $=NQ$ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基或苯基 ;

[0210] - 所述功能性结构体选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

附图说明

[0211] 图 1 显示了实施例 31 中描述的方案的结果, 其中将蛋白质 / 生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺加合物和未经修饰的模型蛋白溶液 (In) 添加至涂覆有中性抗生物素蛋白 (neutravidin) 的琼脂糖珠, 离心, 收集流穿物 (FT), 珠子用 PBS 洗涤, 收集两种洗出组分 (W1 和 W2), 通过在包含 β -巯基乙醇的 PBS 中的温育使蛋白质由珠子上释放, 离心样品, 并收集包含切割下来的蛋白质的洗脱液 (E1)。

[0212] 图 2 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号 %, x 轴 = 时间 / 分钟) 测定的根据实施例 39 中描

述的方案由卤代马来酰亚胺生成促生长素抑制素 (somatostatin)- 马来酰亚胺加合物。左上: 由二氯马来酰亚胺 (圆形)、二溴代马来酰亚胺 (正方形) 和二碘马来酰亚胺 (三角形) 生成促生长素抑制素加合物。右上: 由单溴代马来酰亚胺 (圆形)、N- 甲基单溴代马来酰亚胺 (正方形) 和 N- 甲基二溴代马来酰亚胺 (三角形) 生成促生长素抑制素加合物。左下: 由 N- 荧光素 - 二溴代马来酰亚胺 (圆形)、N- 生物素 - 二溴代马来酰亚胺 (正方形)、N-PEG5000- 二溴代马来酰亚胺 (三角形)、N-PEG-5000- 二苯硫酚马来酰亚胺 (菱形) 和 N-PEG 300- 二溴代马来酰亚胺 (椭圆形) 生成促生长素抑制素加合物。

[0213] 图 3 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号%, x 轴 = 时间 / 分钟) 测定的根据实施例 39 中描述的方案的由二硫代马来酰亚胺生成促生长素抑制素 - 马来酰亚胺加合物。左上: 由 1 当量 (圆形)、5 当量 (正方形) 和 10 当量 (三角形) 的二 -2- 巯基乙醇马来酰亚胺生成促生长素抑制素加合物。右上: 由 1 当量 (圆形)、5 当量 (正方形) 和 10 当量 (三角形) 的二半胱氨酸马来酰亚胺生成促生长素抑制素加合物。左下: 由 1 当量 (圆形)、5 当量 (正方形) 和 10 当量 (三角形) 的二苯硫酚马来酰亚胺生成促生长素抑制素加合物。右下: 由 1 当量 (圆形)、5 当量 (正方形) 和 10 当量 (三角形) 的二 -2- 巯基吡啶马来酰亚胺生成促生长素抑制素加合物。

[0214] 图 4 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号%, x 轴 = 时间, 以分钟计 (min)、以小时计 (h) 和以天计 (day)) 测定的根据实施例 39 中描述的方案的利用各种还原剂的马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素的断裂。左上: 利用 DTT 的完全修饰的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺 (空心圆形) 和副产物的总量 (实心圆形)。中上: 利用 2- 巯基乙醇的完全修饰的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺 (空心圆形) 和副产物的总量 (实心圆形)。右上: 利用 GSH 的完全修饰的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺 (空心圆形) 和副产物的总量 (实心圆形)。左下: 利用 TCEP 的完全修饰的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺 (空心圆形) 和副产物的总量 (实心圆形)。右下: 利用 1,2- 乙二硫醇的完全修饰的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺 (空心圆形) 和副产物的总量 (实心圆形)。

[0215] 图 5 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号%, x 轴 = 时间 / 分钟) 测定的根据实施例 39 中描述的方案的利用各种量的 DTT 和 2- 巯基乙醇的马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素的断裂。左: 利用 50 当量 (空心圆形)、20 当量 (空心三角形) 和 10 当量 (空心正方形) 的 DTT 使促生长素抑制素再生。右: 利用 50 当量 (空心圆形)、20 当量 (空心三角形) 和 10 当量 (空心正方形) 的 2- 巯基乙醇使促生长素抑制素再生, 以及利用 50 当量 (实心圆形)、20 当量 (实心三角形) 和 10 当量 (实心正方形) 的 2- 巯基乙醇的副产物的总量。

[0216] 图 6 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号%, x 轴 = 时间 / 分钟) 测定的根据实施例 39 中描述的方案的桥接的促生长素抑制素的催化断裂。图中显示的是利用 2- 巯基乙醇 (空心圆形)、2- 巯基乙醇与 NaI (空心正方形) 和 2- 巯基乙醇与苯硒酚 (空心三角形) 的促生长素抑制素的再生, 以及在使用 2- 巯基乙醇 (实心圆形)、2- 巯基乙醇与 NaI (实心正方形) 和 2- 巯基乙醇与苯硒酚 (实三角形) 时的全部副产物。

[0217] 图 7 显示了由 LC-MS (y 轴 = 信号%, x 轴 = 时间, 以分钟计 (min)、以小时计 (h) 和以天计 (day)) 测定的根据实施例 39 中描述的方案的利用 2- 巯基乙醇的 N- 功能化的马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素的断裂。左上: N- 甲基马来酰亚胺促生长素抑制素加合物断裂以产生促生长素抑制素 (空心圆形) 和全部副产物 (实心圆形)。中上: N- 生物素马来

酰亚胺促生长素抑制素加合物断裂以产生促生长素抑制素（空心圆形）和全部副产物（实心圆形）。右上：N- 荧光素马来酰亚胺促生长素抑制素加合物断裂以产生促生长素抑制素（空心圆形）和全部副产物（实心圆形）。左下：N-PEG5000 马来酰亚胺促生长素抑制素加合物断裂以产生促生长素抑制素（空心圆形）和全部副产物（实心圆形）。右下：N-PEG300 马来酰亚胺促生长素抑制素加合物断裂以产生促生长素抑制素（空心圆形）和全部副产物（实心圆形）。

[0218] 图 8 显示了由 LC-MS(y 轴=信号%, x 轴=时间 / 小时)测定的根据实施例 39 中描述的方案的单溴代马来酰亚胺与促生长素抑制素的双加合产物的断裂。左上：使用 2- 巯基乙醇的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺（空心圆形）、促生长素抑制素 - 双马来酰亚胺（实心圆形）和全部副产物（三角形）。右上：使用 DTT 的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺（空心圆形）、促生长素抑制素 - 双马来酰亚胺（实心圆形）和全部副产物（三角形）。左下：使用 TCEP 的促生长素抑制素 - 马来酰亚胺（空心圆形）、促生长素抑制素 - 双马来酰亚胺（实心圆形）和全部副产物（三角形）。

[0219] 图 9 显示了由 LC-MS(y 轴=信号%, x 轴=时间 / 小时)测定的根据实施例 39 中描述的方案的促生长素抑制素与各种量的二硫代马来酰亚胺的相当的原位桥接。该图显示了使用比率为 3 : 5 的 TCEP 引发剂和苯硫酚的桥接的促生长素抑制素的产生（圆形）、比率为 5 : 10 的硒醇引发剂和苯硫酚的桥接的促生长素抑制素的产生（正方形）和比率为 10 : 20 的硒醇引发剂和 2- 巯基乙醇的桥接的促生长素抑制素的产生（三角形）。

[0220] 图 10 显示了由 LC-MS(y 轴=信号%, x 轴=时间 / 小时)测定的根据实施例 39 中描述的方案的促生长素抑制素的原位聚乙二醇化。该图显示了使用 5 当量的 N-PEG5000- 二苯硫酚马来酰亚胺和 3 当量的 TCEP 的聚乙二醇化的促生长素抑制素的产生（圆形）和使用 10 当量的 N-PEG5000- 二苯硫酚马来酰亚胺和 5 当量的苯硒酚的聚乙二醇化的促生长素抑制素的产生（正方形）。

[0221] 图 11 显示了实施例 39 中描述的膜片钳检测中得到的全细胞膜片钳电流记录。该图显示了由表达 SSTR2 的 GIRK 1/2A 细胞系记录的代表性的痕迹。细胞以 -60mV 被夹钳，应用 20 μ M 的促生长素抑制素或其衍生物 20 秒。左上：促生长素抑制素（在所示的轴中，垂直线代表 1000pA，水平线代表 20ms）。右上：二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（在所示的轴中，垂直线代表 1000pA，水平线代表 20ms）。左下：荧光素二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（在所示的轴中，垂直线代表 1000pA，水平线代表 20ms）。右下：聚乙二醇化的二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（在所示的轴中，垂直线代表 1000pA，水平线代表 20ms）。

[0222] 图 12 显示了实施例 39 中描述的膜片钳检测中被促生长素抑制素及其类似物激发的电流的幅值。x 轴表示 pA/pF 表示的电流幅值。上部的两条柱来自荧光素二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（黑柱是用百日咳毒素对细胞预处理 24 小时之后；灰柱是未经预处理），接下来的两条柱来自聚乙二醇化的二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（黑柱是用百日咳毒素对细胞预处理 24 小时之后；灰柱是未经预处理），接下来的三条柱来自二溴代马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素（白柱是在以 GIRK 抑制剂 TertiapinQ, 100nM 预温育 5 分钟之后；黑柱是用百日咳毒素对细胞预处理 24 小时之后；灰柱是未经预处理），底部的两条柱来自促生长素抑制素（黑柱是用百日咳毒素对细胞预处理 24 小时之后；灰柱

是未经预处理)。

具体实施方式

[0223] 本文中使用的术语“功能性结构体(functional moiety)”是指形成偶联物的一部分的结构体,并且该结构体是可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA 中的一种。

[0224] 正如将易于由本领域的技术人员所理解的,化合物中(例如,偶联物分子中)所包含的功能性结构体能够通过使其连接相应的“功能性化合物”而得到。当功能性化合物连接至第二种化合物时,需要使该功能性化合物中某处的键断裂,由此与第二种化合物形成新键。这类过程的实例包括当功能性化合物成为结合在第二种分子上的功能性结构体时功能性化合物失去离去基团、当功能性化合物经含有氢原子的亲核基团(如 -OH 或 -SH 基团)而反应时失去质子或当功能性化合物与第二种化合物经由亲电加成反应或亲核加成反应进行反应时功能性化合物中的双键转换为单键。本领域的技术人员因而将理解,例如“蛋白质”等功能性结构体指的是通过使蛋白质化合物结合到第二种分子中而形成的结构体,伴随的是与对应的蛋白质化合物相比而言失去了内部的键(例如,当 -OH、-SH 或 -NH₂ 等结构体与第二种分子成键时由该结构体失去质子)。

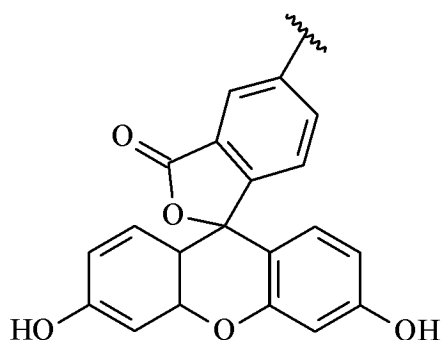
[0225] 功能性结构体通常是其天然形式下(也就是,当其不是生物偶联物的一部分时)具有不连续的生物学意义的结构体。任何用于本发明的功能性结构体相对分子量优选为至少 200,更优选至少 500,最优选至少 1000。本文中描述的功能性结构体优选是生物分子。

[0226] 本文中使用的术语“可检测结构体”是指测试样品中能够产生可检测信号的结构体。显然,所述可检测结构体可以理解为源自对应的“可检测化合物”的结构体,并且当该结构体与另一功能性结构体经本发明的偶联物中的交联剂而连接时其保留产生可检测信号的能力。可检测结构体在本领域中通常也称为“标签”、“探针”和“标记”。可检测结构体的实例包括显色结构体、荧光结构体、放射性结构体和电化学活性结构体。在本发明中,优选的可检测结构体是显色结构体和荧光结构体。最优选荧光结构体。

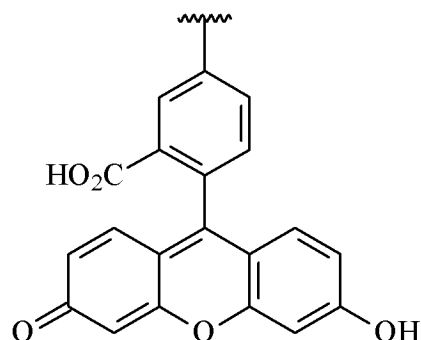
[0227] 显色结构体是变色的结构体,当其结合到偶联物中时则改变颜色,或者当其结合到偶联物中并且该偶联物随后与第二目标物种相互作用时其改变颜色(例如,在偶联物包含随后与另一目标分子相互作用的蛋白质的情况中)。

[0228] 术语“显色结构体”通常是指能够以至少两种能态存在的相关原子的基团,一种是相对低能量的基态,另一种是通过吸收来自辐射光谱的特定区域的光能而引发的激发态。相关原子的基团往往包含离域电子。适用于本发明的显色结构体包括包含 π 系统和金属络合物的偶联的结构体。其实例包括卟啉、多烯、聚炔烃和聚芳烃。优选的显色结构体是,

[0229]



和



[0230] 荧光结构体是包含荧光团的结构体,其是荧光化学结构体。通常作为荧光结构体结合到第二种分子(如本发明的偶联物)中的荧光化合物的实例包括下列化合物:

[0231] - 获自 Invitrogen 的 Alexa Fluor®染料族系;

[0232] - 花青和部花青;

[0233] - 获自 Invitrogen 的 BODIPY(硼-亚甲基二吡咯)染料族系;

[0234] - 由 ATTO-TEC GmbH 制造的 ATTO 染料族系;

[0235] - 荧光素及其衍生物;

[0236] - 若丹明及其衍生物;

[0237] - 蔡衍生物,如其丹磺酰和氟硅酸钠(prodan)衍生物;

[0238] - 吡啶基噁唑、硝基苯噁二唑和苯噁二唑衍生物;

[0239] - 香豆素及其衍生物;

[0240] - 茈衍生物;和

[0241] - 获自 Invitrogen 的俄勒冈绿、曙红、德克萨斯红、瀑布蓝和尼罗红。

[0242] 用于本发明的优选的荧光结构体包括荧光素、若丹明、香豆素、磺基罗丹明 101 磺酰氯(德克萨斯红)和丹酰基。尤其优选荧光素和丹酰基。

[0243] 放射性结构体是包含放射性核的结构体。放射性核的实例包括碘-131、碘-125、铋-212、钷-90、钷-88、钨-99m、铜-67、镱-188、镱-186、镓-66、镓-67、铟-111、铟-114m、铟-114、硼-10、氟(氢-3)、碳-14、硫-35、氟-18 和碳-11。例如,氟-18 和碳-11 通常用于正电子发射成像术。

[0244] 在一个实施方式中,放射性结构体可以仅由放射性核构成。在另一个实施方式中,放射性核可以结合到更大的放射性结构体中,例如,通过与接头基团(例如,包含硫醇基的连接剂)的直接共价结合,或通过与螯合剂形成配位络合物。本领域中已知的适宜的螯合剂包括 DTPA(二乙烯三胺-五乙酸酐)、NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮杂环四-癸烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、DTTA(N¹-(对异硫氰氧基苄基)-二乙烯-三胺-N¹,N²,N³-四乙酸)和 DFA(N¹-[5-[[5-[[5-乙酰基羟基氨基)戊基]氨基]-1,4-二氧丁基]羟基氨基]戊基]N-(5-氨基戊基)N-羟基丁二酰胺)。

[0245] 电化学活性结构体是包含能够在诸如安培或伏安法等电化学方法中产生电化学信号的基团的结构体。所述电化学活性结构体通常能够以至少两种截然不同的氧化还原态存在。

[0246] 当然,本领域的技术人员能够很容易地由常规可用的种类繁多的可检测化合物选择适合本发明使用的可检测化合物。因此本发明的方法可用于产生包含可检测结构体的偶

联物,该偶联物随后可用在涉及检测此类物种的任何常规的生物化学技术中。

[0247] 本文中使用的术语“酶学活性结构体”是指酶、用于酶的底物或用于酶的辅因子。酶学活性结构体优选是酶。

[0248] 本文中使用的术语“亲和标签”是指,在亲和标签和亲和配对物均存在于同一样品中时,能够与“亲和配对物”(第二化学结构体)相互作用的化学结构体。通常,亲和标签能够与亲和配对物形成特定的结合相互作用。特定的结合相互作用是比在所述亲和配对物与样品中存在的任何其他的化学物质之间可能发生的任何结合相互作用更强的结合相互作用。例如,特定的结合相互作用可出现在酶及其底物之间。

[0249] 亲和标签可用于诸如检测或纯化蛋白质等生物分子的应用中。在这样的应用中,通过利用亲和标签及其亲和配对物之间的特定结合相互作用可以检测或纯化包含生物分子和亲和标签的偶联物。

[0250] 特别广泛应用于生物化学的一对亲和标签/亲和配对物是生物素/抗生物素蛋白(抗生蛋白链菌素)对。抗生物素蛋白和抗生蛋白链菌素是能够用作亲和配对物的蛋白质,其以高亲和力和特异性结合源自生物素(5-[(3aS,4S,6aR)-2-氧六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酸)的亲和标签。本领域中常用的其他的亲和标签/亲和配对物对包括淀粉酶/麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽/谷胱甘肽-S-转移酶和金属(例如,镍或钴)/聚(His)。本领域的技术人员将理解,所述对中的任一成员可用作“亲和标签”,而所述对中的另一成员可用作“亲和配对物”。因此术语“亲和标签”和“亲和配对物”是可以互换的。

[0251] 本领域的技术人员将知晓亲和标签/亲和配对物的相互作用在生物化学,特别是生物偶联技术环境中的常规使用。本领域的技术人员因而将毫无困难地选择根据本发明使用的亲和标签。本发明的方法因而能够用来产生适用于利用亲和标签/亲和配对物的相互作用的常规生物化学技术的偶联物。

[0252] 本发明的优选的亲和标签是生物素、淀粉酶、谷胱甘肽和聚(His)。特别优选的亲和标签是生物素。

[0253] 本文中使用的术语“半抗原”是指包含表位的结构体,其不能以其天然形式刺激体内的免疫响应,但当其与免疫原性载体分子连接时则能够刺激体内的免疫响应。通常,半抗原是相对低分子量(例如,小于1000的分子量)的非蛋白质结构体。表位是由免疫系统识别并刺激免疫响应的分子或结构体的一部分。

[0254] 本文中使用的术语“免疫原性载体”是指当体内施用时能够促进免疫响应并且能够与半抗原缀合的抗原。免疫原性载体的实例包括蛋白质、脂质体、合成的或天然的聚合结构体(例如葡聚糖、琼脂糖、聚赖氨酸和聚谷氨酸结构体)以及综合设计的有机结构体。通常使用的蛋白质免疫原性载体包括血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、牛血清白蛋白、氨基乙基化的或阳离子化的牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白、卵清蛋白和各种类毒素蛋白如破伤风类毒素和白喉类毒素。众所周知的综合设计的有机分子载体包括多抗原肽(MAP)。

[0255] 生物化学领域的技术人员将知晓,半抗原-免疫原性载体偶联物例如广泛用于免疫学和蛋白质组学。本领域的技术人员因而将认识到,本发明的方法能够容易地应用于制备包含半抗原和免疫原性载体的偶联物,该偶联物随后可用在这些已经确立起来的常规技术中。因此,在本发明的一个优选实施方式中,第一功能性结构体和第二功能性结构体中的一个半抗原,而第一功能性结构体和第二功能性结构体中的另一个是免疫原性载体。

[0256] 本文中使用的术语“抗体或抗体片段”是指能够经抗原上的表位与特定抗原结合的蛋白质,或该蛋白质的片段。抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。优选单克隆抗体。

[0257] 本文中使用的术语“抗原”是指在体内施用时能够激起免疫响应并且能够与在所述免疫响应期间生成的抗体结合的物质。

[0258] 本文中使用的术语“配体”是指能够与生物分子(例如,蛋白质)相互作用,从而修饰生物分子的功能性结构体的结构体。所述配体通常是与目标蛋白质上的位点结合的结构体。配体与生物分子间的相互作用通常是非共价的。例如,所述相互作用可以通过离子键、氢键或范德华力。不过,一些配体与生物分子形成共价键也是可能的。通常,配体在生物分子相互作用时能够改变该生物分子的化学构象。

[0259] 能够与蛋白质相互作用的配体的实例包括底物(结合时受到酶的作用,例如,参与酶催化的化学反应)、抑制剂(结合时抑制蛋白质的活性)、活化剂(结合时增强蛋白质的活性)和神经递质。

[0260] 本文中使用的术语“生物活性结构体”是指体内施用时能够引起生物化学响应的结构体。

[0261] 所述生物活性结构体可以是药物。药物包括细胞毒剂如阿霉素、氨甲喋呤及其衍生物;能够体内代谢以产生细胞毒剂的细胞毒素前体;抗肿瘤剂;抗高血压药;心肌能量代谢改善药;抗心律不齐药;ACE抑制剂;消炎药;利尿剂;肌肉松弛剂;局部麻醉药;激素;降胆固醇药物;抗凝血剂;抗抑郁药;镇定剂;神经松弛剂;镇痛药如麻醉药或解热镇痛药;抗病毒药物;抗菌药物;抗真菌药物;抑菌剂;CNC活性药物;抗惊厥药;抗焦虑药;抗酸剂;麻醉药;抗生素;呼吸系统药物;抗组胺剂;免疫抑制剂;免疫活化剂;营养性添加剂;止咳剂;诊断剂;催吐剂和镇吐药;糖;氨基葡聚糖;糖蛋白和多糖;脂质,如磷脂酰-乙醇胺、磷脂酰丝氨酸及其衍生物;鞘氨醇;类固醇;维生素;抗生素,包括羊毛硫抗生素、抑菌药和杀菌剂、抗真菌剂、驱肠虫药;以及其他的有效抵抗感染物(包括单细胞病原体)的药剂;较小的效应分子如去甲肾上腺素、 α -肾上腺素能受体配体、多巴胺受体配体、组胺受体配体、GABA/苯化重氮受体配体、5-羟色胺受体配体、白细胞三烯和三碘甲状腺原氨酸,以及它们的衍生物。

[0262] 所述生物活性结构体也可以是源自以下化合物的结构体,所述化合物能够容易地穿过生物膜,并且在与第二种功能性结构体形成偶联物分子时能够增强该第二种功能性结构体穿过生物膜的能力。例如,所述生物活性结构体可以是“蛋白转导域”或小的分子载体(“SMC”或“分子索”),例如在WO 2009/027679中所描述的那些,其内容以引用的方式全文并入本文中。因此,在本发明的一个优选实施方式中,第一功能性结构体和第二功能性结构体中的一个是这样的蛋白转导域或小的分子载体,而第一功能性结构体和第二功能性结构体中的另一个是药物。

[0263] 在本发明的优选实施方式中,所述生物活性结构体是药物。

[0264] 本文中使用的术语“脂质体”是指由具有两性分子性质的磷脂双层构成的结构。根据本发明适合使用的脂质体包括单层泡囊和多层泡囊。

[0265] 本文中使用的术语“聚合结构体”是指单一的聚合链(支化的或未支化的),其源自相应的单聚合物分子。聚合结构体可以是天然聚合物,也可以是合成聚合物。不过,聚合分子通常不是多核苷酸。

[0266] 正如生化领域中众所周知的,生成包含聚合结构体的偶联物在于许多的体内和体外应用中都是有用的。例如,可以通过使聚合结构体连接至诸如蛋白质等大分子来修饰该大分子的各种性质,包括溶解性、表面特性和处于溶液中或冷冻状态时的稳定性。另一常见应用涉及使聚合结构体与药物等生物活性化合物偶联,其目的在于增强生物相容性、减少或消除施用时的免疫响应和/或增加体内稳定性。

[0267] 本领域的技术人员因而将认识到,本发明的方法可用来制备包含聚合结构体的偶联物,该偶联物随后可用在任何已知的对于含有聚合结构体的偶联物的应用中。基于本领域中常规使用的那些聚合结构体,本领域的技术人员将能够容易地选择根据本发明使用的合适的聚合结构体。

[0268] 聚合结构体的特性因而将取决于偶联物分子的预期应用。根据本发明使用的示例性的聚合结构体包括多糖、聚醚、聚氨基酸(如多胺素)、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚(甲基)丙烯酸及其衍生物、聚氨酯和聚磷腈。通常,该聚合物包含至少 10 个单体单元。因此,例如,多糖通常包含至少 10 个单糖单元。

[0269] 两个特别优选的聚合分子是葡聚糖和聚乙二醇(“PEG”),以及这些分子的衍生物(例如,单甲氧基聚乙二醇,“mPEG”)。优选的是,PEG 或其衍生物具有的分子量为小于 20,000。优选的是,葡聚糖或其衍生物具有的分子量为 10,000 ~ 500,000。在一个优选的实施方式中,本发明的化合物包含药物等生物活性结构体和 PEG 或其衍生物。

[0270] 本文中使用的术语“氨基酸”是指同时包含胺官能团和羧基官能团的结构体。不过,所述氨基酸优选是 α -氨基酸。优选的是,所述氨基酸是蛋白氨基酸,即,选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天门冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、吡咯赖氨酸、硒代半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的氨基酸。不过,所述氨基酸也可以是非蛋白质的氨基酸。非蛋白质的氨基酸的实例包括羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、 γ -氨基丁酸、鸟氨酸、瓜氨酸、刀豆氨酸和含羞草碱。本发明的特别优选的氨基酸是半胱氨酸。

[0271] 本文中使用术语“肽”或“蛋白质”是指由氨基酸残基构成的聚合结构体。正如本领域的技术人员将知晓的,术语“肽”在本领域中通常用于表示长度相对较短的聚合物,而术语“蛋白质”在本领域中通常用于表示长度相对较长的聚合物。正如本文中使用的,约定在于肽包含至多 50 个氨基酸残基,而蛋白质包含多于 50 个氨基酸残基。不过,应当理解,这个区别并不重要,因为本申请中识别的功能性结构体通常表示肽或蛋白质。

[0272] 本文中使用的术语“多肽”可与“蛋白质”互换使用。

[0273] 正如本文中使用的,肽或蛋白质可包含任何天然的或非天然的氨基酸。例如,肽或蛋白质可仅含有 α -氨基酸残基,例如对应于天然 α -氨基酸。作为选择,肽或蛋白质也可以额外包含一个或多个化学修饰。例如,所述化学修饰可对应翻译后修饰,这是在蛋白质的翻译之后发生的蛋白质的体内修饰,例如酰化(如乙酰化)、烷基化(如甲基化)、酰胺化、生物素化、甲酰化、糖基化、糖化、羟基化、碘化、氧化、硫酸化或磷酸化。本领域的技术人员当然将认识到,该翻译后修饰的肽或蛋白质仍然构成本发明要义内的“肽”或“蛋白质”。例如,本领域中公认的是糖蛋白(具有一个或多个寡糖侧链的蛋白质)是一种蛋白质。

[0274] 本文中使用的术语“细胞”是指活体的单细胞。

[0275] 本文中使用的术语“糖”包括单糖和寡糖。通常,寡糖包含 2 至 9 个单糖单元。因

此,如本文中使用的,多糖被归类为“聚合结构体”,而非糖。不过,本领域的技术人员将理解,该区别并不重要,这是因为根据本发明使用的功能性结构体通常构成“糖”和“多糖”中的任一种。

[0276] 本文中使用的术语“DNA”是指由一个或多个核苷酸构成的脱氧核糖核酸。DNA 可以是单链的,也可以是双链的。优选的是,DNA 包含多于一个核苷酸。

[0277] 本文中使用的术语“RNA”是指包含一个或多个核苷酸的核糖核酸。优选的是,RNA 包含多于一个核苷酸。

[0278] 本文中使用的术语“偶联物”是指包含第一功能性结构体和第二功能性结构体的分子。所述第一功能性结构体和第二功能性结构体经本文中所述的交联剂结构体而相互共价连接。

[0279] 本文中使用的术语“基团”和“结构体”可以互换使用。

[0280] 本文中使用的术语“反应性基团”是指能够与第二分子上的官能团发生化学反应的第一分子上的官能团,由此第一分子与第二分子之间形成共价键。反应性基团包括离去基团、亲核基团和如本文中所述的其他的反应性基团。

[0281] 本文中使用的术语“亲电子的离去基团”是指与饱和的或不饱和的碳原子连接的取代基,其能够在对该碳原子进行的亲核攻击后被亲核试剂所取代。本领域的技术人员通常能够选择适合于定位在特定的化合物上并与特定的亲核试剂反应的亲电子的离去基团。

[0282] 本文中使用的术语“亲核试剂”是指能够通过供给电子对而形成化学键的官能团或化合物。

[0283] 本文中使用的术语“接头基团”是指能够使一个化学结构体与另一个化学结构体连接的基团。根据本发明使用的接头基团的特性并不重要。本领域的技术人员将认识到,接头基团通常用于构成偶联物分子。通常,用于本发明的接头基团是有机基团。挺长,该接头基团具有的分子量为 50 ~ 1000,优选为 100 ~ 500。根据本发明适合使用的接头基团的实例是本领域的公知常识,并描述于如“生物偶联技术”(Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996) 等标准参考书中,其内容以引用的方式全文并入本文中。

[0284] 本文中使用的术语“烷基”同时包括饱和直链烷基和支化烷基。优选的是,烷基是 C_{1-20} 烷基,更优选 C_{1-15} ,进而更优选 C_{1-12} 烷基,进而更优选 C_{1-6} 烷基,最优选 C_{1-4} 烷基。特别优选的烷基例如包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基和己基。对术语“亚烷基”应当相应地进行解释。

[0285] 本文中使用的术语“烯基”是指包含一个或多个碳碳双键的基团,其可以是支化的,也可以是不分支的。优选的是,烯基是 C_{2-20} 烯基,更优选 C_{2-15} 烯基,进而更优选 C_{2-12} 烯基,或优选 C_{2-6} 烯基,最优选 C_{2-4} 烯基。对术语“亚烯基”应当相应地进行解释。

[0286] 本文中使用的术语“炔基”是指包含一个或多个三键的碳链,其可以是支化的,也可以是不分支的。优选的是,炔基是 C_{2-20} 炔基,更优选 C_{2-15} 炔基,进而更优选 C_{2-12} 炔基,或优选 C_{2-6} 炔基,最优选 C_{2-4} 炔基。对术语“亚炔基”应当相应地进行解释。

[0287] 除非另作说明,烷基、烯基或炔基通常都不具有取代基。不过,该基团被表示为不具有取代基或具有取代基时,一个或多个氢原子可选地由卤素原子或磺酸基团所替代。优选的是,具有取代基的烷基、烯基或炔基具有 1 ~ 10 个取代基,更优选 1 ~ 5 个取代基,进而更优选 2 或 3 个取代基,最优选 1 或 2 个取代基,例如,1 个取代基。优选的是,具有取代基

的烷基、烯基或炔基具有不超过 2 个磺酸取代基。卤素原子是优选的取代基。不过,烷基、烯基或炔基优选不具有取代基。

[0288] 在作为烷基、烯基或炔基或者亚烷基、亚烯基或亚炔基的结构体中,其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子可以由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代,和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团可以由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团替代,总共 0、1 或 2 个、更优选总共 0 或 1 个所述碳原子和 $-CH_2-$ 基团优选被替代。最优选的是,碳原子和 $-CH_2-$ 基团中没有有一个被替代。

[0289] 用于替代 $-CH_2-$ 基团的优选基团是 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-C(O)-$ 基团。用于替代碳原子的优选基团是亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、 C_{5-6} 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基。正如本文中使用的,提及的“0、1 或 2 个碳原子”是指烷基、烯基或炔基链中的任何末端或非末端的碳原子,包括与该碳原子连接的任何氢原子。正如本文中使用的,提及的“0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团”是指不对应烷基、烯基或炔基链中的末端碳原子的基团。

[0290] 正如本文中使用的, C_{6-10} 芳基是具有 6 ~ 10 个碳原子的单环的或多环的 6 至 10 元芳香烃环体系。优选苯基。对术语“亚芳基”应当相应地进行解释。

[0291] 正如本文中使用的,5 元至 10 元杂芳基是单环或多环的 5 至 10 元芳香环体系,例如 5 元环或 6 元环,其含有至少一个杂原子,例如,1、2、3 或 4 个杂原子,所述杂原子选自 O、S 和 N。当环包含 4 个杂原子时,这些杂原子优选都是氮原子。对术语“杂亚芳基”应当相应地进行解释。

[0292] 单环杂芳基的实例包括噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、噻重氮基、噁二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基和四唑基。

[0293] 多环杂芳基的实例包括苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并三唑基、吲哚基、异吲哚基和吲唑基。优选的多环基团包括吲哚基、异吲哚基、苯并咪唑基、吲唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基和苯并异噻唑基,更优选苯并咪唑基、苯并噁唑基和苯并噻唑基,最优选苯并噻唑基。不过,优选单环杂芳基。

[0294] 优选的是,杂芳基是 5 元至 6 元杂芳基。特别优选的杂芳基是噻吩基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基和吡嗪基。更优选的基团是噻吩基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吡咯基和三嗪基,最优选吡啶基。

[0295] 正如本文中使用的,5 元至 10 元杂环基是非芳香族的、饱和的或不饱和的、单环的或多环的 C_{5-10} 碳环环体系,其中一个或多个,例如 1、2、3 或 4 个碳原子由选自 N、O、S、 $S(O)$ 和 $S(O)_2$ 的结构体替代。优选的是,5 元至 10 元杂环基是 5 元至 6 元环。术语“杂环烯基”应当相应地解释。

[0296] 杂环基的实例包括氮杂丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、噻唑烷基、异噻唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、二噻茂烷基、二氧戊环基、吡唑烷基、哌啶基、哌嗪基、六氢嘧啶基、亚甲二氧基苯基、乙烯二氧基苯基、硫代吗啉基、S-氧代-硫代吗啉基、S, S-二氧代-硫代吗啉基、吗啉基、1,3-二氧戊环基、1,4-二氧戊环基、三氧杂环戊烷基、三噻烷基、咪唑啉基、吡

喃基、吡唑啉基、硫代氧戊环基、硫代噻唑烷基、1H-吡唑-5-(4H)-亚硫酰基、1,3,4-噻重氮-2(3H)-亚硫酰基、氧代吡咯烷基、氧代噻唑烷基、氧代吡唑烷基、琥珀酰亚胺基和马来酰亚胺基等基团和结构体。优选的杂环基是吡咯烷基、咪唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、噻唑烷基、异噻唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、二噻茂烷基、二氧戊环基、吡唑烷基、哌啶基、哌嗪基、六氢嘧啶基、硫代吗啉基和吗啉基等基团和结构体。更优选的杂环基是四氢吡喃基、四氢硫代吡喃基、硫代吗啉基、四氢呋喃基、四氢硫代吡喃基、哌啶基、吗啉基和吡咯烷基。

[0297] 为免疑问,尽管以上对于杂芳基和杂环基的限定指的是能够存在于环中的“N”结构体,不过对于一个化学领域技术人员显而易见的是如果N原子经单键连接于相邻环原子中的每一个则其将是质子化的(或将具有如下限定的取代基)。

[0298] 正如本文中使用的, C_{3-7} 碳环烯基是具有3~7个碳原子的非芳香族的、饱和的或不饱和的烃环。优选的是,其是具有3~7个碳原子,更优选具有5~6个碳原子的饱和的或单不饱和的烃环(即,环烷基结构体或环烯基结构体)。其实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基以及它们的单不饱和变体。特别优选的碳环基团是环戊基和环己基。术语“碳环烯基”应当相应地解释。

[0299] 特别指明,碳环基或杂环基中的0、1或2个碳原子可以由-C(O)-基团替代。正如本文中使用的,被替代的“碳原子”应理解为包含它们所连的氢原子。当1或2个碳原子被替代时,优选的是所述两个碳原子被替代。优选的这类碳环基团包括苯醌基团,优选的这类杂环基团包括琥珀酰亚胺基和马来酰亚胺基。

[0300] 除非另作说明,芳基、杂芳基、碳环基或杂环基通常都不具有取代基。不过,在指明该基团不具有取代基或具有取代基时,一个或多个氢原子可以选择性地由卤素原子或 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、-N(C_{1-6} 烷基)(C_{1-6} 烷基)、硝基和磺酸基取代。优选的是,具有取代基的芳基、杂芳基、碳环基或杂环基具有1~4个取代基,更优选1~2个取代基,最优选1个取代基。优选的是,具有取代基的芳基、杂芳基、碳环基或杂环基具有不超过2个硝基取代基和不超过2个磺酸基取代基。优选的取代基是卤素原子和 C_{1-4} 烷基以及 C_{1-4} 烷氧基。特别优选的取代基是卤素原子。不过,芳基、杂芳基、碳环基或杂环基优选不具有取代基。

[0301] 正如本文中使用的,卤素原子通常是F、Cl、Br或I原子,优选Br或Cl原子,更优选Br原子。

[0302] 正如本文中使用的, C_{1-6} 烷氧基是与氧原子连接的 C_{1-6} 烷基(例如, C_{1-4} 烷基)。

[0303] 正如本文中使用的, C_{1-6} 烷硫基是与硫原子连接的 C_{1-6} 烷基(例如, C_{1-4} 烷基)。

[0304] 正如本文中使用的,5元至10元杂环硫基是与硫原子连接的5元至10元(例如,5元至6元)杂环基。

[0305] 正如本文中使用的, C_{6-10} 芳硫基是与硫原子连接的 C_{6-10} 芳基(例如,苯基)。

[0306] 正如本文中使用的, C_{3-7} 碳环硫基是与硫原子连接的 C_{3-7} 碳环基(例如, C_{5-6} 碳环基)。

[0307] 在本发明中,式(I)的结构体构成了能够使含有硫醇的第一功能性结构体与第二功能性结构体连接在一起的交联反应性结构体。

[0308] 优选的是,X和X'相同或不同,并各自表示氧、硫或式=NQ的基团。更优选的是,

X 和 X' 相同或不同,并各自表示氧或硫。优选的是,X 和 X' 中的至少一个表示氧。最优选的是,X 和 X' 均为氧。

[0309] Y 优选是卤素原子或三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺基、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基、C₁₋₆ 烷基、5 元至 10 元杂环烷基、C₆₋₁₀ 芳基、C₃₋₇ 碳环烷基、-OC(O)CH₃、-OC(O)CF₃、苯氧基、-NR_xR_yR_z⁺ 或 -PR_xR_yR_z⁺ 基团。更优选的是,Y 是卤素原子或三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺基、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基、C₁₋₆ 烷基、5 元至 10 元杂环烷基、C₆₋₁₀ 芳基或 C₃₋₇ 碳环烷基。进而更优选的是 Y 是卤素原子或 C₁₋₆ 烷基、5 元至 10 元杂环烷基、C₆₋₁₀ 芳基或 C₃₋₇ 碳环烷基。最优选的是 Y 是卤素原子,特别是溴原子。

[0310] R_x、R_y 和 R_z 各自优选选自氢原子和 C₁₋₆ 烷基。更优选的是,R_x、R_y 和 R_z 各自优选选自氢原子和甲基和乙基。优选的是,在特定的 -NR_xR_yR_z⁺ 或 -PR_xR_yR_z⁺ 基团中,R_x、R_y 和 R_z 相同。

[0311] 式 R₁-H 的化合物包含至少第一硫醇,SH。在本发明中,该第一硫醇能够通过 2- 位的亲核攻击与式 (I) 的结构体反应。式 R₁-H 的化合物与式 (I) 的结构体的反应得到了其中在式 (I) 的结构体的 2- 位的式 Y 的亲电子的离去基团被式 R₁ 的基团所取代的结构体。更具体而言,式 R₁ 的基团通过源自式 R₁-H 的对应化合物上的第一 SH 基团的式 -S- 的硫醇键而连接至 2- 位。因此,显而易见的是,R₁-H 的第一硫醇 SH 中的氢原子构成了与式 R₁ 的基团连接的氢原子。因而,当 R₁ 与交联剂相连时,该第一硫醇中的氢原子丢失从而形成了 R₁ 与交联剂之间的 -S- 键。

[0312] R₁ 可以是式 -S-L-F₁ 的基团,在该情况中第一硫醇中的硫原子与式 L 的接头基团连接。因此,在该实施方式中,显然交联剂可用于提供能够与式 (I) 的结构体反应的硫醇,该接头基团随后与不包含该硫醇的第一功能性结构体连接。不过,优选的是,R₁ 是式 F₁ 的基团,更特别是第一功能性结构体,该第一功能性结构体包含第一 SH 基团以及式 R₁-H 的化合物中的与其连接的 H 原子。

[0313] 在优选的实施方式中,第一功能性结构体和第二功能性结构体中的至少一个是酶学活性结构体、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、氨基酸、肽、蛋白质、糖、DNA 或 RNA。优选的是,所述第一功能性结构体是酶学活性结构体、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、氨基酸、肽、蛋白质、糖、DNA 或 RNA。第一功能性结构体 / 第二功能性结构体的优选组合包括下表 1 中列出的那些。

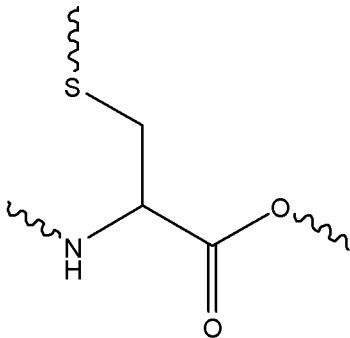
[0314]

第一或第二功能性结构体	第二或第一功能性结构体
抗体或抗体片段、氨基酸、肽、蛋白质、DNA 或 RNA	可检测结构体
半抗原	免疫原性载体
抗体或抗体片段	酶学活性结构体(优选为酶)
抗体或抗体片段	生物活性结构体，例如细胞毒剂或细胞毒素前体
可检测结构体、酶学活性结构体、抗体或抗体片段、抗原、半抗原、生物活性结构体、氨基酸、肽、蛋白质、DNA 或 RNA	脂质体
酶学活性结构体、抗体或抗体片段、抗原、氨基酸、肽、蛋白质、DNA 或 RNA	亲和标签
生物活性结构体	聚合结构体
酶学活性结构体	DNA 或 RNA

[0315] 表 1 :第一功能性结构体 / 第二功能性结构体的优选组合

[0316] 在特别优选的实施方式中， R_1 是式 F_1 的基团， F_1 是包含至少第一半胱氨酸残基的肽或蛋白质。为避免产生疑问，肽或蛋白质中的半胱氨酸残基是下式的残基，

[0317]



[0318] 其中，在式 R_1-H 的化合物中，肽或蛋白质通过半胱氨酸残基的硫原子与氢原子连接。在该实施方式中，应当理解“第一半胱氨酸残基”是指位于肽或蛋白质上的能够与式 (I) 的结构体反应的位置的半胱氨酸残基。更具体而言，经由第一半胱氨酸残基的硫醇对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而使基团 R_1 与式 (I) 的结构体连接，由此基团 Y 被基团 R_1 中的第一半胱氨酸残基中的硫醇所替代。

[0319] 在本发明的特别优选的实施方式中，当 R_1 是式 F_1 的基团，且 F_1 是包含至少第一半胱氨酸残基的肽或蛋白质时， R_1 还包含至少第二半胱氨酸残基。为避免产生疑问，所述第二半胱氨酸残基位于肽或蛋白质上的使其也能够与式 (I) 的结构体反应的的位置。此外，在该实施方式中，式 (I) 的结构体是式 (Ia) 的化合物，其中，基团 R_2 是式 Y 的亲电子的离去基团。基团 R_1 随后经第二半胱氨酸残基的硫醇对式 (Ia) 的结构体的 3- 位的亲核攻击而进一步连接式 (Ia) 的化合物，以致基团 R_2 被基团 R_1 中的第二半胱氨酸残基中的硫醇取代。当第一功能性结构体是包含二硫桥键的肽或蛋白质时本发明的该实施方式特别有用，这是因为其允许通过二硫桥键来加入交联剂。优选的是，当包含二硫桥键的肽或蛋白质与式 (I) 的结构体反应时，使用本领域中已知的技术首先还原二硫桥键。例如，通过使用 (三 (2- 羧

乙基) 膦) 等标准膦试剂或通过进行硫醇-二硫化物交换反应来进行该还原反应。

[0320] 二硫化物基团的还原可通过与诸如膦、硫醇或氢化物试剂等还原剂的反应来进行。优选的还原剂是三(2-羧乙基) 膦、谷胱甘肽、2-巯基乙醇和二硫苏糖醇。优选的一组试剂是 1,2-乙二硫醇、2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、谷胱甘肽和三(2-羧乙基) 膦。

[0321] 将是显而易见的是, 式 (I) 的结构体表示根据本发明允许含有硫醇的功能性结构体与第二种功能性结构体偶联的关键反应性结构体。因此, 包含式 (I) 的结构体的化合物可以用作用于连接第一功能性结构体与第二功能性结构体的试剂。在式 (I) 的结构体 (以及式 (II) 的结构体, 如别处详细描述) 中, 符号

[0322]



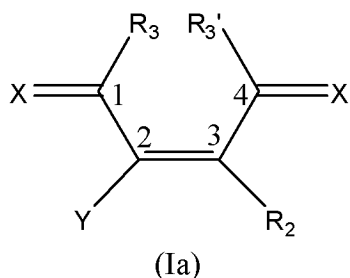
[0323] 是指与另一基团连接的点。应当理解, 经由这些连接点而连接的基团的识别对于本发明并不重要。本领域的技术人员将容易地理解, 例如, 基于待连接在一起的功能性结构体的特定特性将有可能选择经由这些连接点所连接的基团以适应特定的目的。正如本领域的技术人员所熟知的, 常规设计交联剂以使其具有适合于与具有特定反应性基团的功能性结构体反应的官能团, 并且被接头基团 (在反应中通常不具有重要作用) 隔开。本领域的技术人员将即刻理解, 式 (I) 的结构体能够容易地结合到常规交联剂中, 例如, 通过取代设计为与硫醇团反应的常规结构体 (例如马来酰亚胺基团)。关于设计适合于适用该方式的交联剂的详细信息例如可在“生物偶联技术” (Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996) 中找到, 其内容以引用的方式全文并入本文中。

[0324] 式 (I) 的结构体能够将至少第一功能性结构体与第二功能性结构体连接在一起。当包含式 (I) 的结构体的交联剂化合物除了式 (I) 的结构体之外不包含任何反应性基团时, 则第一功能性结构体能够在 2-位发生反应以替代离去基团 Y, 第二功能性结构体随后通过 2-位与 3-位之间的碳碳双键上的亲电子加成而加入。作为选择, 交联剂也可以包含一个或多个能够与另外的功能性结构体反应的其他反应性基团。

[0325] 在另一个实施方式中, 第二功能性结构体可以是包含烯烃结构体的结构体, 并且能够通过进行与式 (I) 的结构体的 2-位与 3-位之间的碳碳双键的光催化 [2+2] 环加成而与式 (I) 的结构体连接。该过程得到了包含来自式 (I) 的结构体的 2-位和 3-位碳原子的环丁烷的环结构体, 而且其中碳碳双键已经饱和。

[0326] 优选的是, 本发明的包含式 (I) 的结构体的化合物是式 (Ia) 的化合物,

[0327]



[0328] 其中:

[0329] -X 和 X' 相同或不同, 并各自表示氧、硫或式 = NQ 的基团, 其中 Q 是氢、羟基、C₁₋₆ 烷基或苯基;

[0330] - ;

[0331] $-R_3$ 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;

[0332] 或

[0333] $-R_3$ 和 R_3' 共同以形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33'})$ 的基团, 其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ; 或

[0334] $-R_3$ 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33'})-N(R_{33'})-$ 的基团, 其中各个 $R_{33'}$ 相同或不同, 并表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;

[0335] $-R_2$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ;

[0336] - 式 E 和 Y 的各基团相同或不同, 并表示亲电子的离去基团 ;

[0337] - 式 Nu 的各基团相同或不同, 并表示选自 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NH(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的亲核试剂 ;

[0338] - 式 L 的各基团相同或不同, 并表示接头基团 ;

[0339] - 式 Z 的各基团相同或不同, 并表示与式 L 的基团连接的反应性基团, 所述反应性基团能够与包含如权利要求 1 中所限定的第二功能性结构体的化合物反应以使所述第二功能性结构体与式 L 的所述基团相连 ;

[0340] $-n$ 为 1、2 或 3 ; 和

[0341] - 式 IG 的各基团相同或不同, 并表示 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基的结构体, 其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基, 并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C_{6-10} 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、 C_{3-7} 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团取代, 和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})-$ 的基团取代, 其中 :

[0342] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ ($C_{1-6} \text{ 烷基}$)、硝基和磺酸基的取代基 ; 和

[0343] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 $-C(O)-$ 基团取代。

[0344] 优选的是, 在式 (Ia) 的化合物中, R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团 ; 或 R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团, 其中, $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。

[0345] 式 (Ia) 中的优选基团 X、X' 和 Y 如以上所限定。

[0346] 当 R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团时, 优选的是 R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示式 E、Nu、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。在该实施方式中, R_3 和 R_3' 中的至少一个表示式 E、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团。

[0347] 优选的是 R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团。

[0348] $R_{33'}$ 优选表示氢原子或式 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。特别优选的 $R_{33'}$ 基团是氢原子和式 IG 的基团。最优选的是, $R_{33'}$ 是氢原子或 C_{1-6} 烷基。

[0349] R_2 优选是氢原子或式 Y、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。更优选的是, R_2 优选为氢原子或式 Y 或 IG 的基团。最优选的是, R_2 是氢或卤素原子或 C_{1-6} 烷基。

[0350] E 优选是卤素原子或 C_{1-6} 烷氧基、硫醇、 C_{1-6} 烷硫基、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基})$ ($C_{1-6} \text{ 烷基}$)、三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、N- 羟基琥珀酰亚胺基、N- 羟基磺基琥珀酰亚胺基、咪唑

基、苯氧基或硝基苯氧基。式 E 的更优选的基团是卤素原子和三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐和甲磺酸盐基团。

[0351] Nu 优选是式 -OH 或 -SH 的基团。在另一个实施方式中, Nu 优选是式 -OH、-NH₂ 或 -SH 的基团, 更优选 -NH₂ 或 -SH。

[0352] 连接剂结构体 L 将本发明的化合物中的两个其他结构体连接在一起 (即, 其至少是二价结构体)。不过, 在一些实施方式中, 某些连接剂结构体 L 可以将多于两个的其他结构体连接在一起 (例如, R₂、R₃、R₃' 或 R₃₃' 表示 -L(Z)_n 时, 其中 n 为 2 或 3), 在该情况中应当理解第三个其他结构体和任何另一个其他结构体各自取代相应的二价连接剂结构体 L 上的氢原子。

[0353] L 优选表示作为 C₁₋₂₀ 亚烷基、C₂₋₂₀ 亚烯基或 C₂₋₂₀ 亚炔基的结构体, 其不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和磺酸基团的取代基, 并且其中 (a) 0、1 或 2 个碳原子由选自 C₆₋₁₀ 亚芳基、5 元至 10 元杂亚芳基、C₃₋₇ 碳环烯基和 5 元至 10 元杂环烯基的基团替代, 和 (b) 0、1 或 2 个 -CH₂- 基团由选自 -O-、-S-、-S-S-、-C(O)- 和 -N(C₁₋₆ 烷基)- 的基团替代, 其中:

[0354] (i) 所述亚芳基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或多个选自卤素原子和 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷硫基、-N(C₁₋₆ 烷基)(C₁₋₆ 烷基)、硝基和磺酸基的取代基; 和

[0355] (ii) 所述碳环烯基和杂环烯基中的 0、1 或 2 个碳原子由 -C(O)- 基团替代。

[0356] 更优选的是, L 表示作为不具有取代基的 C₁₋₆ 亚烷基、C₂₋₆ 亚烯基或 C₂₋₆ 亚炔基的结构体, 其中 (a) 0 或 1 个碳原子由选自亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、C₅₋₆ 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基的基团替代, 其中所述杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或两个选自卤素原子和 C₁₋₄ 烷基和 C₁₋₄ 烷氧基的取代基, 和 (b) 0、1 或 2 个 -CH₂- 基团由选自 -O-、-S- 或 -C(O)- 基团的基团替代。

[0357] 最优选的是, L 是作为不具有取代基的 C₁₋₄ 亚烷基, 其中 0 或 1 个碳原子由不具有取代基的亚苯基替代。

[0358] Z 表示与式 L 的基团连接的反应性基团, 其能够与功能性结构体反应以使该功能性结构体与式 L 的基团连接。正如本领域的技术人员将理解的, 反应性基团本身的性质并不重要。在本领域中目前常规使用范围非常广泛的反应性基团用于使功能性结构体与交联剂连接。该反应性基团例如能够使胺化合物、硫醇化合物、羧基化合物、羟基化合物、羰基化合物或含有反应性氢的化合物与交联剂连接。当然, 本领域的技术人员将即刻认识到任何这样的反应性基团将适合于根据本发明使用。根据“生物偶联技术”(Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996) 等标准课本, 本领域的技术人员能够由公知常识来选择合适的反应性基团, 其内容以引用的方式全文并入本文中。

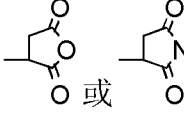
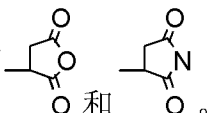
[0359] Z 优选是:

[0360] (a) 式 -LG、-C(O)-LG、-C(S)-LG 或 -C(NH)-LG 的基团, 其中 LG 是亲电子的离去基团;

[0361] (b) 选自 -OH、-SH、-NH₂、-NH(C₁₋₆ 烷基) 和 -C(O)NHNH₂ 基团的亲核试剂 Nu';

[0362] (c) 环状结构体 Cyc, 其能够与亲核试剂进行开环亲电子反应;

[0363] (d) 式 -S(O₂)(Hal) 的基团, 其中 Hal 是卤素原子;

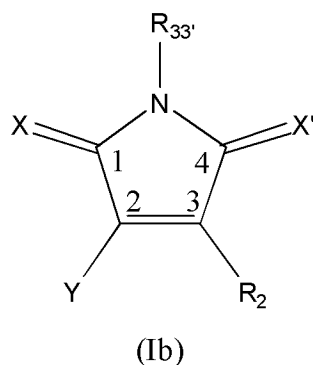
- [0364] (e) 式 $-N=C=O$ 或 $-N=C=S$ 的基团；
- [0365] (f) 式 $-S-S(IG')$ 的基团，其中式 IG' 表示如本文中限定的式 IG 的基团；
- [0366] (g) 基团 AH ，其是取代有一个或多个卤素原子的 C_{6-10} 芳基；
- [0367] (h) 能够通过暴露在紫外光下而活化的光反应性基团；
- [0368] (i) 式 $-C(O)H$ 或 $-C(O)(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 的基团；
- [0369] (j) 马来酰亚胺基团；
- [0370] (k) 式 $-C(O)CHCH_2$ 的基团；
- [0371] (l) 式 $-C(O)C(N_2)H$ 或 $-PhN_2^+$ 的基团，其中 Ph 表示苯基；或
- [0372] (m) 环氧化物基团。
- [0373] 最优选的是， Z 选自：
- [0374] (a) 式 $-LG$ 、 $-C(O)-LG$ 、 $-C(S)-LG$ 的基团，其中 LG 选自卤素原子和 $-O(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-SH$ 、 $-S(C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、 N -羟基琥珀酰亚胺基和 N -羟基磺基琥珀酰亚胺基；
- [0375] (b) 式 $-OH$ 、 $-SH$ 和 $-NH_2$ 的基团；
- [0376] (c) 式基团  的基团；和
- [0377] (d) 马来酰亚胺基团。
- [0378] LG 优选选自卤素原子和 $-O(IG')$ 、 $-SH$ 、 $-S(IG')$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(IG')$ 、 $-N(IG')$ (IG'')、 $-N_3$ 、三氟甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、 N -羟基琥珀酰亚胺基、 N -羟基磺基琥珀酰亚胺基、咪唑基和叠氮化物基团，其中， IG' 和 IG'' 相同或不同，并各自表示式 IG 的基团。
- [0379] Nu' 优选选自 $-OH$ 、 $-SH$ 和 $-NH_2$ 基团。
- [0380] Cyc 优选选自基团  和
- [0381] Hal 优选是氯原子。
- [0382] AH 优选是取代有至少一个氟原子的苯基。
- [0383] 光反应性基团优选选自：
- [0384] (a) C_{6-10} 芳基，所述 C_{6-10} 芳基取代有至少一个式 $-N_3$ 的基团并选择性还取代有一个或多个卤素原子；
- [0385] (b) 苯甲酮基团；
- [0386] (c) 式 $-C(O)C(N_2)CF_3$ 的基团；和
- [0387] (d) 式 $-PhC(N_2)CF_3$ 的基团，其中 Ph 表示苯基。
- [0388] n 优选是 1 或 2，最优选是 1。
- [0389] IG 优选表示作为不具有取代基的 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基或 C_{2-6} 炔基的结构体，其中 (a) 0 或 1 个碳原子由选自亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、 C_{5-6} 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基的基团替代，其中所述亚苯基、杂亚芳基、碳环烯基和杂环烯基不具有取代基或取代有一个或两个选自卤素原子和 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基的取代基，和 (b) 0、1 或 2 个 $-CH_2-$ 基团由选自 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-C(O)-$ 基团的基团替代。

[0390] 更优选的是, IG 表示作为不具有取代基的 C_{1-6} 烷基的结构体, 其中 (a) 0 或 1 个碳原子由选自不具有取代基的亚苯基、5 元至 6 元杂亚芳基、 C_{5-6} 碳环烯基和 5 元至 6 元杂环烯基的基团取代。

[0391] 最优选的是, IG 表示不具有取代基的 C_{1-6} 烷基。

[0392] 优选的是, 式 (Ia) 的化合物是式 (Ib) 的化合物,

[0393]



[0394] 其中, X 、 X' 、 Y 、 R_2 和 $R_{33'}$ 均如本文中所限定。

[0395] 在式 (Ib) 的化合物中, 优选的是:

[0396] $-X$ 和 X' 各自表示氧原子;

[0397] $-R_{33'}$ 表示氢原子或 C_{1-6} 烷基;

[0398] $-Y$ 表示卤素原子; 和

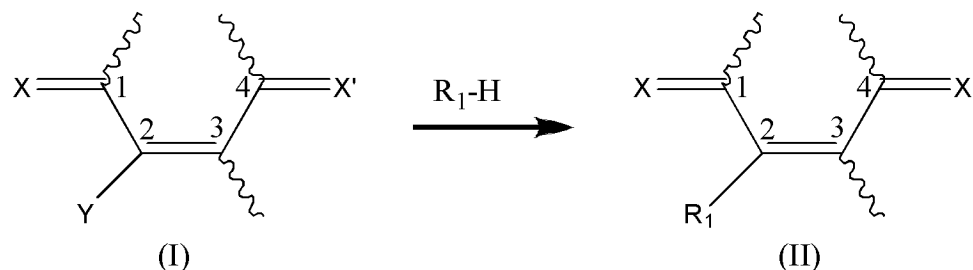
[0399] $-R_2$ 表示氢或卤素原子或 C_{1-6} 烷基。

[0400] 本发明的实施方式 (1) 涉及以上所限定的包含式 (I) 的结构体的化合物作为试剂用来把包含式 F_1 的第一功能性结构体的式 R_1-H 的化合物连接至式 F_2 的第二功能性结构体的应用。通常, 该应用涉及执行如以下描述的实施方式 (2) 或实施方式 (3) 中所限定的本发明的方法。

[0401] 优选的是, 在实施方式 (1) 的应用中, 如果式 R_1-H 的化合物是 2- 巯基乙醇, 则包含式 (I) 的结构体的化合物不是二溴代马来酸。

[0402] 本发明的实施方式 (2) 涉及用于产生偶联物的方法。在该方法的步骤 (i) 中, 包含式 (I) 的结构体的化合物与式 R_1-H 的化合物反应以制造包含式 (II) 的结构体的化合物:

[0403]



[0404] 该步骤 (i) 涉及经由式 R_1-H 的化合物中的第一 SH 基团对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击而连接所述基团 R_1 , 以使 2- 位的基团 Y 被基团 R_1 替代。

[0405] 在实施方式 (2) 的方法的步骤 (ii) 中, 式 F_2 的结构体与式 (II) 的所述结构体连接, 由此制得偶联物。一些过程用来执行步骤 (ii), 例如在以下的段落 (a)、(b)、(c) 和 (d) 中所陈述的那些:

[0406] (a) 所述方法可包括经由对式 (I) 的 2- 位和 3- 位之间的碳碳双键的 F_2 的亲电子加成反应而使 F_2 连接至式 (II) 的结构体。

[0407] (b) 包含式 (I) 的结构体的化合物是式 (Ia) 的化合物, R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团, 并且 $R_{33'}$ 表示氢原子或式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团时, 所述方法可包括经由 F_2 与 (i) 式 $-N(R_{33'})$ 的结构体的氮原子或 (ii) 式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的所述基团之间的反应而使 F_2 连接至式 (II) 的结构体。

[0408] (c) 包含式 (I) 的结构体的化合物是式 (Ia) 的化合物, R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-N(R_{33'})$ 的基团, 并且 R_3 和 R_3' 中的至少一个表示式 E、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团时, 所述方法可包括经由 F_2 与式 E、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的所述基团之间的反应而使 F_2 连接至式 (II) 的结构体。

[0409] (d) 包含式 (I) 的结构体的化合物是式 (Ia) 的化合物且 R_2 表示式 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的基团时, 所述方法可包括经由 F_2 与 Y、Nu 或 $-L(Z)_n$ 的所述基团之间的反应而使 F_2 连接至式 (II) 的结构体。

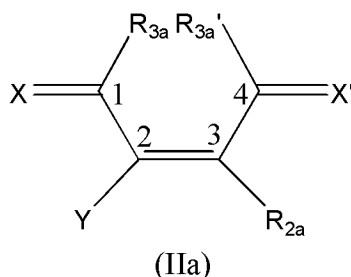
[0410] 在另一个实施方式中, 通过实现式 F_2 的结构体上的烯烃基团与式 (II) 的 2- 位与 3- 位之间的碳碳双键的光催化 [2+2] 环加成而使式 F_2 的结构体与式 (II) 的结构体连接。该过程得到了包含来自式 (II) 的结构体的 2- 位和 3- 位碳原子的环丁烷的环结构体, 而且其中碳碳双键已经饱和。

[0411] 在又一个实施方式中, 当 R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-O-$ 的基团并且式 F_2 的结构体具有诸如伯胺或仲胺基团等亲核基团时, 式 F_2 的结构体可通过进行亲核的开环反应及随后的亲核闭环反应而与式 (II) 的结构体连接。例如, 当 X 和 / 或 X' 为 O 且 R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-O-$ 的基团时, 式 (II) 的结构体是环酸酐。因此, 可以看出, 例如具有胺基的式 F_2 的结构体能够进行亲核的开环随后进行亲核的闭环, 总体效果为基团 $-O-$ 被基团 $-N-$ (功能性结构体) 替代。

[0412] 本发明的实施方式 (3) 提供了用于产生偶联物的替代性方法。在该方法中, 式 R_1-H 的化合物与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的式 F_2 的至少一个结构体的化合物反应。该方法涉及经由式 R_1-H 的化合物的第一 SH 基团对式 (I) 的结构体的 2- 位的亲核攻击来连接基团 R_1 , 以使位于 2- 位的基团 Y 由基团 R_1 替代。

[0413] 优选的是, 根据以上描述的实施方式 (3) 的方法, 包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的式 F_2 的至少一个结构体的化合物是式 (IIa) 的化合物,

[0414]



[0415] 其中：

[0416] -：

[0417] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3'

的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;或

[0418] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;或

[0419] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团,其中,各 $R_{33a'}$ 相同或不同,并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

[0420] $-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

[0421] $-m$ 为具有 0 至 n 的值的整数 ;

[0422] $-$ 式 (IIa) 的化合物包含至少一个式 F_2 的基团 ;而且

[0423] $-F_2$ 、 X 、 X' 、 R_3 、 R_3' 、 $R_{33'}$ 、 R_2 、 L 、 Z 和 n 均如本文中所限定。

[0424] 优选的是,根据以上描述的实施方式 (3) 的方法, R_{3a} 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团,并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团,或 R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团。

[0425] 正如对于本领域的技术人员明确的是,式 (IIa) 的化合物与如上所述的式 (II) 的化合物有关。不过,式 (IIa) 的化合物包含至少一个功能性结构体 F_2 。因此,通过使用本领域中常规已知的方法使功能性结构体 F_2 与和其对应的式 (II) 的化合物连接,能够容易地制备式 (IIa) 的化合物。

[0426] 优选的是,根据以上描述的实施方式 (3) 的方法,包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个式 F_2 的结构体的化合物是式 (IIa) 的化合物,其中 :

[0427] $-$:

[0428] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 的基团,并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 的基团 ;或

[0429] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中 $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 的基团 ;和

[0430] $-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 的基团。

[0431] 优选的是,式 (IIa) 的化合物包含至多三个式 F_2 的基团,更优选一个或两个式 F_2 的基团,最优选一个式 F_2 的基团。

[0432] 显然,在执行了本发明的实施方式 (2) 或 (3) 的方法之后,一个或更多个其他的反应性基团可以保留在偶联产物上 (包括位于相当于交联剂的 2- 位和 3- 位的位置的碳碳双键,以及其他的亲核基团、亲电子基团和式 Z 的反应性基团)。因此,在其他方面中,本发明的实施方式 (2) 和 (3) 的方法还包括使一个或更多个其他的功能性结构体与所述偶联物连接,其中每一个其他的功能性结构体相同或不同,并选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

[0433] 在实施方式 (2) 和 (3) 的方法中发生的化学反应可以通过使用用来连接交联剂和功能结构体的本领域中已知的常规技术来进行,例如描述于“生物偶联技术”(Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996) 中的那些,其被容以引用的方式全文并入本文中。在本说明中的实施例结构体中可以找到用于执行该反应的适宜条件的其他实例。

[0434] 正如将被本领域的技术人员所理解的,试剂 (例如,具有功能性结构体的化合物

或交联剂)具有多于一个的反应性基团时,理想的是对不意图参与反应的反应性基团进行化学保护。例如,可能必须要保护羟基、氨基和羧基等基团,这些基团都是在最终产物中所需要的基团,由此避免它们不必要地参与到反应中(例如,参见 Greene, T. W., "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1999)。常规的保护基团可以结合标准惯例来使用。在一些情况中,脱保护可能用于中间步骤或最终步骤,因此本文中描述的本发明的实施方式(2)和(3)的方法应理解为延伸至添加和除去这些保护基团。

[0435] 优选的是,在实施方式(2)中,如果式 R_1-H 的化合物是 2-巯基乙醇,则包含式(I)的结构体的化合物不是二溴代马来酸。

[0436] 优选的是,在实施方式(3)中,如果式 R_1-H 的化合物是 2-巯基乙醇,则包含(a)式(I)的结构体和(b)与其连接的式 F_2 的至少一个结构体的化合物不是 N-苯基-3,4-二溴代马来酸,其中 N-苯基具有取代基或不具有取代基。

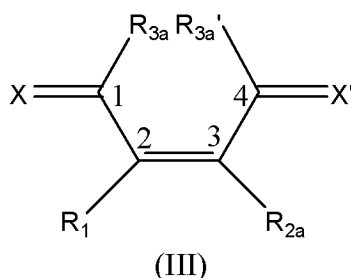
[0437] 应当理解,在一些实施方式中,根据实施方式(2)或(3)的方法产生的偶联物将包含马来酰亚胺环。具体而言,当在式(I)的结构体中位于 1 位和 4 位的碳原子经基团 $-N(R_{33'})$ 连接在一起时将会出现上述情况。偶联物包含马来酰亚胺环时,实施方式(2)或(3)的方法还可包括进行所述马来酰亚胺环的开环。马来酰亚胺环的开环可通过本领域中已知的水解反应来实现。马来酰亚胺的开环在某些应用中是有利的,因为这能够使得功能性结构体不可逆地连接所述偶联物。

[0438] 在实施方式(4)中,本发明涉及使含有硫醇的功能性结构体与交联剂怒分(其可以额外地连接一个或多个其他的功能性结构体)之间形成的键断裂的方法。更具体而言,对包含式(II)的结构体的化合物实现断裂。

[0439] 实施方式(4)的方法特别有用的技术的实例通常包括蛋白质纯化、蛋白质组学分析和用于探测酶的结合点的方法。在实施方式(4)的方法的优选实施方式中,式 F_1 的第一功能性结构体是蛋白质,尤其是昂贵的或费时才能获得的蛋白质(例如,GPCR 蛋白质)。在实施方式(4)的方法的另一个优选的实施方式中,式 F_1 的第一功能性结构体是生物活性结构体(如药物),因为此处该方法可用于例如药物递送方法。

[0440] 在实施方式(4)的方法的第一优选实施方式中,包含式(II)的结构体的化合物是式(III)的化合物,

[0441]



[0442] 其中:

[0443] -:

[0444] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团,并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团;或

[0445] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团,其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或

式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

[0446] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团, 其中, 各 $R_{33a'}$ 相同或不同并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

[0447] $-R_{2a}$ 表示式 R_2 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

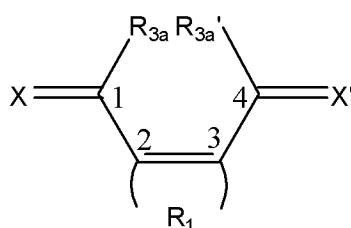
[0448] $-m$ 是具有 0 至 n 的值的整数 ;

[0449] $-R_1$ 、 F_2 、 X 、 X' 、 R_3 、 R_3' 、 $R_{33'}$ 、 R_2 、 L 、 Z 和 n 均如本文中所限定。

[0450] 在该实施方式中更优选的是, R_{3a} 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或 R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})$ 的基团, 其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团。

[0451] 在实施方式 (4) 的方法的第二优选实施方式中, 包含式 (II) 的结构体的化合物是式 (IIIa) 的化合物

[0452]



(IIIa)

[0453] 其中 :

[0454] $-$:

[0455] $-R_{3a}$ 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

[0456] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33a'})$ 的基团, 其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; 或

[0457] $-R_{3a}$ 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})-N(R_{33a'})-$ 的基团, 其中, 各 $R_{33a'}$ 相同或不同并表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ;

[0458] $-m$ 是具有 0 至 n 的值的整数 ;

[0459] $-R_1$ 如前所限定, 并且其中 R_1 包含至少第一硫醇和第二硫醇, 所述第一硫醇连接至式 (IIIa) 的化合物的 2- 位, 所述第二硫醇连接至式 (IIIa) 的化合物的 3- 位 ;

[0460] $-F_2$ 、 X 、 X' 、 R_3 、 R_3' 、 $R_{33'}$ 、 L 、 Z 和 n 均如本文中所限定 ;

[0461] $-$ 步骤 (ii) 还涉及使所述基团 R_1 与式 (IIIa) 的结构体的 3- 位的碳原子之间的键断裂。

[0462] 在该第二优选实施方式中, R_{3a} 优选表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团 ; R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a'})$ 的基团, 其中, $R_{33a'}$ 表示式 $R_{33'}$ 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团。

[0463] 因此, 该第二优选实施方式提供用于使交联剂结构体与包含至少两个硫醇的功能性结构体断裂的方法。该功能性结构体的一个实例是包含二硫化物基团的结构体, 例如包含两个经由二硫桥键而彼此连接的半胱氨酸残基的蛋白质。

[0464] 优选的是, 在实施方式 (4) 的方法中, 包含式 (II) 的结构体的化合物也包含式 F_2

的至少一个功能性结构体。

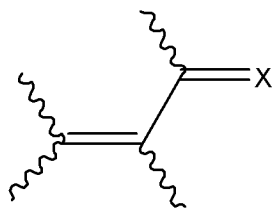
[0465] 在实施方式 (4) 的方法中,断裂与式 R_1 的基团的键的步骤 (ii) 可以通过使用用于断裂不饱和碳中心的硫醇键的常规方法来进行,例如使用用于断裂与缺电子的烯烃连接的硫醇的常规方法。

[0466] 优选的是,实施方式 (4) 的方法的步骤 (ii) 是通过温育所述化合物与能够用作迈克尔反应中的亲核试剂的试剂来实现的。众所周知的能够用作迈克尔反应中的亲核试剂的试剂的实例包括膦化合物、亚磷酸盐化合物、硫醇、硒醇、胺和软碳亲核化合物。膦化合物和亚磷酸盐化合物均包含三价的磷原子。在膦中,磷原子与氢或碳原子连接,而在亚磷酸盐中磷原子与氧原子连接(应理解碳原子和氧原子在各自的化合物中本身还连接其他的基团)。硫醇是含有硫醇 $-SH$ 的有机化合物。硒醇是包含 $-SeH$ 基团的有机化合物。软碳亲核试剂是包含亲核软碳中心的化合物。示例性的软碳亲核试剂描述在 US 5,414,074 中,其内容以引用的方式全文并入本文中。本领域的技术人员当然能够按照常规选择能够用作迈克尔反应中的亲核试剂的适宜的试剂,例如由本文中描述的试剂类别的例示性目录中选择合适的试剂。

[0467] 目前优选的试剂是膦化合物和硫醇。特别优选的膦是三(2-羧乙基)膦,其通常称为“TCEP”,在本领域中一般用来还原化合物中(例如,蛋白质中)的二硫桥键。三(2-羧乙基)膦也可以以盐的形式提供,例如其盐酸盐。特别优选的硫醇是谷胱甘肽。其他优选的硫醇是 1,2-乙二硫醇、2-巯基乙醇和二硫苏糖醇(即, $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$, 通常称为 DTT)。优选的试剂组是 1,2-乙二硫醇、2-巯基乙醇、二硫苏糖醇、谷胱甘肽和三(2-羧乙基)膦。

[0468] 为避免产生疑问,本文中使用的术语“能够用作迈克尔反应中的亲核试剂的试剂”是指能够与化合物中的 α, β -不饱和结构体反应的试剂,特别是与式 (V) 的结构体反应的试剂,

[0469]



(V)

[0470] 其中, X 如本文中所限定。该试剂有时也称作“能够用作偶联加成反应中的亲核试剂的试剂”。显然,所述试剂并不限于通过亲核的碳中心(例如软碳亲核试剂)其反应的试剂,而是还包括通过亲核的非碳中心(例如本文中描述的示例性试剂)其反应的试剂。

[0471] 本发明也提供一种方法,所述方法包括:

[0472] (i) 进行如实施方式 (2) 或 (3) 中所限定的用于产生偶联物的方法;和

[0473] (ii) 随后使式 R_1-H 的化合物由所述偶联物再生。

[0474] 通常,在该方法中,步骤 (ii) 是通过温育所述化合物与能够用作迈克尔反应中的亲核试剂的试剂(例如,关于实施方式 (4) 所限定的试剂)来实现的。

[0475] 本发明的方法也产生了一系列的新化合物,其构成了本发明的实施方式 (5)、(6)、

(7)、(8) 和 (9)。

[0476] 本发明的实施方式 (5) 涉及式 (IIa) 的化合物。该化合物包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的式 F_2 的至少一个结构体。因此, 显然该化合物可用于以式 F_2 的结构体使包含硫醇的功能性化合物 (此处成为化合物 R_1-H) 官能化, 具体而言使用其作为试剂来进行实施方式 (3) 的方法。

[0477] 优选的是, 在实施方式 (5) 中, 式 (IIa) 的化合物不是 N- 苯基 -3,4- 二溴代马来酸, 其中 N- 苯基具有取代基或不具有取代基。

[0478] 优选的是, 在实施方式 (5) 的式 (IIa) 的化合物中, 或者 R_{3a} 表示式 R_3 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 并且 R_{3a}' 独立地表示式 R_3' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团, 或者 R_{3a} 和 R_{3a}' 共同形成式 $-N(R_{33a}')-$ 的基团, 其中, R_{33a}' 表示式 R_{33}' 的基团或式 F_2 或 $-L(F_2)_m(Z)_{n-m}$ 的基团。

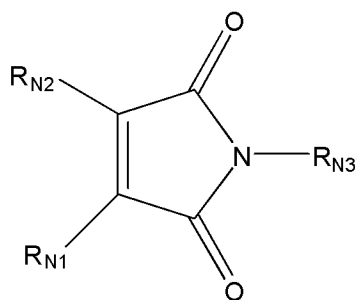
[0479] 本发明的实施方式 (6) 涉及式 (IIb) 的化合物, 条件是 R_{3a} 和 R_{3a}' 不连在一起以形成式 $-N(R_{33a}')-$ 的基团。为避免产生疑问, 因此在该化合物中, R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团, 或者 R_3 和 R_3' 共同以形成式 $-O-$ 或 $-N(R_{33}')-N(R_{33}')-$ 的基团, 其中各 R_{33}' 相同或不同, 并表示氢原子或式 Y 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。优选的是, R_3 和 R_3' 相同或不同, 并各自表示氢原子或式 E 、 Nu 、 $-L(Z)_n$ 或 IG 的基团。

[0480] 因此实施方式 (6) 的化合物构成通过执行本发明的实施方式 (2) 的方法的步骤 (i) 得到的中间物, 具体而言其是具有与本发明的反应性交联剂连接的第一功能性结构体的中间物。通过执行本发明的实施方式 (2) 的方法的步骤 (ii), 该中间物随后可容易地转化为还包含第二功能性结构体的偶联分子。

[0481] 本发明的实施方式 (7) 涉及式 (III) 的化合物, 其包含至少一个式 F_2 的基团并且其中 R_{2a} 不是氢原子。显然, 因而该化合物构成可根据本发明的应用和方法得到的偶联物, 其包含经由本发明的交联结构体而交联的第一功能性结构体和第二功能性结构体。Hong 等 (J. Am. Chem. Soc., 2009, 131 (29), 9986 ~ 9994 页) 中描述的一个试验使用了 7- 氧代降冰片二烯结构体作为交联剂, 并生成了包含马来酰亚胺交联剂的偶联物。不过, 该方法必然在相当于 R_{2a} 取代基的取代基位置生成氢原子。相反, 对于本领域的技术人员来说将即刻明确的是, 在执行合适的方法来合成偶联物时只需通过选择氢原子之外的其他基团与式 (I) 的结构体连接就能够容易地应用本发明的方法来获得氢之外的 R_{2a} 取代基。实施方式 (7) 的式 (III) 化合物因此可用于例如实现进一步的官能化 (R_{2a} 是亲电子的离去基团、亲核基团或具有反应性基团的连接基团时)。作为选择, 第二功能性结构体 F_2 本身也可以定位于该取代基位置 (或者与 3- 位直接连接, 或者经连接物基团与 3- 位连接)。进而, 式 R_{2a} 的基团可构成式 IG 的惰性基团, 例如阻碍与偶联分子发生进一步反应的巨大的不具有化学反应性的取代基。

[0482] 优选的是, 在实施方式 (7) 中, 式 (III) 的化合物不是式 (N) 的化合物:

[0483]



(N)

[0484] 其中

[0485] R_{N1} 和 R_{N2} 独立地选自氢、氨基、羟基、氰基、硝基、羧酸酯、甲酰胺、可选具有取代基的烷基、可选具有取代基的烯基、可选具有取代基的炔基、可选具有取代基的碳环芳基、可选具有取代基的杂芳基、可选具有取代基的烷氧基、可选具有取代基的巯基烷基、可选具有取代基的单或二烷基氨基、可选具有取代基的环烷基、可选具有取代基的杂脂环基或可选具有取代基的氨基烷基；

[0486] R_{N3} 是可选的具有取代基的烷基、可选的具有取代基的烯基、可选的具有取代基的炔基、可选的具有取代基的碳环芳基、可选的具有取代基的杂芳基、可选的具有取代基的环烷基或可选的具有取代基的杂脂环基；及其药学上可接受的盐。

[0487] 本发明的实施方式 (8) 涉及式 (IIIa) 的化合物。特别是，该化合物包含至少具有与交联剂连接的第一和第二硫醇的第一功能性结构体。该化合物可选地还包含至少一个另外的功能性结构体。优选的是，式 (IIIa) 的化合物包含式 F_2 的至少一个功能性结构体。优选的是，式 R_1 的基团包含至少两个半胱氨酸残基，例如在非结合肽或蛋白质中通常形成肽或蛋白质中的内部二硫桥键的两个半胱氨酸残基的肽或蛋白质。

[0488] 本发明的实施方式 (9) 涉及式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物。应当理解，这些化合物构成了偶联分子，因为它们同时包含第一功能性结构体和第二功能性结构体，而且它们包含 2- 位和 3- 位之间的碳碳单键而非碳碳双键。不过，与使用传统的马来酰亚胺试剂制备的偶联物不同，式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物在 2- 位和 3- 位具有总计至少两个功能性结构体。

[0489] 式 (IVa) 和 (IVb) 的化合物可以使用简单的方法制备。在一个这样的方法中，通过执行本发明的实施方式 (2) 的方法来制备偶联分子，其中步骤 (ii) 涉及对式 (II) 的 2- 位和 3- 位之间的碳碳双键的 F_2 的亲电加成反应。在另一个方法中，首先制备还包含 2- 位和 3- 位之间的碳碳双键的偶联物，然后进行亲电子加成反应使所述双键饱和。该亲电子加成反应可能涉及另外的功能性结构体（例如，含有硫醇的其他的功能性结构体）的加入。作为选择，其也可以涉及常规用于执行对不饱和的碳碳中心的亲电子加成反应的任何其他试剂。例如，所述试剂可以是卤化氢、二卤化物、硫酸、水、醇、 H_2S 、硫醇或羧酸。

[0490] 本发明的实施方式 (10) 涉及用于产生式 (IVa) 或 (IVb) 的化合物的方法。应当理解，来自式 R_4-H 的化合物的基团 R_4 加成至式 (III) 的化合物的结构体将取决于式 (III) 的化合物的精确结构、试剂 R_4-H 的特性以及进行反应的反应条件。通常，在质子加成至式 (III) 的化合物时式 R_4 的基团将加成至能够形成最稳定的阳离子中间物的碳原子（也就是，根据马氏规则）。本领域的技术人员将理解，如果式 R_4 的基团需要加成到特定的位置，

则对于反应条件和式 (III) 的化合物上的其他基团的本性的常规选择能够实现该区域选择性。

[0491] 对于本领域的技术人员明确的是,本发明地方法广泛地适用于涉及功能性结构体偶联的已知过程和方法。通常,通过用本发明的式 (I) 的结构体来取代将两个功能性分子(例如,马来酰亚胺基团)连接在一起的交联分子上的传统已知的硫醇反应性基团可以直接地修饰这一类型的常规过程和方法。

[0492] 常规方法的实例包括用于检测一种物质(特别是诸如抗原或 DNA 等生物学上令人感兴趣的物质)的方法、用于纯化含有功能性结构体的硫醇化合物的方法以及用于识别物质是否与该化合物相互作用的检验方法。因此,本发明也提供以下实施方式 (11)、(12) 和 (13),其涉及根据本发明的方法执行的检测、纯化和检验方法。

[0493] 实施方式 (11) 涉及用于检测一种物质是否存在于样品中的方法。通常,所述物质是生物学上令人感兴趣的物质,例如,抗原、抗体、DNA 或 RNA。使本发明的化合物与样品一起温育。该化合物是包含至少两个功能性结构体:第一,能够产生可检测信号的功能性结构体和其次,检测时能够与所述物质相互作用的功能性结构体的偶联物。能够产生可检测信号的功能性结构体最优选是酶,不过也可以是例如可检测结构体或亲和标签。显然,测试时能够与所述物质相互作用的功能性结构体的性质取决于该物质本身的性质。例如,当所述物质是抗原时,该功能性结构体通常是抗体。该物质是 DNA 或 RNA 时,该功能性物质通常是 DNA 或 RNA 的互补链,其中“互补链”是指能够与所述物质相互作用(即,与其杂交)的功能性结构体。

[0494] 优选的是,温育的步骤之后是除去任何量的测试时未与所述物质相互作用(即,与其杂交)的偶联物的步骤,例如,洗涤的步骤。这可以通过例如采用其中所述物质与固体底物连接(例如,经由所述物质与另外的功能性结构体的相互作用,所述功能性结构体 (a) 能够与所述物质相互作用,和 (b) 连接至底物)的检验来实现。在该情况中,通过在保留测试时与所述物质结合的偶联物的同时进行洗涤,能够容易地除去未相互作用的偶联物。

[0495] 实施方式 (11) 的方法也包括在允许由能够产生可检测信号的所述功能性结构体产生可检测信号的条件下监测信号的步骤。例如,在该功能性结构体是酶时,该步骤包括添加当其被酶翻转时产生可检测信号(例如生成有色的或荧光的产物)的酶用底物。优选的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶。

[0496] 优选的是,实施方式 (11) 的方法包括构成 ELISA(“酶联免疫吸附试验”)方法、LAB(“标记的抗生物素蛋白-生物素”)试验方法或 BRAB(“桥联抗生物素蛋白-生物素”)试验方法或 ABC(“抗生物素蛋白-生物素复合物”)试验方法。所有这些方法都是常规的免疫测定方法,均为本领域的技术人员所熟悉。最优选的是,实施方式 (11) 的方法构成 ELISA 方法。

[0497] 实施方式 (12) 涉及由样品纯化式 R_1 -H 的化合物的方法。该方法包括温育样品与包含 (a) 式 (I) 的结构体和 (b) 与其连接的至少一个亲和标签的化合物来实现实施方式 (3) 的方法,由此获得包含基团 R_1 和亲和标签的偶联物。该偶联物随后在允许由所述样品纯化所述偶联物的条件下与包含至少一个亲和标签配对物的化合物一起温育。特别适宜的亲和标签是生物素,特别适宜的亲和标签配对物是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

[0498] 实施方式 (12) 涉及用于识别物质是否与式 R_1 的功能性结构体相互作用的方法,

所述方法包括：

[0499] - 通过执行实施方式 (2) 或 (3) 的方法来产生包含 (a) 式 R_1 的所述功能性结构体和 (b) 能够产生能够被所述物质修饰的信号的可检测结构体的偶联物；

[0500] - 温育所述偶联物与所述物质；

[0501] - 由所述可检测结构体获得信号；和

[0502] - 使所述信号与所述偶联物未与所述物质接触时得到的对照信号进行比较，由此确定所述物质是否与所述偶联物相互作用。

[0503] 荧光共振能量转移或“FRET”分析法是实施方式 (12) 的方法的示例性实施方式。在 FRET 分析法中，与式 R_1 的功能性结构体连接的可检测结构体是施体发色团，所述物质用受体发色团标记。施体发色团 / 受体发色团对在本领域中是众所周知的。一个实例是青色荧光蛋白 (CFP) / 黄色荧光蛋白 (YFP) 对。FRET 分析法例如可用于研究蛋白质 - 蛋白质的相互作用、蛋白质 - DNA 的相互作用和蛋白质的构象变化。

[0504] 本发明的偶联物，特别是实施方式 (7)、(8) 和 (9) 的那些偶联物也适用于医疗或诊断的方法。本发明因而在实施方式 (14) 中提供该化合物在通过外科手术或疗法来治疗人体或动物体的方法或对人体或动物体实施的诊断方法中的应用。实施方式 (14) 也涉及治疗人体或动物体的方法或对人体或动物体实施的诊断方法，所述方法包括对人体或动物体施用该化合物。

[0505] 正如本领域的技术人员将即刻认识到的，适用于实施方式 (14) 的偶联物通常是包含至少一个生物活性结构体的那些偶联物。在一个优选的实施方式中，第一功能性结构体是生物活性结构体，第二功能性结构体是聚合结构体（例如，能够增强体内的生物利用率和 / 或稳定性的结构体，例如聚乙二醇结构体）或抗体（例如，为了形成用于针对特定抗原，如治疗癌症的免疫毒素偶联物）。在另一个优选实施方式中，偶联物包含放射性结构体和生物活性结构体，以用于 PET（正电子成像术）诊断法。

[0506] 应当理解，对于任何具体患者的特定剂量水平将取决于各种因素，包括所用的特定化合物的活性、年龄、体重、整体健康状态、性别、饮食、给药时间、给药途径、排泄速率、药物组合以及正在接受治疗的具体疾病的严重程度。最适宜的剂量水平和给药频率将由临床试验确定，不过示例性的剂量为每天 0.1mg ~ 1000mg。

[0507] 本发明涉及的医用化合物可制备以用于通过符合其药代动力学性质的任何途径来施用。能够口服施用的组合物可以是片剂、胶囊、粉末、粒剂、锭剂、液体或凝胶制剂的形式，例如口服的、局部的或无菌的肠胃外溶液或悬浮液。用于口服的片剂和胶囊可以是单位剂量的呈现形式，也可以包含常规的赋形剂，如粘合剂（例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶或聚乙烯基 - 吡咯烷酮）；填料（例如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨糖醇或甘氨酸）；压片润滑剂（例如硬脂酸镁、云母、聚乙二醇或氧化硅）；崩解剂（例如马铃薯淀粉）；或可接受的润湿剂（例如十二烷基硫酸钠）。片剂可根据正规的药学实践中公知的方法来涂覆。口服的液体制剂可以是例如水性的或油性的悬浮液、溶液、乳状液、糖浆或酞剂的形式，也可以作为干燥产品，在使用前用水或其他合适的载体来重构。这样的液体制剂还可以包含常规的添加剂，如山梨糖醇、糖浆、甲基纤维素、葡萄糖浆、明胶氢化食用油脂；乳化剂，如卵磷脂、山梨糖醇酐单油酸酯或阿拉伯胶；非水性载体（可包括食用油），如杏仁油、分馏的椰子油、油性酯（如甘油、丙二醇或乙醇）；防腐剂，如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯

或山梨酸,以及必要时的常规的芳香基或着色剂。

[0508] 对于局部施用至皮肤,可以将医用化合物制成乳剂、洗剂或软膏。可用于药物的乳剂或软膏制剂是本领域中公知的常规制剂,例如描述在英国药典等标准药学教科书中。

[0509] 对于通过吸入进行的局部施用,可以将医用化合物配制为例如通过压力驱动的喷射雾化器或超声波雾化器,或优选通过推进剂驱动的计量型气雾剂或无推进剂施用微粉末(如吸入胶囊或其他的“干粉”递送系统)进行气雾剂递送。赋形剂,例如,推进剂(如计量型气雾剂情况中的氟利根)、表面活性物质、乳化剂、稳定剂、防腐剂、调味剂和填料(如粉末吸入剂器情况中的乳糖)可以存在于该吸入型制剂中。对于吸入的目的,可以获得大量的装置,通过使用对于患者来说适宜的吸入技术,由这些装置能够产生并施用具有最适宜的粒径的气雾剂。除了使用适配器(分离器、扩张器)和梨形容器(例如 Nebulator®、Volumatic®),以及散发吹入喷雾的自动装置之外,对于计量型气雾剂,特别是在粉末吸入器的情况中,可以使用许多的技术方案(例如, Diskhaler®、Rotadisk®、Turbohaler®或例如在欧洲专利申请 EP 0505321 中描述的吸入器)。

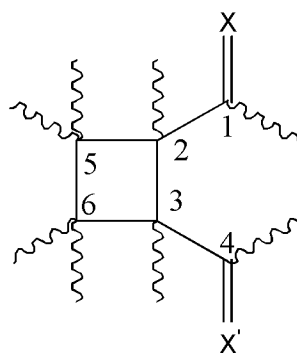
[0510] 对于眼睛的局部施用,可以将医用化合物制成为合适的无菌水性或非水性载体中的溶液或悬浮液。也可以包含添加剂,如缓冲剂(例如焦亚硫酸钠或乙二胺四乙酸二钠(disodium edeate));防腐剂(包括杀菌剂和杀真菌剂,如乙酸汞苯或硝酸汞苯、杀藻胺或氯己定);以及增稠剂(如羟丙甲纤维素)。

[0511] 活性组分也可以在无菌介质中进行肠胃外施用。取决于所用的赋形剂及浓度,药物或者悬浮在赋形剂中或者溶解在赋形剂中。有利的是,诸如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂等佐剂可以溶解在赋形剂中。

[0512] 本发明的医用化合物可以与为数众多的已知的药物活性物质组合使用。

[0513] 本发明还提供包含式(VI)的结构体和与其连接的功能性结构体的化合物,

[0514]



(VI)

[0515] 其中：

[0516] -X 和 X' 相同或不同,并各自表示氧、硫或式 = NQ 的基团,其中 Q 是氢、羟基、C₁₋₆ 烷基或苯基;和

[0517] -所述功能性结构体选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA 和 RNA。

[0518] 通常,所述功能性结构体与式(VI)的结构体的5-位或6-位连接。因此,通过使包含烯烃结构体的功能性结构体与包含式(I)或(II)的结构体的化合物或式(Ia)、(Ib)、(IIa)、(IIb)、(III)或(IIIa)的化合物的2-位与3-位之间的碳碳双键在光催化[2+2]环加成反应中的反应能够产生所述化合物。

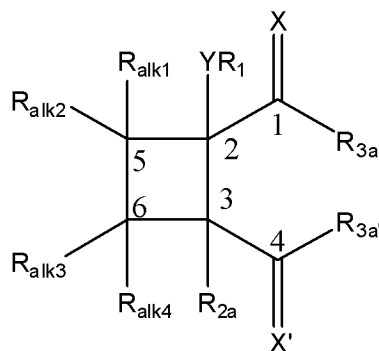
[0519] 优选的是,式(VI)的结构体包含至少一个,例如一个其他的功能性结构体,该其他的功能性结构体本身独立地选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA和RNA。在该实施方式中,优选的是,一个这样的其他功能性结构体具有硫醇结构体并经由所述硫醇结构体的硫原子与式(VI)的结构体的2-位连接。因此,该化合物能够由包含式(I)的结构体的化合物通过以下步骤制造:

[0520] -使包含式(I)的结构体的化合物与具有硫醇结构体的所述其他的功能性结构体反应,由此生成中间产物,该中间产物是包含式(II)的结构体的化合物;和

[0521] -使该中间化合物与包含烯烃结构体的功能性结构体反应,以实现所述烯烃结构体与该中间产物的2-位与3-位之间的碳碳双键的光催化[2+2]环加成反应。

[0522] 优选的是,包含式(VI)的结构体和与其连接的功能性结构体的化合物是式(VIa)的化合物

[0523]



(VIa)

[0524] 其中:

[0525] -X和X'相同或不同,并各自表示氧、硫或式=NQ的基团,其中Q是氢、羟基、C₁₋₆烷基或苯基;

[0526] -YR₁是式Y或R₁的基团;

[0527] -Y是亲电子的离去基团;

[0528] -R₁是式-F₁或-S-L-F₁的基团,其中R₁具有硫醇结构体并经由所述硫醇结构体的硫原子与式(VIa)的结构体的2-位连接;

[0529] -R_{2a}、R_{3a}和R_{3a'}各自关于式(IIa)的化合物所限定;

[0530] -R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3}和R_{alk4}中的每一个相同或不同,并且是式R_{2a}的基团,条件是R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3}和R_{alk4}中的至少一个包含式F₂的基团;和

[0531] -F₁和式F₂的任何基团相同或不同,并各自选自可检测结构体、酶学活性结构体、亲和标签、半抗原、免疫原性载体、抗体或抗体片段、抗原、配体、生物活性结构体、脂质体、聚合结构体、氨基酸、肽、蛋白质、细胞、糖、DNA和RNA。

[0532] 优选的是, YR_1 是式 R_1 的基团, R_1 优选是式 $-F_1$ 的基团。优选的是, 式 (VIa) 的化合物包含式 F_2 的一个基团。

[0533] 实施例

[0534] 以下的实施例阐释了本发明所依据的科学原理。许多的实施例是比较例, 因为它们没有涉及两个功能性结构体的连接。不过, 功能性结构体与和本发明有关的连接基团的连接、功能性结构体从其上的断裂以及功能性结构体经由与本发明有关的连接基团而与其他第二结构体 (包括其他的功能性结构体) 的连接已经得到详尽地展示。显示出很大程度上的结构性变化是易于耐受的, 证明本发明具有广泛的适用性。

[0535] A) 预备例

[0536] 室温下在 Bruker Avance 500 仪器上记录 1H 和 ^{13}C NMR 光谱, 该仪器的操作频率对于 1H 为 500MHz, 对于 ^{13}C 为 125MHz。 1H NMR 光谱参考 $CDCl_3$ (7.26ppm) 信号。 ^{13}C NMR 光谱参考 $CDCl_3$ (77.67ppm) 信号。

[0537] 在以 ATR 模式操作的频率为厘米倒数 (cm^{-1}) 的 PerkinElmer Spectrum 100FT-IR 波谱测定仪上记录红外光谱。

[0538] 在 VG70-SE 质谱仪 (EI 模式和 CI 模式) 上记录质谱数据和高分辨质谱数据。

[0539] 熔点 (m. p.) 在 Gallenkamp 加热块上获取, 并且未作校正。

[0540] 使用比色皿长度为 10cm 的 PerkinElmer 343 旋光仪进行旋光测量。

[0541] 缩写

[0542] Boc : 叔丁氧基羰基

[0543] Cys : 半胱氨酸

[0544] Mal : 马来酰亚胺

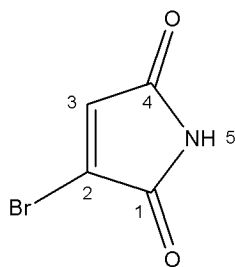
[0545] DMF : 二甲基甲酰胺

[0546] TCEP : (三 (2-羧乙基) 膦)

[0547] LC-ESI-MS : 液相色谱电喷射电离质谱

[0548] 比较例 1 : 溴代马来酰亚胺 (化合物 1) 的制备

[0549]



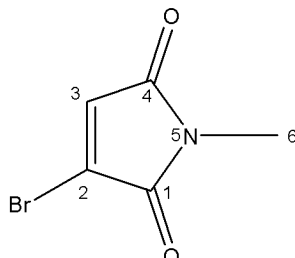
[0550] 向氯仿 (15mL) 中的马来酰亚胺 (2.00g, 0.02mol) 中滴加氯仿 (15mL) 中的溴 (1.16mL, 0.02mol)。使反应混合物回流 2 小时, 并用静置 1 小时冷却至室温。滤出黄色固体沉淀, 用冷氯仿 (2×50mL) 洗涤, 以提供粗 2,3-二溴代琥珀酰亚胺的白色结晶 (4.09g, 0.016mol)。使粗琥珀酰亚胺溶解在四氢呋喃 (50mL) 中, 并在 0℃ 用 5 分钟加入四氢呋喃 (10mL) 中的三乙胺 (2.4mL, 0.017mol)。使反应混合物升温至室温并搅拌 48 小时。将固体滤出, 并用四氢呋喃 (50mL) 洗涤, 以得到产率为 59% 的浅黄色粉末 (2.14g, 0.012mol)。

[0551] 1H NMR (500MHz, $CDCl_3$) : δ = 7.67 (br s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, C = CH); ^{13}C

NMR(125MHz, CDCl_3) : δ = 173.8 (C = O), 170.5 (C = O), 136.9 (-(Br)C = C-), 135.4 (C = CH-); IR(固体, cm^{-1}) : 3235(s), 1709(s); MS(CI+) m/z, (%) : 178 ($^{81}\text{M}^+$, 32), 176 ($^{79}\text{M}^+$, 32), 125(25), 86(100); $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$ 的计算质量 : 175.93472。测定值 : 175.93493; m. p. 148°C ~ 151°C。

[0552] 比较例 2 : N-甲基溴代马来酰亚胺 (化合物 2) 的制备

[0553]

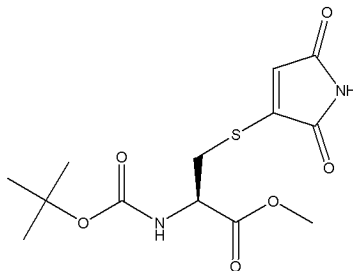


[0554] 向甲醇 (22.5mL) 中的 N-甲基马来酰亚胺 (0.5g, 4.5mmol) 中逐滴加入溴 (0.52mL, 10mmol)。使反应混合物在室温搅拌 24 小时。在真空中除去溶剂, 使反应物料溶解在所加入的四氢呋喃 (20mL) 和三乙胺 (0.8mL, 5.85mmol) 中, 然后在室温搅拌 24 小时。在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚 : 乙酸乙酯, 7 : 3) 纯化该材料, 以得到产率为 89% 的淡白色粉末 (0.761g, 4.0mmol)。

[0555] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) : δ = 6.90(s, 1H, C = CH), 3.09(s, 3H, N-CH₃); ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3) : δ = 168.6 (C = O), 165.4 (C = O), 131.9 (C = CH-), 131.4 ((Br)C = C-), 24.7 (N-CH₃); IR(固体, cm^{-1}) : 3106(s), 1708(s); MS(CI) m/z, (%) : 192 ($^{81}\text{M}^+$, 99), 190 ($^{79}\text{M}^+$, 100); $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$ 的计算质量 : 189.95037。测定值 : 189.95052; m. p. : 77°C ~ 79°C。

[0556] 比较例 3 : N-Boc-Cys(Mal)-OMe (化合物 4) 的制备

[0557]



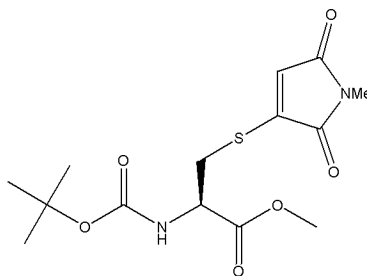
[0558] 向 N-Boc-Cys-OMe (化合物 3) (36mg, 0.153mmol) 和乙酸钠 (13mg, 0.153mmol) 在甲醇 (3mL) 中的搅拌溶液中加入甲醇 (3mL) 中的溴代马来酰亚胺 (30mg, 0.169mmol)。1 分钟后在真空中除去溶剂。在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚 : 乙酸乙酯, 由 9 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化该材料, 以得到产率为 100% 的浅黄色粉末 (51mg, 0.153mmol)。

[0559] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) : δ = 7.63(s, 1H, NH), 6.27(s, 1H, C = CH), 5.40(d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67(ddd, 1H, J = 6.8, 5.4 和 5.1, -HN-CH-C(O)-), 3.80(s, 3H, O-CH₃), 3.48(dd, 1H, J = 13.8 和 5.1, -S-CHH-), 3.62(dd, 1H, J = 14.1 和 5.4, -S-CHH-) 1.45(s, 9H, 3 x CH₃); ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3) : δ = 170.2 (C = O), 168.9 (C = O), 167.6 (C = O), 155.2 (C = O), 155.9 (C = CH-), 119.7 (C = CH-), 81.1 ((CH₃)C(O)-), 53.3 (O-CH₃), 52.7 (CH), 34.0 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃); IR(固体, cm^{-1}) 3236(w), 1715(s); MS(CI+) m/z, (%) : 331 (M+H, 5), 275(20), 231(100); $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}] + \text{H}$ 的计算质量 : 331.09638。测定值 : 331.09684;

$^{20}\alpha_D$: -41.9° ($c = 1.0$, 甲醇) ; m. p. : 145°C ~ 147°C。

[0560] 比较例 4 : N-Boc-Cys(N-Me-Mal)-OMe (化合物 5) 的制备

[0561]

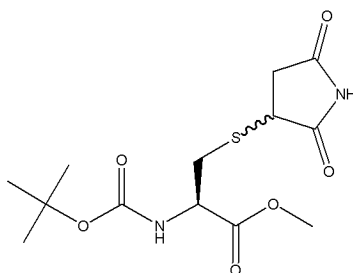


[0562] 向 N-Boc-Cys-OMe (32mg, 0.136mmol) 在甲醇 (4mL) 中的搅拌溶液中加入乙酸钠 (82mg, 0.408mmol)。用 10 分钟向所得物中加入甲醇 (4mL) 中的 N-甲基溴代马来酰亚胺 (25.8mg, 0.136mmol)。反应变为浅黄色。在真空中除去溶剂, 在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚: 乙酸乙酯, 由 9 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化残留物, 得到产率为 84% 的淡白色粉末 (39.3mg, 0.114mmol)。

[0563] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : $\delta = 6.26$ (s, 1H, C = CH), 5.36 (d, 1H, $J = 6.3$, NH), 4.66 (m, 1H, -HN-CH-), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 3.46 (dd, 1H, $J = 5.2$ 和 5.0, -S-CHH-), 3.35 (dd, 1H, $J = 13.7$ 和 5.1, -S-CHH-), 3.00 (s, 3H, -N-CH₃), 1.44 (s, 9H, 3 x CH₃) ; ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) : $\delta = 170.2$ (C = O), 169.5 (C = O), 167.9 (C = O), 155.0 (C = O), 149.9 (-C = CH-), 118.7 (-C = CH-), 80.9 ((CH₃)₃CO-), 53.1 (O-CH₃), 52.7 (CH), 33.8 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃), 24.1 (-N-CH₃) ; IR (固体, cm^{-1}) 3367.8, 2977.1, 1694.7 ; MS (ES+) m/z , (%) : 367 (46), 311 (M, 100) ; $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ 的计算质量 : 367.0940。测定值 : 367.0931 ; $^{20}\alpha_D$: -18.55° ($c = 1.0$, 甲醇) ; m. p. : 101°C ~ 103°C。

[0564] 比较例 5 : N-Boc-Cys(Succ)-OMe (化合物 6) 的制备

[0565]



[0566] 向 N-Boc-Cys-OMe (36mg, 0.153mmol) 在甲醇 (3mL) 中的搅拌溶液中加入甲醇 (3mL) 中的马来酰亚胺 (17mg, 0.169mmol)。1 分钟后在真空中除去溶剂。在硅胶上通过闪式色谱 (二氯甲烷: 甲醇, 由 99 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化材料, 得到产率为 100% 的无色油 (51mg, 0.153mmol), 其是非对映异构体的 1 : 1 的混合物。

[0567] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : $\delta = 9.00$ (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH), 5.59 (1H, d, $J = 7.6$, NH), 5.41 (d, 1H, $J = 7.6$, NH), 4.65 ~ 4.56 (m, 2H, 2x-HN-HC-C(O)-) C = CHH), 3.93 (dd, 1H, $J = 9.3$ 和 3.9, CH), 3.86 (dd, 1H, $J = 9.2$ 和 4.2, CH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (dd, 1H, $J = 13.8$ 和 4.6, -CHH-), 3.36 (dd, 1H, $J = 14.1$ 和 6.0, -CHH-), 3.19 ~ 3.11 (m, 3H, 3x-CHH-), 2.96 (dd, 1H, $J = 13.1$ 和 7.1, -CHH-), 2.54 ~

2.02(m, 2H, -CHH-) 1.43(s, 18H, 9 x CH₃) ; ¹³C NMR(125MHz, CDCl₃) : δ = 177.2(C = O), 177.1(C = O), 175.1(C = O), 175.0(C = O), 172.0(C = O), 171.5(C = O), 155.5(C = O), 155.3(C = O), 80.6(2x-OCCH₃), 53.6(CH), 52.91(OCCH₃), 52.85(OCCH₃), 50.8(CH), 40.6(CH), 40.0(CH), 37.3(CH₂), 37.0(CH₂), 34.6(CH₂), 34.1(CH₂), 28.3(6 x CH₃) ; IR(油, cm⁻¹) 3233(w), 2980(w), 1783(w), 1709(s) ; MS(CI+)m/z, (%) : 333(M+H, 15), 277(50), 233(100) ; C₁₃H₂₀O₆N₂S 的计算质量 : 332.10420。测定值 332.10475 ;

[0568] 比较例 6 :马来酰亚胺未取代 N-Boc-Cys(Mal)-OMe 的硫醇以及溴代马来酰亚胺未取代 N-Boc-Cys(Succ)-OMe 的硫醇的证明

[0569] 向 N-Boc-Cys-OMe(36mg, 0.153mmol) 和乙酸钠(13mg, 0.153mmol) 在甲醇(3mL) 中的搅拌溶液中加入甲醇(3mL) 中的溴代马来酰亚胺(30mg, 0.169mmol)。10 分钟后加入马来酰亚胺(17mg, 0.169mmol)。在真空中除去溶剂, ¹H NMR 分析显示出仅有化合物 4 和未反应的马来酰亚胺。

[0570] 向 N-Boc-Cys-OMe(36mg, 0.153mmol) 和乙酸钠(13mg, 0.153mmol) 在甲醇(3mL) 中的搅拌溶液中加入甲醇(3mL) 中的马来酰亚胺(17mg, 0.169mmol)。10 分钟后加入溴代马来酰亚胺(30mg, 0.169mmol)。在真空中除去溶剂, ¹H NMR 分析显示出仅有化合物 6 和未反应的溴代马来酰亚胺。

[0571] 比较例 7 :溴代马来酰亚胺和马来酰亚胺之间对 N-Boc-Cys-OMe 的竞争反应

[0572] 向 N-Boc-Cys-OMe(36mg, 0.153mmol) 和乙酸钠(13mg, 0.153mmol) 在甲醇(3mL) 中的搅拌溶液中加入溴代马来酰亚胺(30mg, 0.169mmol) 和马来酰亚胺(17mg, 0.169mmol) 在甲醇(3mL) 中的混合物。1 分钟后在真空中除去溶剂。在硅胶上通过闪式色谱(石油醚: 乙酸乙酯, 由 9 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化材料, 由此得到产率为 70% 的浅黄色粉末 4(36mg, 0.108mmol) 和产率为 30% 的无色油 6(15mg, 0.045mmol)。

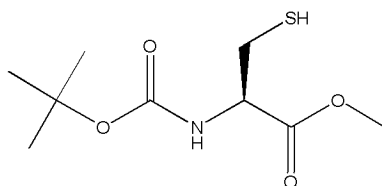
[0573] 比较例 6 证明, 一旦与琥珀酰亚胺或马来酰亚胺结构体连接, 则在这些试剂的存在下半胱氨酸结构体不能够分离。比较例 7 因此证明, 半胱氨酸试剂与溴代马来酰亚胺的反应比其与马来酰亚胺的反应更为迅速(即, 反应动力学对于生成化合物 4 更为有利)。

[0574] 比较例 8 :与丙胺相比马来酰亚胺试剂对于 N-Boc-Cys-OMe 的选择性的证明

[0575] 向 N-Boc-Cys-OMe(36mg, 0.153mmol) 和丙胺(10 μL, 0.153mmol) 在甲醇(3mL) 中的搅拌溶液中加入甲醇(3mL) 中的溴代马来酰亚胺(30mg, 0.169mmol)。1 分钟后在真空中除去溶剂。在硅胶上通过闪式色谱(石油醚: 乙酸乙酯, 由 9 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化材料, 以得到产率为 100% 的浅黄色粉末(51mg, 0.153mmol)。数据与以上关于 N-Boc-Cys(Mal)-OMe 4 获得的相符。

[0576] 实施例 1 :N-Boc-Cys(Mal)-OMe 的断裂以再生 N-Boc-Cys-OMe

[0577]



[0578] 向 4(50mg, 0.151mmol) 在二甲基甲酰胺(2mL) 中的搅拌溶液中加入 20mL 的水性缓冲液(150mM NaCl, 100mM NaH₂PO₄, pH 8.0)。在该溶液中加入在 20mL 的水性缓冲液

(150mM NaCl, 100mM NaH₂PO₄, pH 8.0) 中的三(2-羧乙基)膦(430mg 1.51mmol)。5 分钟后用乙酸乙酯萃取该水溶液(3×25mL),用饱和的氯化锂溶液(5×25mL)、水(25mL)和盐水(25mL)洗涤,并用 MgSO₄ 干燥。在真空中除去溶剂,以得到产率为 98% 的无色油(34.5mg, 0.148mmol)。该油的 ¹H 和 ¹³C NMR 显示其是市售可得的 N-Boc-半胱氨酸甲基酯 3。

[0579] 实施例 2:2,3-二溴代马来酰亚胺与促生长素抑制素的反应

[0580] 促生长素抑制素是已知为以分子中的两个半胱氨酸残基经二硫桥连接的形式存在的肽类激素。

[0581] 将 1mg 的冻干的促生长素抑制素(Sigma-Aldrich)再次溶解在 2ml 的 50mM NaHPO₄⁻, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中。将其中的 500 μl 移至 Eppendorf 反应管中,用同一缓冲剂稀释至最终浓度为 0.25mg/ml (152.6 μM)。加入 2.0 当量的 TCEP(在 50mM NaHPO₄⁻, pH 6.2, 40% MeCN 中的 100 倍储备液),反应在环境温度下温育 1 小时。二硫桥键被还原后,加入 1.4 当量的 2,3-二溴代马来酰亚胺(Sigma-Aldrich, 在 50mM NaHPO₄⁻, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中的 100 倍储备液),使溶液轻轻混合,并在 4℃ 再温育 12 小时。

[0582] 由 LC-ESI-MS(ES⁺/ES⁻) 检测马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素。对照组包括未处理的肽和仅由 2,3-二溴代马来酰亚胺或 TCEP 处理的促生长素抑制素。通过 TCEP 处理的肽与马来酰亚胺的反应检测到完全的还原(Sigma-Aldrich, 在 50mM NaHPO₄⁻, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中的 100 倍储备液)。

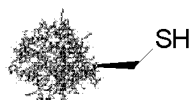
[0583] 试验数据:

[0584] 未处理的促生长素抑制素:[ES⁺]1638.04(m/z 1), 819.82(m/z 2), 546.95(m/z 3)。

[0585] 马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素:[ES⁺]1734.14Da(m/z 1), 867.40Da(m/z 2), 578.73(m/z 3)。

[0586] 比较例 9:GrB2-SH2 结构域 L111C 的表达

[0587]



[0588] 蛋白质 GrB2-SH2 结构域 L111C 用作模型蛋白。该模型蛋白包含单一的半胱氨酸残基。

[0589] 在与 Waters Acquity Single Quad Detector(SQD) 连接的 Waters Acquity uPLC 上进行 LC-MS。柱子:Acquity uPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 x 50mm。波长:254nm。流动相:95:5 水(0.1%甲酸):MeCN(0.1%甲酸),梯度用 4 分钟(至 5:95 水(0.1%甲酸):MeCN(0.1%甲酸))。流率:0.6mL/分钟。MS 模式:ES⁺。扫描范围:m/z = 85 ~ 2000。扫描时间:0.25 秒。以连续谱模式获得数据。MS 的电喷射源在 3.5kV 的毛细管电压和 50V 的锥孔电压下操作。氮用作雾化剂和去溶剂化气体,总流率为 600L/h。使用预设 MassLynx 软件上的 MaxEnt 1 算法由离子系列重构总质谱。

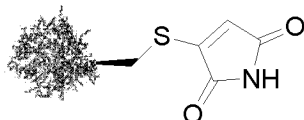
[0590] 模型蛋白在大肠杆菌中过度表达,通过标准技术使用镍亲和层析和体积排阻色谱来纯化六-His 标记的蛋白。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14619 的单一蛋白种类,其对应所需的蛋白质。

[0591] 向 0℃ 的模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl,

pH 8.0) 中加入 0℃的 Ellman 试剂 (5 μ L, 在 H₂O 中 282mM 的溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 10 分钟, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示发生了单一反应, 得到了质量 14366 的单一产物, 表明 C111 可用于官能化。

[0592] 比较例 10 :GrB2-SH2 结构域 L111C 与溴代马来酰亚胺的反应

[0593]

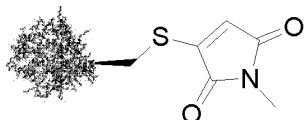


[0594] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应所需的蛋白质。

[0595] 0℃时用 Ellman 试剂 (5 μ L, 在 H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 10 分钟, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示与 Ellman 试剂没有明显反应, 确切表明在 C111 已经发生了溴代马来酰亚胺的官能化。

[0596] 比较例 11 :GrB2-SH2 结构域 L111C 与 N- 甲基溴代马来酰亚胺的反应

[0597]

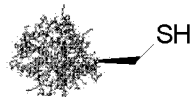


[0598] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类, 其对应所需的蛋白质。

[0599] 0℃时用 Ellman 试剂 (5 μ L, 在 H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 10 分钟, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示与 Ellman 试剂没有明显反应, 确切表明在 C111 已经发生了 N- 甲基溴代马来酰亚胺的官能化。

[0600] 实施例 3 : 磷介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的还原断裂

[0601]

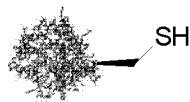


[0602] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0603] 0℃时用 TCEP·HCl (5 μ L, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 得到 GrB2-SH2 结构域 L111C (质量 = 14168), 产率为 85%。剩余的物质是未反应的蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0604] 实施例 4 : 膦介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物的还原断裂

[0605]

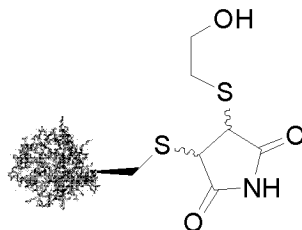


[0606] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0607] 0℃时用 TCEP·HCl (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 得到 GrB2-SH2 结构域 L111C (质量 = 14168), 产率为 85%。剩余的物质是未反应的蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0608] 实施例 5 : GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物的合成

[0609]

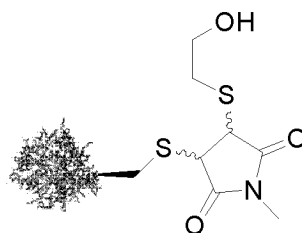


[0610] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0611] 0℃时用 2- 巯基乙醇 (5 μL, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 / 溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物 (质量 = 14339), 产率为 55%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0612] 实施例 6 : GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物的合成

[0613]



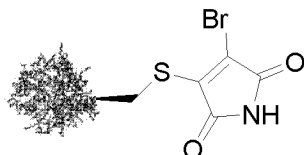
[0614] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类, 其对应

应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0615] 0℃时用 2- 巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物 (质量 = 14356), 产率为 61%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0616] 比较例 12 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺加合物的合成

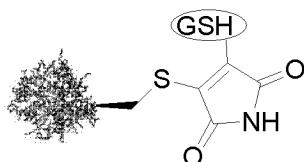
[0617]



[0618] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0619] 实施例 7 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的合成

[0620]

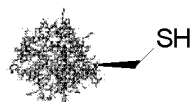


[0621] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0622] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14572)。

[0623] 实施例 8 :生理相关的谷胱甘肽浓度 (5mM) 下的谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的断裂

[0624]



[0625] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0626] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14572)

[0627] 0℃时用谷胱甘肽(5 μL, H₂O 中的 100mM 溶液)处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示 GrB2-SH2 结构域 L111C 是唯一存在的蛋白质种类(质量 = 14173)。

[0628] B) 其他实施例

[0629] 通用规程

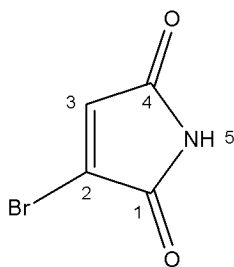
[0630] 室温下在 Bruker Avance 500 仪器上记录 ¹H 和 ¹³C NMR 光谱,该仪器的操作频率对于 ¹H 为 500MHz,对于 ¹³C 为 125MHz。¹H NMR 光谱参考 CDCl₃(7.26ppm) 信号。¹³C NMR 光谱参考 CDCl₃(77.67ppm) 信号。在以 ATR 模式操作的频率为厘米倒数 (cm⁻¹) 的 PerkinElmer Spectrum 100FT-IR 波谱测定仪上记录红外光谱。在 VG70-SE 质谱仪(EI 模式和 CI 模式)上记录质谱数据和高分辨质谱数据。熔点显现在 Gallenkamp 加热块获取,并且未作校正。3,4-二溴代马来酰亚胺、冻干的促生长素抑制素、PEG5000、TCEP 和苯硒酚由 Sigma-Aldrich 购买并不做进一步的纯化而直接使用。

[0631] 肽和蛋白质的质谱

[0632] 使用与 Waters Acquity Single Quad Detector(SQD) 连接的 Waters Acquity uPLC 对蛋白质样品进行 LC-MS。柱子:Acquity uPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 x 50mm。波长:254nm。流动相:95 : 5 水(0.1%甲酸):MeCN(0.1%甲酸),梯度用 4 分钟(至 5 : 95 水(0.1%甲酸):MeCN(0.1%甲酸))。流率:0.6mL/分钟。MS 模式:ES+。扫描范围:m/z = 85 ~ 2000。扫描时间:0.25 秒。以连续谱模式获得数据。MS 的电喷射源在 3.5kV 的毛细管电压和 50V 的锥孔电压下操作。氮用作雾化剂和去溶剂化气体,总流率为 600L/h。使用预设 MassLynx 软件上的 MaxEnt 1 算法由离子系列重构总质谱。在 MALDI micro MX(Micromass)上进行 MALDI-TOF 分析。以反射型正离子模式获得数据,电源电压为 12kV,反射型电压为 5kV,激光的波长为 337nm。如下所述制备样品,包含肽的那些样品在去离子的 H₂O 中透析 24 小时。将肽及其衍生物(0.1mg/ml ~ 0.3mg/ml)点在芥子酸(10mg/ml)中的 MALDI 板上,此前该板已预点有三氟乙酸(10mg/ml)。ACTH(10ng/ml)用于质量校准。

[0633] 比较例 13:溴代马来酰亚胺的制备

[0634]

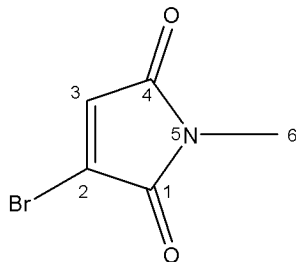


[0635] 向氯仿(15mL)中的马来酰亚胺(2.00g, 0.02mol)中滴加氯仿(15mL)中的溴(1.16mL, 0.02mol)。使反应混合物回流 2 小时,并静置 1 小时冷却至室温。滤出黄色固体沉淀,并用冷氯仿(2×50mL)洗涤,以提供粗 2,3-二溴代琥珀酰亚胺的白色结晶(4.09g, 0.016mol)。使粗琥珀酰亚胺溶解在四氢呋喃(50mL)中,并在 0℃用 5 分钟加入四氢呋喃(10mL)中的三乙胺(2.4mL, 0.017mol)。使反应混合物升温至室温并搅拌 48 小时。将固体滤出,并用四氢呋喃(50mL)洗涤。通过闪式色谱(石油醚中的 5%的乙酸乙酯)的纯化得到了所需的化合物,其为浅黄色粉末(2.14g, 0.012mol),产率为 59%。 δ_{H} (500MHz,

CDCl_3) 7.67 (br s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H-3); δ_c (125MHz, CDCl_3) 173.8 (C=O), 170.5 (C=O), 136.9 (C2), 135.4 (C3); IR (固体, cm^{-1}) 3235 (s), 1709 (s); MS (CI+) m/z, (相对强度): 178 ($[\text{M}+\text{H}]$, 32), 176 ($[\text{M}+\text{H}]$, 32), 125 (25), 86 (100); $[\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}]+\text{H}$ 的计算的质量: 175.9347. 测定值: 175.9349 (CI+); m.p.: $148^\circ\text{C} \sim 151^\circ\text{C}$; UV (乙腈) $\epsilon_{242} = 13800$ 和 $\epsilon_{276} = 1700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$.

[0636] 比较例 14 :N- 甲基溴代马来酰亚胺的制备

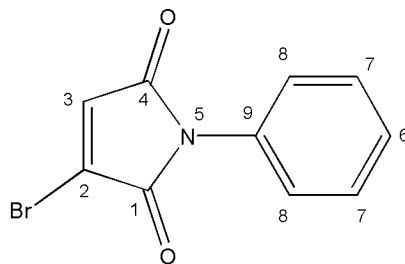
[0637]



[0638] 向甲醇 (10mL) 中的 N- 甲基马来酰亚胺 (0.5g, 4.5mmol) 中滴加甲醇 (5mL) 中的溴 (232 μL , 4.5mmol)。使反应混合物在室温搅拌 12 小时。溶剂在真空中除去, 然后溶解在四氢呋喃 (20mL) 中。用 5 分钟加入四氢呋喃 (5mL) 中的三乙胺 (815 μL , 5.9mmol), 由此形成沉淀。使反应混合物搅拌 24 小时。将固体滤出, 用四氢呋喃 (50mL) 洗涤。通过闪式色谱 (石油醚中的 10% 的乙酸乙酯) 的纯化得到了所需的化合物, 其为浅黄色粉末 (563mg, 2.96mmol), 产率为 66%。 δ_H (500MHz, CDCl_3) 6.90 (s, 1H, H-3), 3.09 (s, 3H, H₃-6); δ_c (125MHz, CDCl_3) 168.6 (C=O), 165.4 (C=O), 131.9 (C3), 131.4 (C2), 24.7 (C6); IR (固体, cm^{-1}) 3106 (s), 1708 (s); MS (CI+) m/z, (相对强度): 192 ($[\text{M}+\text{H}]$, 99), 190 ($[\text{M}+\text{H}]$, 100); $[\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}]+\text{H}$ 计算的准确质量需要 189.9504。测定值为 189.9505 (CI+); m.p.: $77^\circ\text{C} \sim 79^\circ\text{C}$; UV (乙腈) $\epsilon_{209} = 17100$, $\epsilon_{238} = 13200$, $\epsilon_{299} = 290 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$.

[0639] 比较例 15 :N- 苯基溴代马来酰亚胺的制备

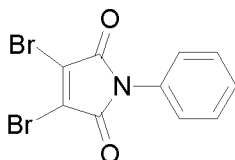
[0640]



[0641] 向氯仿 (15mL) 中的 N- 苯基马来酰亚胺 (2g, 11.50mmol) 中滴加氯仿 (5mL) 中的溴 (0.65mL, 12.70mmol)。使反应混合物回流 1 小时, 然后使其冷却至室温。滤出沉淀, 并用氯仿 (50mL) 洗涤。将该固体 (2.70g, 8.10mmol) 溶解在四氢呋喃 (50mL) 中, 并在 0°C 时向其中滴加四氢呋喃 (10mL) 中的三乙胺 (1.2mL, 8.9mmol) 的溶液, 搅拌混合物 2 小时。使混合物升温至室温, 并在真空中除去溶剂。将残留物溶解在乙酸乙酯中, 并用 H_2O (50mL)、盐水 (50mL) 洗涤, 然后干燥 (Na_2SO_4)。在真空中除去溶剂, 以得到所需的化合物, 其为浅黄色固体 (1.80g, 7.14mmol), 产率为 62%。数据与文献 Sahoo et al., Synthesis, 2003, 346 相符。

[0642] 比较例 16 :N- 苯基二溴代马来酰亚胺的制备

[0643]

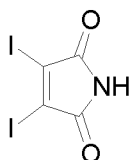


[0644] 将苯胺 (72 μ L, 0.788mmol) 添加到二溴代马来酸酐 (200mg, 0.788mmol) 在 AcOH (10mL) 中的溶液中。混合物在室温搅拌 3 小时, 并在 130°C 保持 90 分钟。冷却后, 使混合物浓缩至干, 通过与甲苯共沸除去痕量的 AcOH。使用氧化硅闪式色谱 (5% EtOAc/95% 石油醚) 纯化棕色残留物, 以得到所需的化合物, 其为浅黄色固体 (166mg, 60%)。

δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 7.48 (m, 2H, ArH), 7.41 (tt, 1H, $J = 7.4$ and 1.1Hz, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 163.0, 131.0, 130.0, 129.5, 128.8, 126.2。

[0645] 比较例 17 : 3,4-二碘代-吡咯-2,5-二酮的制备

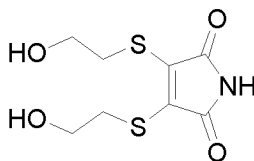
[0646]



[0647] 向乙酸 (50mL) 中的二溴代马来酰亚胺 (500.0mg, 2.0mmol) 中添加碘化钠 (886.5mg, 5.9mmol)。将反应混合物加热至 120°C, 并回流 2 小时。使反应冷却至室温, 加入 H_2O (50mL), 并在 4°C 保持 15 小时。滤出黄色沉淀, 进行风干, 以得到所需的化合物, 其为橙色结晶性粉末 (415mg, 60%)。 1H NMR (500MHz, MeOD) : 无信号; ^{13}C NMR (125MHz, MeOD) : $\delta = 169.3$ (C), 119.5 (C); IR (固体, cm^{-1}) : 3244 (s), 2944 (m), 2833 (m); MS (EI) m/z , (%) : 349 (M, 83), 179 (100); $C_4H_2I_2O_2$ 计算的质量 : 348.80912。测定值 : 348.81026。m. p. : 238°C ~ 241°C (文献值 : 254°C ~ 255°C)。

[0648] 比较例 18 : 3,4-双-(2-羟基-乙硫基)-吡咯-2,5-二酮的制备

[0649]

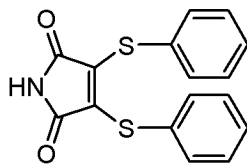


[0650] 向缓冲液 (100mL, 150mM NaCl, 100mM 磷酸钠, pH 8.0, 5.0% DMF) 中的 2-巯基乙醇 (683.8 μ L, 9.8mmol) 中加入 DMF (2.5mL, 最终浓度 DMF 7.5%) 中的二溴代马来酰亚胺 (1g, 3.9mmol)。使反应在室温搅拌 30 分钟, 然后加入氯化锂 (20g)。水性反应混合物用乙酸乙酯 (7 x 150mL) 萃取。使有机层合并, 在真空中除去溶剂, 残留的物质在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚 : 乙酸乙酯, 由 1 : 1 至 1 : 9 进行梯度洗脱) 纯化。收集包含产物的馏分, 在真空中除去溶剂。仍然不纯的产物在硅胶上通过闪式色谱 (甲醇 : 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 10.0%) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为黄色固体 (518mg, 53%)。 λ_{max} (50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF) / 318nm ($\epsilon / dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 1855); 1H NMR (500MHz, MeOD) : $\delta = 3.74$ (t, 4H, $J = 6.4$, 2x HO-CH₂), 3.41 (t, 4H, $J = 6.3$, 2x S-CH₂); ^{13}C NMR (125MHz, MeOD) : $\delta = 168.5$ (C), 137.2 (C), 62.3 (CH₂), 34.4 (CH₂); IR (固体, cm^{-1}) : 3344 (s), 2500 (m), 2078 (w); MS (EI) m/z , (%) : 250 (M, 43), 232 (100), 161 (37);

$C_8H_{11}O_4NS_2$ 的计算质量 :250.02077。测定值 :250.02126 ;m. p. :46℃ ~ 50℃。

[0651] 比较例 19 :3,4-双-苯硫基-吡咯-2,5-二酮的制备

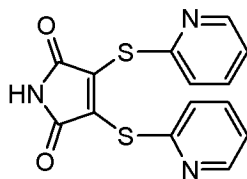
[0652]



[0653] 向甲醇 (6ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (80.0mg, 0.3 mmol) 和碳酸氢钠 (130.2mg, 1.6mmol) 中缓慢加入甲醇 (1ml) 中的苯硫酚 (66.6 μ l, 0.7mmol)。使反应在室温搅拌 15 分钟。在真空中除去溶剂, 残留物在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚: 乙酸乙酯, 由 9 : 1 至 7 : 3 进行梯度洗脱) 纯化, 以得到所需产物, 其为亮黄色晶体 (73mg, 75%)。 $\lambda_{\max}$ (50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF) /412nm (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 2245); ¹H NMR (500MHz, MeOD) : δ = 7.27-7.22 (m, 6H, Ar-H), 7.16-7.14 (m, 4H, Ar-H); ¹³C NMR (125MHz, MeOD) : δ = 169.3 (C), 137.6 (C), 135.4 (C), 132.4 (CH), 130.1 (CH), 129.1 (CH); IR (固体, cm⁻¹) : 3285 (m), 3059 (w), 2924 (w), 1774 (m), 1715 (s); MS (CI) m/z, (%) : 314 (M+H, 100), 206 (13), 111 (12); $C_{16}H_{11}O_2NS_2$ [H] 的计算质量 :314.0231。测定值 :314.0309 ;m. p. :102℃ ~ 104℃ (文献值 :123℃ ~ 126℃)。

[0654] 比较例 20 :3,4-双-(吡啶-2-基硫烷基)-吡咯-2,5-二酮的制备

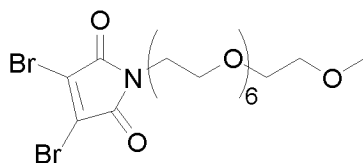
[0655]



[0656] 向甲醇 (15ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (300.0mg, 1.2mmol) 和乙酸钠 (480.0mg, 5.9mmol) 中缓慢加入甲醇 (4ml) 中的 1H-吡啶-2-硫酮 (275.8mg, 2.5mmol)。使反应在室温搅拌 15 分钟。在真空中除去溶剂, 残留物在硅胶上通过闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 由 0.5% ~ 3.0% 的梯度洗脱) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为暗黄色固体 (190mg, 51%)。 $\lambda_{\max}$ (50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF) /395nm (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 3508); ¹H NMR (500MHz, MeOD) : δ = 8.37 (d, 2H, J = 3.8, 2x N-CH), 7.70 (t, 2H, J = 6.9, 2x C-CH-CH), 7.38 (d, 2H, J = 7.9, 2x C-CH), 7.26 (t, 2H, J = 6.5, 2x N-CH-CH); ¹³C NMR (125MHz, MeOD) : δ = 168.5 (C), 154.7 (C), 150.9 (CH), 140.0 (C), 139.0 (CH), 126.8 (CH), 123.7 (CH); IR (固体, cm⁻¹) : 2926 (m), 2734 (w), 1771 (w), 1726 (s), 1619 (m); MS (CI) m/z, (%) : 316 (M+H, 5), 152 (10), 126 (34), 112 (100); $C_{14}H_9O_2N_3S_2$ [H] 计算的质量 :316.0214。测定值 :316.0223 ;m. p. :70℃ ~ 72℃。

[0657] 比较例 21 :N-PEG300 二溴代马来酰亚胺的制备

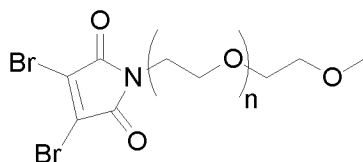
[0658]



[0659] 反应在严格干燥的条件下进行。 -78°C 时向 THF (5mL) 中的三苯基膦 (193.9mg, 0.7mmol) 中滴加偶氮二羧酸二异丙酯 (145.6 μl , 0.7mmol)。反应搅拌 5 分钟, 然后滴加 THF (4mL) 中的 PEG300 (200.0mg, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 并加入 THF (1mL) 中的新戊醇 (45.8mg, 0.5mmol)。反应搅拌 5 分钟, 加入 THF (2mL) 中的 3,4-二溴代马来酰亚胺 (189.4mg, 0.7mmol)。反应搅拌 10 分钟, 撤除冷浴, 在环境温度下搅拌 20 小时。在真空中除去溶剂, 残留物在硅胶上通过闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 5.0%) 纯化。收集包含产物的馏分, 并在真空中除去溶剂。仍然不纯的产物在硅胶上通过闪式色谱 (石油醚: 乙酸乙酯, 由 7:3 ~ 2:8 的梯度洗脱) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为黄色油状物 (137mg, 40%), 纯度为 97.5%。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 3.76 (t, 2H, J = 5.6, N-CH_2), 3.64-3.52 (m, 24H, 12x $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.49 (t, 2H, J = 4.4, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.32 (s, 3H, O-CH_3); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 163.8 (2x C), 129.5 (2x C), 72.0 (CH_2), 70.7-70.5 (9x CH_2), 70.1 (2x CH_2), 67.5 (CH_2), 59.1 (CH_3), 39.0 (CH_2); IR (固体, cm^{-1}): 3496 (w), 2869 (m), 1786 (m), 1720 (s), 1594 (m); MS (CI) m/z , (%): 580 ($^{81}\text{M}+\text{H}$, 12), 578 ($^{81,79}\text{M}+\text{H}$, 23), 576 ($^{79}\text{M}+\text{H}$, 12), 279 (100), 84 (61); $\text{C}_{19}\text{H}_{31}^{79}\text{Br}_2\text{O}_9\text{N}^{+}[\text{H}]$ 的计算质量: 576.0444. 测定值: 576.0437。

[0660] 比较例 22 :N-PEG5000 二溴代马来酰亚胺的制备

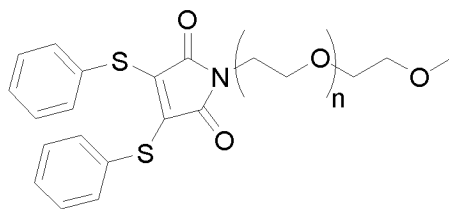
[0661]



[0662] 反应在严格干燥的条件下进行。 -78°C 时向 THF (8mL) 和 DCM (3mL) 的混合物中的三苯基膦 (154.6mg, 0.6mmol) 中滴加偶氮二羧酸二异丙酯 (116.0 μl , 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 滴加二氯甲烷 (7mL) 中的 PEG5000 (2950.0mg, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 加入 THF (1mL) 和 DCM (1mL) 的混合物中的新戊醇 (26.5mg, 0.3mmol)。反应搅拌 5 分钟, 再加入 THF (2mL) 中的 3,4-二溴代马来酰亚胺 (150.0mg, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 撤除冷浴, 在环境温度下搅拌 20 小时。在真空中除去溶剂, 残留物在硅胶上通过闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 5.0%) 纯化。收集包含产物的馏分, 并在真空中除去溶剂。仍然不纯的产物在硅胶上通过极慢的闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 6.0%) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为浅绿色结晶性粉末 (417mg, 13%)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 3.58 (s, 4x n H, CH_2); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 163.8 (C), 129.5 (C), 70.6 (CH_2); IR (固体, cm^{-1}): 3517 (w), 2872 (s), 1977 (w), 1727 (m), 1641 (w); m. p. $51^{\circ}\text{C} \sim 55^{\circ}\text{C}$ 。

[0663] 比较例 23 :N-PEG5000 二苯硫酚马来酰亚胺的制备

[0664]

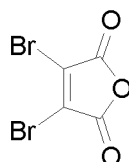


[0665] 反应在严格干燥的条件下进行。 -78°C 时向 THF (8mL) 和 DCM (3mL) 的混合物中的

三苯基膦 (167.7mg, 0.6mmol) 中滴加偶氮二羧酸二异丙酯 (125.9 μ l, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 滴加 DCM (7mL) 中的 PEG5000 (1600.0mg, 0.3mmol)。反应搅拌 5 分钟, 加入 THF (1mL) 和 DCM (1mL) 的混合物中的新戊醇 (56.3mg, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 加入 THF (3mL) 中的 3,4-二苯硫酚马来酰亚胺 (200.0mg, 0.6mmol)。反应搅拌 5 分钟, 撤除冷浴, 在环境温度下搅拌 20 小时。在真空中除去溶剂, 残留物在硅胶上通过闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 10.0%) 纯化。收集包含产物的馏分, 并在真空中除去溶剂。仍然不纯的产物在 TLC 级硅胶上通过闪式色谱 (甲醇: 二氯甲烷, 梯度洗脱, 甲醇由 0.5% 变至 10.0%) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为亮黄色结晶性粉末 (1.24g, 73%)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 7.26 (dd, H, J = 7.7, J = 4.5, CH), 7.23 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.6, CH), 7.19 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.8, CH), 3.63 (s, 4x n H, CH_2); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 166.7 (C), 135.7 (C), 131.9 (CH), 129.1 (C), 129.0 (CH), 128.4 (CH), 70.6 (CH_2); IR (固体, cm^{-1}): 3498 (w), 2881 (s), 1959 (w), 1711 (m); m. p.: 57°C ~ 59°C。

[0666] 比较例 24 : 2,3-二溴代马来酸酐的制备

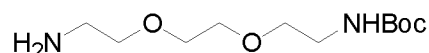
[0667]



[0668] 在惰性气氛下, 在密封的安瓿 (注意 - 防爆屏蔽) 中于 160°C 加热马来酸酐 (1.50g, 15.3mmol, 1 当量)、三氯化铝 (300mg, 0.21mmol, 催化剂) 和溴 (4.95g, 30.6mmol, 2 当量) 的溶液 16 小时。冷却至 21°C 时, 反应混合物搅拌再进行 24 小时, 并小心地与空气联通。加入 EtOAc, 滤出固体, 用更多的 EtOAc 反复洗涤。滤液在真空中最终浓缩以得到标题化合物, 其为黄色固体, 无需进一步纯化即可使用 (3.05g, 11.9mmol, 78% 产率)。m. p.: 107°C ~ 110°C; ^{13}C NMR (150MHz, CD_3OD) δ 163.33 (s), 125.28 (s); IR (MeOH) 1769, 1706, 1590 cm^{-1} ; HRMS (CI) $\text{C}_4\text{O}_3\text{Br}_2[\text{M}]^+$ 计算值: 253.82087, 测量值 253.82082。

[0669] 比较例 25 : N-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯的制备

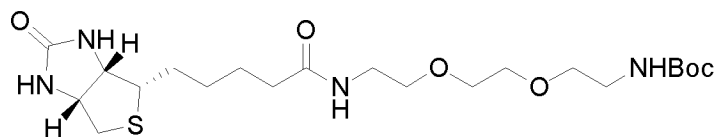
[0670]



[0671] 将二碳酸二叔丁酯 (1.10g, 5.00mmol, 1 当量) 在 CH_2Cl_2 (5mL) 中的溶液滴加至 2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙胺 (7.32mL, 50.0mmol, 10 当量) 在 CH_2Cl_2 (15mL) 中的溶液中。得到的反应混合物在 21°C 搅拌 24 小时。然后在真空中除去 CH_2Cl_2 , 剩下无色的残留物。加入 EtOAc (125mL), 生成白色沉淀, 其用饱和的 Na_2CO_3 溶液洗涤 (3x50mL), 用 MgSO_4 干燥, 并在真空中浓缩。利用柱色谱 (8 : 2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) 的进一步纯化提供了所需的单保护的胺, 其是无色的油状物 (0.69g, 2.80mmol, 56% 产率)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 5.27 (bs, 1H, NH), 3.54-3.52 (m, 4H, OCH_2), 3.47-3.42 (m, 4H, OCH_2), 3.23-3.22 (m, 2H, NCH_2), 2.80 (t, J = 5.0, 2H, NCH_2), 2.05 (bs, 2H, NH), 1.35 (s, 9H, CH_3); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 156.08 (s), 79.09 (s), 73.19 (t), 70.21 (t), 70.16 (t), 41.59 (t), 40.32 (t), 28.40 (q), *1t 缺失; IR (neat) 3344, 2869, 1692 cm^{-1} ; HRMS (CI) $\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值 249.18143, 测定值 249.18251。

[0672] 比较例 26 :N-(2-(2-(2-(5-(2-氧代-1,3,3a,4,6,6a-六氢噻吩并(3,4-d)咪唑-6-基)戊酰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯的制备

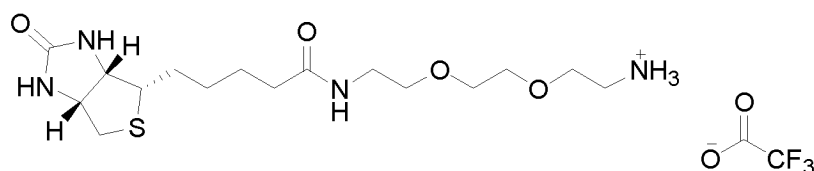
[0673]



[0674] 生物素 (0.59g, 2.42mmol, 1.5 当量)、HBTU (0.79g, 2.10mmol, 1.3 当量) 和 DIEA (0.45mL, 2.60mmol, 1.6 当量) 在 DMF (15mL) 中的溶液在 21℃ 搅拌 20 分钟, 然后滴加至 N-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (400mg, 1.61mmol, 1 当量) 在 DMF (10mL) 中的溶液中。反应混合物在 21℃ 搅拌 2 小时, 之后在真空中除去 DMF, 以得到黄色残留物。粗产物用柱色谱 (梯度 2% ~ 10%, MeOH/CH₂Cl₂) 纯化, 以得到所需的化合物, 其为白色固体 (0.61g, 1.29mmol, 80% 产率)。m. p. : 106℃ ~ 108℃; $[\alpha]_D^{20.0} + 23.0$ (c 0.6, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 4.55 (dd, J = 5.0, 7.5Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.36 (dd, J = 5.0, 7.5Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.62 (bs, 6H, OCH₂), 3.59-3.55 (m, 2H, OCH₂), 3.46 (m, 2H, NCH₂), 3.31 (m, 2H, NCH₂), 3.17 (dt, 3.0, 5.0Hz, 1H, SCH), 2.92 (dd, J = 5.0, 13.0Hz, 1H, SCHH), 2.79 (d, J = 13.0Hz, 1H, SCHH), 2.27 (t, J = 7.0Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.71 (m, 4H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.47 (br, 11H, C(CH₃)₃NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 173.69 (s), 163.92 (s), 155.99 (s), 79.14 (s), 70.03 (t), 69.69 (br t), 61.58 (d), 60.06 (d), 55.19 (d), 40.16 (t), 39.96 (t), 38.91 (t), 35.44 (t), 28.09 (q), 27.80 (t), 27.67 (t), 25.23 (t), *2t 缺失; IR (neat) 3307, 2933, 1691cm⁻¹; HRMS (ES) C₂₁H₃₈N₄O₆NaS[M+Na]⁺ 的计算值 497.2410, 测定值 497.2423。

[0675] 比较例 27 :2-(2-(2-(5-(2-氧代-1,3,3a,4,6,6a-六氢噻吩并(3,4-d)咪唑-6-基)戊酰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙胺; 2,2,2-三氟乙酸盐的制备

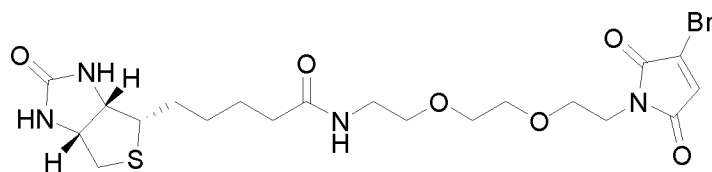
[0676]



[0677] N-(2-(2-(2-(5-(2-氧代-1,3,3a,4,6,6a-六氢噻吩并(3,4-d)咪唑-6-基)戊酰基氨基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯 (0.61g, 1.29mmol) 在 CH₂Cl₂ (5mL) 和 TFA (5mL) 中的溶液在 21℃ 搅拌 24 小时。然后加入甲苯 (x2), 在真空中除去溶剂以得到所需的化合物, 其为油状物 (0.63g, 1.29mmol, 100% 产率)。 $[\alpha]_D^{20.0} + 41.0$ (c 0.49, MeOH); ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 4.53 (dd, J = 5.0, 7.5Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.33 (dd, J = 5.0, 7.5Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.71 (t, J = 5.0Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₃), 3.65 (br, 4H, OCH₂), 3.57 (t, J = 5.0Hz, 2H, OCH₂), 3.38 (t, J = 5.0Hz, 2H, OCH₂), 3.22 (dt, J = 5.0, 8.5Hz, 1H, SCH), 3.13 (t, J = 5.0Hz, 2H, C(O)NHCH₂CH₂O), 2.94 (dd, J = 5.0, 13.0Hz, 1H, SCHH), 2.74 (d, J = 13.0Hz, 1H, SCHH), 2.24 (t, J = 7.5Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.76-1.43 (m, 6H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) δ 174.98 (s), 164.76 (s), 69.92 (t), 69.83 (t), 69.22 (t), 66.46 (t), 62.08 (d), 60.36 (d), 55.59 (d), 39.65 (t), 39.24 (t), 38.77 (t), 35.29 (t), 28.29 (t), 28.06 (t), 25.44 (t); IR (MeOH) 3300, 2941, 1686cm⁻¹; HRMS (ES) C₁₆H₃₁N₄O₄S[M+H]⁺ 的计算值

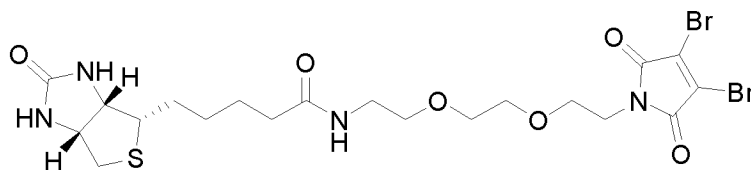
375. 2066, 测定值 375. 2060。

[0678] 比较例 28 :N-(2-(2-(2-(3- 溴代 -2,5- 二氧化 - 吡咯 -1- 基) 乙氧基) 乙氧基) 乙基)-5-(2- 氧代 -1,3,3a,4,6,6a- 六氢噻吩并 (3,4-d) 咪唑 -6- 基) 戊酰胺的制备
[0679]



[0680] 单溴代马来酸酐 (45.0mg, 0.25mmol, 1 当量) 一次性添加至 2-(2-(2-(5-(2- 氧代 -1,3,3a,4,6,6a- 六氢噻吩并 (3,4-d) 咪唑 -6- 基) 戊酰基氨基) 乙氧基) 乙氧基) 乙胺 2,2,2- 三氟乙酸盐 (124mg, 0.25mmol, 1 当量) 在 AcOH(10mL) 中的溶液中, 将反应混合物加热至 170℃ 保持 3 小时。冷却至 21℃ 时加入甲苯, 在真空中共沸除去 AcOH(x2) 以得到粗产物。柱色谱 (梯度 2% ~ 10% MeOH/CH₂Cl₂) 生成所需的化合物, 其为白色固体 (70.0mg, 0.13mmol, 52% 产率)。m. p. :95℃ ~ 98℃; $[\alpha]_D^{20.0} +65.1$ (c 0.15, MeOH); ¹H NMR (600MHz, CD₃OD) δ 7.17 (s, 1H, CHCBr), 4.51 (dd, J = 5.0, 8.0Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.33 (dd, J = 5.0, 8.0Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.77 (t, J = 5.5Hz, 2H, OCH₂), 3.68 (t, J = 5.5Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.58 (m, 2H, OCH₂), 3.53 (t, J = 5.5Hz, 2H, NCH₂), 3.37 (t, J = 5.5Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (td, J = 5.0, 8.0Hz, 1H, SCH), 2.95 (dd, J = 5.0, 12.5Hz, 1H, SCHH), 2.73 (d, J = 12.5Hz, 1H, SCHH), 2.26 (t, J = 7.0Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.69 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1.47 (五重峰, J = 7.0Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) δ 176.12 (s), 170.13 (s), 166.97 (s), 166.08 (s), 133.63 (s), 132.05 (d), 71.22 (t), 71.11 (t), 70.61 (t), 68.69 (t), 63.35 (d), 61.61 (d), 57.03 (d), 41.09 (t), 40.31 (t), 39.09 (t), 36.75 (t), 29.78 (t), 29.50 (t), 26.87 (t); IR (MeOH) 3355, 2970, 1737 cm⁻¹; HRMS (ES), C₂₀H₂₉N₄O₆NaSBr [M+Na]⁺ 的计算值 555.0889, 测定值 555.0905。

[0681] 比较例 29 :N-(2-(2-(2-(3,4- 二溴代 -2,5- 二氧化 - 吡咯 -1- 基) 乙氧基) 乙氧基) 乙基)-5-(2- 氧代 -1,3,3a,4,6,6a- 六氢噻吩并 (3,4-d) 咪唑 -6- 基) 戊酰胺的制备
[0682]

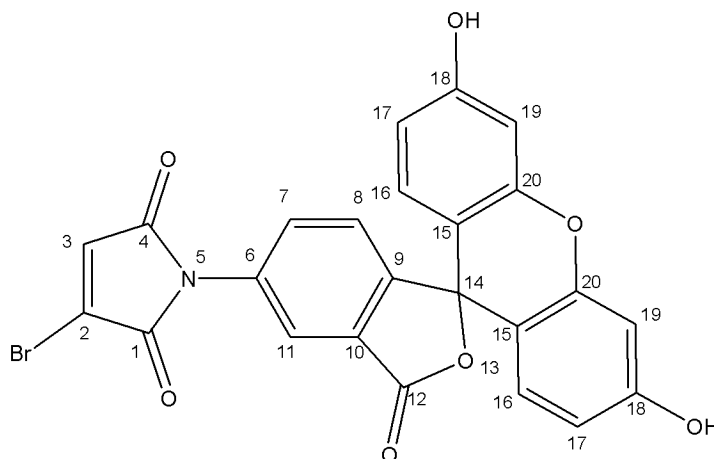


[0683] 将二溴代马来酸酐 (108mg, 0.42mmol, 1 当量) 一次性加入 2-(2-(2-(5-(2- 氧代 -1,3,3a,4,6,6a- 六氢噻吩并 (3,4-d) 咪唑 -6- 基) 戊酰基氨基) 乙氧基) 乙氧基) 乙胺 2,2,2- 三氟乙酸盐 (205mg, 0.42mmol, 1 当量) 在 AcOH(10mL) 中的溶液中。将反应混合物加热至 170℃ 保持 2 小时。冷却至 21℃ 时加入甲苯, 在真空中共沸除去 AcOH(x2) 以得到粗产物。柱色谱 (梯度 2% ~ 7% MeOH/CH₂Cl₂) 生成所需的化合物, 其为白色固体 (123mg, 0.20mmol, 48% 产率)。m. p. :100℃ ~ 102℃; $[\alpha]_D^{20.0} +71.0$ (c 0.15, MeOH); ¹H NMR (600MHz, CD₃OD) δ 4.53 (dd, J = 5.0, 8.0Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.34 (dd, J = 5.0, 8.0Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.82 (t, J = 5.5Hz, 2H, OCH₂), 3.70 (t, J = 5.5Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.59 (m, 2H, OCH₂), 3.53 (t, J = 5.5Hz, 2H, NCH₂), 3.37 (t, J = 5.5Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (dt, J =

5.0, 8.0 Hz, 1H, SCH), 2.96 (dd, $J = 5.0, 13.0$ Hz, 1H, SCHH), 2.73 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, SCHH), 2.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1.49 (五重峰, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 174.83 (s), 164.71 (s), 164.06 (s), 129.00 (s), 69.80 (t), 69.72 (t), 69.24 (t), 67.19 (t), 61.97 (d), 60.22 (d), 55.64 (d), 39.67 (t), 39.03 (t), 38.56 (t), 35.42 (t), 28.39 (t), 28.11 (t), 25.47 (t); IR (MeOH) 2970, 1724, 1365, 1217 cm⁻¹; HRMS (ES), C₂₀H₂₈N₄O₆NaSBr₂[M+Na]⁺ 的计算值 631.9916, 测定值 631.9937。

[0684] 比较例 30 :N- 荧光素溴代马来酰亚胺的制备

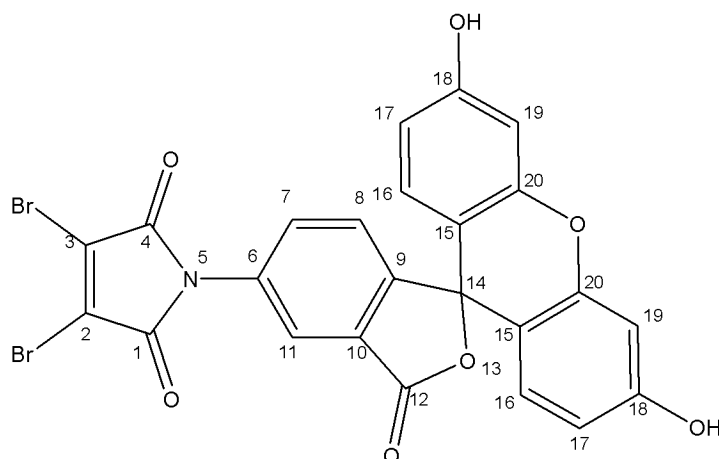
[0685]



[0686] 将二溴代马来酸酐 (346mg, 1.95mmol) 一次性加入氨基荧光素异构体 1 (678mg, 1.95mmol) 在乙酸 (65mL) 中的溶液中, 反应混合物在密封管中于室温搅拌 12 小时。然后将反应混合物加热至 150℃ 保持 3 小时。冷却至室温时, 将固体滤出并干燥 (甲苯共沸), 以得到所需的化合物, 其为橙色固体 (722mg, 1.43mmol, 73% 产率)。¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.99 (d, 1H, $J = 1.7$, 1H, H-11), 7.77 (dd, 1H, $J = 1.9$ 和 8.2, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-3), 7.43 (d, $J = 8.2$, 1H, H-8), 6.69 (m, 6H, 2 x H-16, 2 x H-17, 2 x H-18); ¹³C NMR (175 MHz, DMSO) δ 167.93 (C=O), 167.63 (C=O), 164.48 (C=O), 159.62 (2x C18), 151.79 (2x C20), 151.52 (C6), 133.68 (C7), 133.02 (Ar), 132.90 (C3), 131.23 (C), 129.15 (2 x Ar-H), 126.73 (C), 124.82 (C11), 122.29 (C8), 112.77 (2 x Ar-H), 109.08 (2 x Ar), 102.30 (2 x Ar-H), 83.36 (C14); IR (固体, cm⁻¹) 3064 (w), 1726 (s); MS (ES+) m/z , (相对强度): 508 ([⁸¹M], 95), 506 ([⁷⁹M], 100); [C₂₄H₁₃O₇N⁷⁹Br] 计算的准确质量为 505.9875, 测定值为 505.9833 (ES+)。

[0687] 比较例 31 :N- 荧光素二溴代马来酰亚胺的制备

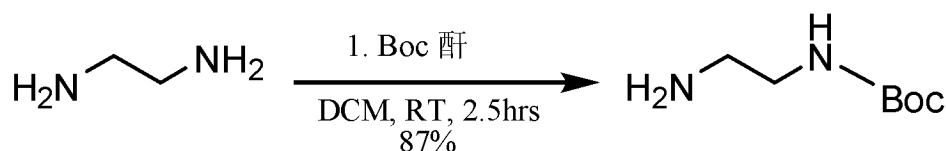
[0688]



[0689] 将二溴代马来酸酐 (77.0mg, 0.30mmol) 一次性加入氨基荧光素异构体 1 (105mg, 0.30mmol) 在乙酸 (10mL) 中的溶液中, 反应混合物在室温搅拌 6 小时。然后滤出固体, 用乙酸乙酯洗涤, 并再次溶解在乙酸 (10mL) 中。然后使反应混合物加热回流 3 小时。冷却至室温时, 加入甲苯 (10mL), 在真空中除去溶剂, 以得到所需的化合物, 其为橙色固体 (148mg, 0.25mmol, 84% 产率)。 $\delta^1\text{H}$ NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.07 (d, 1H, $J = 1.5$, H-11), 7.81 (dd, 1H, $J = 1.5$ 和 8.0, H-7), 7.34 (d, 1H, $J = 8.5$, H-8), 6.71–6.58 (m, 6H, 6 x Ar-H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ 170.23 (C=O), 164.34 (2 x C=O), 161.63 (2 x C), 154.18 (2 x C), 152.93 (C), 134.59 (C), 134.19 (Ar-H), 131.01 (C), 130.35 (Ar-H), 129.25 (2 x C), 126.25 (2 x Ar-H), 123.63 (Ar-H), 113.84 (2 x Ar-H), 111.02 (2 x C), 103.55 (2 x Ar-H); IR (固体, cm^{-1}) 3064 (w), 1732 (s); MS (ES+) m/z , (相对强度): 586 ($^{81+81}\text{M}$), 30, 584 ($^{79+81}\text{M}$), 100, 582 ($^{79+79}\text{M}$), 100; $[\text{C}_{24}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{N}^{79}\text{Br}_2]$ 计算所需的准确质量为 581.8824, 测定值 581.8824 (ES+)。

[0690] 比较例 32 : 2-氨基乙基氨基甲酸叔丁酯的制备

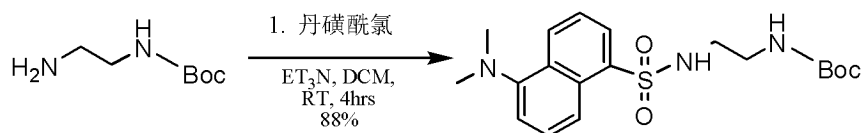
[0691]



[0692] 在氩气气氛下用 2 小时使用自动注射器将 DCM (30mL) 中的二碳酸二叔丁酯 (3.26g, 15mmol, 1 当量) 滴加至乙二胺 (10mL, 150mmol, 10 当量) 在 DCM (30mL) 溶液中。基于 TLC 分析 (洗脱液: 90% EtOAc : 10% MeOH $R_{f(8)} = 0.23$), 添加结束后 30 分钟, 反应完成。在减压下使用 Büchi 除去 DCM。将得到的残留物提取在 EtOAc (40mL) 中, 用饱和的 Na_2CO_3 洗涤 (3 x 20mL), 用 MgSO_4 干燥, 在真空中浓缩以获得所需的产物 (2.08g; 12.98mmol, 87%), 其为白色泡沫。mp (104°C ~ 106°C), δ_{H} ^1H NMR (300MHz CDCl_3): 4.95 (宽峰, 1H, NH), 3.12 (q, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H, CH_2), 2.78 (t, $J = 5.9\text{Hz}$, 2H, CH_2), 1.42 (s, 9H, 3 CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3): 28.06, 41.51, 43.02, 78.82, 155.9 IR: 3354.9 cm^{-1} , $[\text{M}+\text{H}]^+$: 161.00。

[0693] 比较例 33 : 2-(5-(二甲基氨基)萘-1-亚磺酰氨基)乙基氨基甲酸叔丁酯的制备

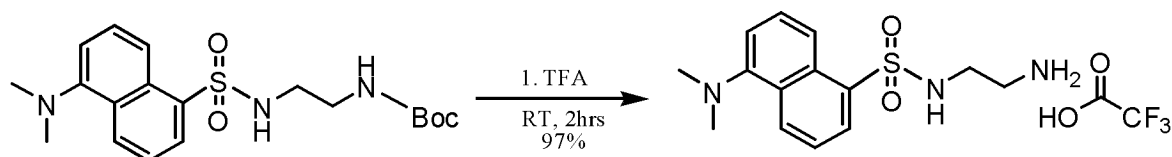
[0694]



[0695] 圆底烧瓶进行直火烘干,并配有搅拌棒和氩气气氛下的胺 (0.57g, 3.6mmol, 1 当量) 在干 DCM (150mL) 中的溶液。将干 DCM (150mL) 中的丹磺酰氯 (1.05g, 3.92mmol, 1.1 当量) 以及三乙胺 (1.3mL, 9.29mmol, 2.5 当量) 通过隔膜一次性加入。反应由 TLC (洗脱液: 35% EtOAc : 65% 石油醚 $R_{f(9)} = 0.27$, 在长 UV 下为荧光绿) 监测, 4 小时后反应完成。通过柱色谱 (洗脱液: 35% EtOAc : 65% 石油醚) 纯化之后, 形成所需的化合物 (1.24g, 3.15mmol, 88%), 其为粘稠的清澈的绿色油状物。 δ_H 1H NMR (CDCl₃): 8.55 (d, $J = 8.55\text{Hz}$, 1H, CH), 8.46 (d, $J = 8.51\text{Hz}$, 1H, CH), 8.33 (d, $J = 8.67\text{Hz}$, 1H, CH), 7.57 (m, 2H, 2xCH), 7.26 (d, $J = 7.08\text{Hz}$, 1H, CH), 3.07 (四重峰, $J = 6.58\text{Hz}$, 2H, CH₂), 2.89 (m, 2H, CH₂), 2.85 (s, 6H, 2xCH₃), 1.35 (s, 9H, 3xCH₃)。 δ_C ^{13}C NMR (CDCl₃): 158.01, 153.05, 136.5, 131.49, 131.09, 130.02, 129.54, 124.48, 120.59, 116.41, 80.41, 45.9, 43.81, 41.5, 28.5。 MS: [M+H]⁺: 393.16。

[0696] 比较例 34: 5-(3-氨基丙基磺酰基)-N,N-二甲基萘-1-胺 2,2,2-三氟乙酸化物的制备

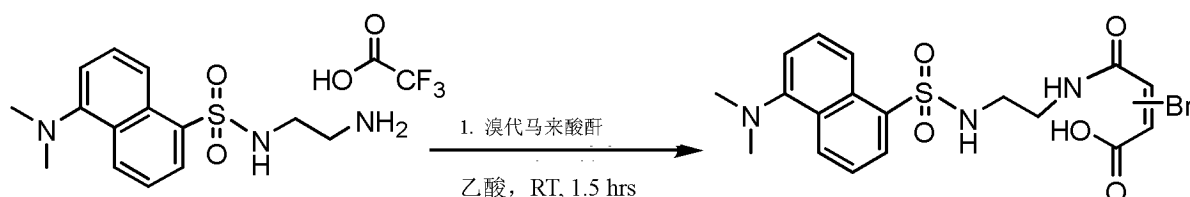
[0697]



[0698] 将 TFA (40mL) 一次性加入容纳有 Boc-氨基甲酸盐 (1.24g, 3.15mmol) 的烧瓶中。得到的灰色溶液在室温 (大约 25°C) 搅拌 2 小时。完成后, 使溶液在真空中浓缩, 并与甲苯共沸 (5 x 10mL)。得到的粗产物随后通过柱色谱 (洗脱液: EtOAc 1:2 石油醚 $R_{f(10)} = 0.20$) 纯化。在真空中浓缩相关馏分后, 向得到的黄色油状物中添加 DCM (100mL), 并将溶液放置在冰浴中 2 小时, 该溶液在长波 UV 下是发荧光的。所需的化合物 (1.25g, 3.10mmol, 97%) 作为白色固体由溶液坠出, 在重力下将其滤出并用二乙醚洗涤。Mp (114°C ~ 116°C); δ_H 1H NMR (500MHz MeOD): 8.64 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H, CH), 8.35 (d, $J = 8.45\text{Hz}$, 1H, CH), 8.32 (d, $J = 8.65\text{Hz}$, 1H, CH), 7.67 (m, 2H, 2xCH), 7.34 (d, $J = 7.3\text{Hz}$, 1H, CH), 3.03 (四重峰, 4H, 2xCH₂), 2.84 (s, 6H, 2x CH₃)。 δ_C ^{13}C NMR (500MHz MeOD): 153.41, 135.78, 131.69, 131.32, 130.81, 130.56, 129.48, 124.29, 120.07, 116.635, 66.91, 45.79, 41.27, 40.78, 15.45。 ^{19}F NMR (300MHz CDCl₃): -76.89; IR: 3092cm⁻¹, 2901.5cm⁻¹, MS: [M+H]⁺: 294。

[0699] 比较例 35: (E)-2-溴代-4-(2-(5-(二甲基氨基)萘-1-亚磺酰氨基)乙基氨基)-4-氧代丁烯-2-酸的制备

[0700]

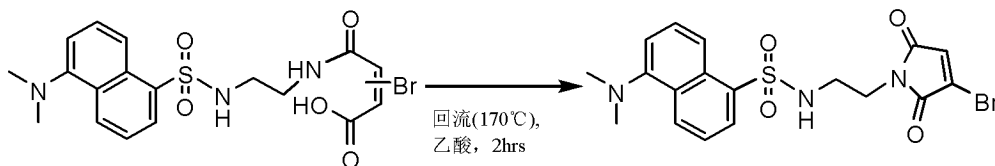


[0701] 烘干的 500mL 圆底烧瓶配有搅拌棒。将溶解在 25mL 乙酸中的胺盐 (1.09g,) 添加

到烧瓶中。将溴代马来酸酐添加至得到的浅黄色溶液中,反应用 TLC(洗脱液:10%甲醇:90% EtOAc, $R_{f(11)} = 0.7$) 监测。在室温 (25°C) 搅拌 1.5 小时后,在真空中除去乙酸。使用所需混合物无需进一步纯化。 ^1H NMR(500Mz CDCl_3 (Crude)): δ_{H} 8.6(d, $J = 8.56\text{Hz}$, 1H, CH), 8.35(d, 1H, $J = 8.27\text{Hz}$, CH), 8.22(d, 1H, $J = 8.57\text{Hz}$, CH), 7.64(m, 2H, 2 x CH), 7.30(d, $J = 7.60\text{Hz}$, 1H, CH), 5.48(s, 1H, CH)/5.03(s, 1H, CH), 3.00(m, 4H, 2x CH_2), 2.88(s, 9H, 2 x CH_3)。

[0702] 比较例 36 :N-(2-(3-溴代-2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-5-(二甲基氨基)萘-1-磺酰胺的制备

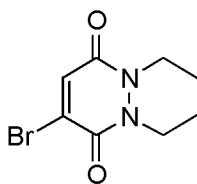
[0703]



[0704] 使该酸溶解在乙酸 (25mL) 中,然后装入烘干的 500ml 圆底烧瓶。装配冷凝器,反应在回流 (170°C) 下放置 2 小时。乙酸然后在真空中由粗混合物除去,得到的油状物与甲苯 (5 x 10ml) 共沸。所得的油状物用柱色谱(洗脱液:30%乙酸乙酯:70%石油醚, $R_{f(12)} = 0.2$, 在前述的洗脱液系统中) 纯化。一旦完成了极为缓慢的柱,收集更多的流动馏分,并除去溶剂。得到的褐色油状物放置在冰浴中的纯乙酸乙酯 (50ml) 中 1 小时。所需的产物 (0.961g, 80%) 作为褐色固体(粉末状质地)由溶液坠出,在重力下过滤并用二乙醚 (20ml) 洗涤。mp (166°C ~ 170°C); ^1H NMR(600MHz DMSO): δ_{H} 8.53(d, $J = 8.46\text{Hz}$, 1H, CH), 8.21(d, 1H, $J = 8.40\text{Hz}$, CH), 8.17(d, 1H, $J = 8.58\text{Hz}$, CH), 7.56(m, 2H, 2 x CH), 7.18(d, $J = 7.50\text{Hz}$, 1H, CH), 6.46(s, 1H, 马来酰亚胺烯炔 C-H), 5.11(t, $J = 6.24$, 1H, NH), 3.56(m, 2H, CH_2), 3.2(m, 2H, CH_2), 3.91(s, 6H, 2x CH_3). $\delta_{\text{C}}^{13}\text{C}$ NMR(600MHz DMSO): 168.62, 165.33, 151.38, 151.38, 135.62, 132.33, 130.13, 129.60, 129.09, 128.85, 128.30, 127.96, 123.61, 118.99, 115.22, 45.11, 40.05, 39.37, 38.47。

[0705] 比较例 37 :4-溴代-1,2-二乙基-1,2-二氢-哒嗪-3,6-二酮 (BrDDPD) 的制备

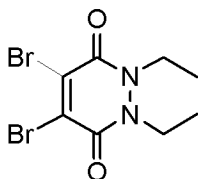
[0706]



[0707] 将冰 AcOH (3mL) 中的单溴代马来酸酐 (177mg, 1.0mmol) 和 N, N' -二乙基胍 (88mg, 1.0mmol) 的混合物在 130°C 加热 16 小时。在真空中除去溶剂,粗残留物通过柱色谱(纯 CH_2Cl_2 -5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) 纯化,以得到 4-溴代-1,2-二乙基-1,2-二氢-哒嗪-3,6-二酮,其为黄色固体 (159mg, 0.64mmol, 64%); ^1H NMR(600MHz, CDCl_3) δ 7.31(s, 1H), 4.14(q, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 4.07(q, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 1.26(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H), 1.22(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H); ^{13}C NMR(150MHz, CDCl_3) δ 156.2(s), 154.3(s), 136.0(d), 133.7(s), 41.9(t), 40.7(t), 13.3(q), 13.3(q); IR(固体) 3058, 2979, 2938, 1631, 1595 cm^{-1} ; LRMS(CI) 249(100, $[\text{M}^{81}\text{Br}+\text{H}]^+$), 247(100, $[\text{M}^{79}\text{Br}+\text{H}]^+$); HRMS(CI), $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值 249.0082, 测定值 249.0086。

[0708] 比较例 38 :4,5- 二溴代 -1,2- 二乙基 -1,2- 二氢 - 哒嗪 -3,6- 二酮 (DiBrDDPD) 的制备

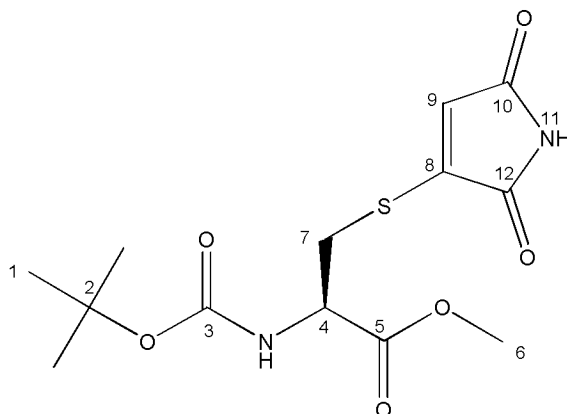
[0709]



[0710] 将冰 AcOH(3mL) 中的单溴代马来酸酐 (256mg, 1.0mmol) 和 N, N' - 二乙基胍 (88mg, 1.0mmol) 的混合物在 130℃ 加热 16 小时。在真空中除去溶剂, 粗残留物通过柱色谱 (纯 CH₂Cl₂-5% MeOH/CH₂Cl₂) 纯化, 以得到 4,5- 二溴代 -1,2- 二乙基 -1,2- 二氢 - 哒嗪 -3,6- 二酮, 其为黄色固体 (202mg, 0.62mmol, 62%) : ¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ 4.17(q, J = 7.0Hz, 4H), 1.28(t, J = 7.0Hz, 6H) ; ¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ 153.3(s), 136.1(s), 42.4(t), 13.2(q) ; IR(固体) 2979, 2937, 1630, 1574cm⁻¹ ; LRMS(EI) 328(50, [M⁸¹Br⁸¹Br]⁺), 326(100, [M⁸¹Br⁷⁹Br]⁺), 324(50, [M⁷⁹Br⁷⁹Br]⁺) ; HRMS(EI) C₈H₁₀Br₂N₂O₂ [M⁷⁹Br⁷⁹Br]⁺ 的计算值 323.9104, 测定值 323.9097。

[0711] 比较例 39 :N-Boc-Cys(Mal)-OMe 的制备

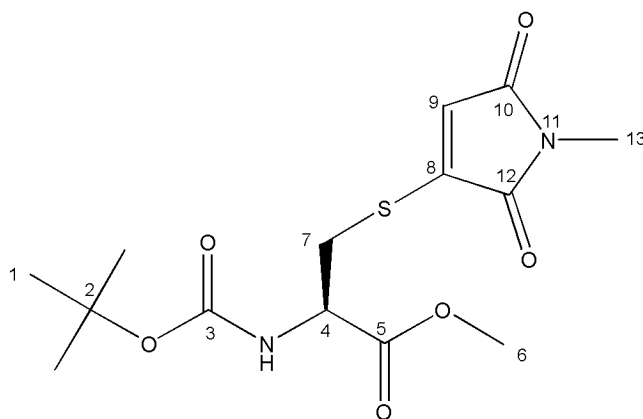
[0712]



[0713] 向 N-Boc-Cys-OMe(36mg, 0.15mmol) 和乙酸钠 (13mg, 0.15mmol) 在甲醇 (3mL) 中的搅拌溶液中滴加甲醇 (3mL) 中的溴代马来酰亚胺 (30mg, 0.17mmol)。1 分钟后在真空中除去溶剂。通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中的 50% 乙酸乙酯至乙酸乙酯) 进行纯化, 得到 100% 的浅黄色粉末 N-Boc-Cys(Mal)-OMe(51mg, 0.15mmol)。^{δ_H}(500MHz, CDCl₃) 7.63(s, 1H, mal-NH), 6.27(s, 1H, 9-H), 5.40(d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67(ddd, 1H, J = 5.1, 5.4 和 6.8, H-4), 3.80(s, 3H, H₃-6), 3.48(dd, 1H, J = 5.1 和 13.8, HH-7), 3.62(dd, 1H, J = 5.4 和 14.1, HH-7) 1.45(s, 9H, 3 x H₃-1) ; ^{δ_C}(125MHz, CDCl₃) 170.2(C = O), 168.9(C = O), 167.6(C = O), 155.2(C = O), 155.9(C8), 119.7(C9), 81.1(C2), 53.3(C6), 52.7(C4), 34.0(C7), 28.3(3 x C1) ; IR(固体, cm⁻¹) 3236(w), 1715(s) ; MS(CI+) m/z, (相对强度) : 331([M+H], 5), 275(20), 231(100) ; [C₁₃H₁₈O₆N₂S]+H 的计算质量需要 331.0964, 测定值为 331.0968(CI+) ; ²⁰α_D : -41.9° (c = 1.0, 甲醇) ; m. p. 145℃ ~ 147℃ ; UV(乙腈) ε₂₄₅ = 14200 和 ε₃₃₉ = 8600cm⁻¹M⁻¹d³。

[0714] 比较例 40 :N-Boc-Cys(N'-Me-Mal)-OMe 的制备

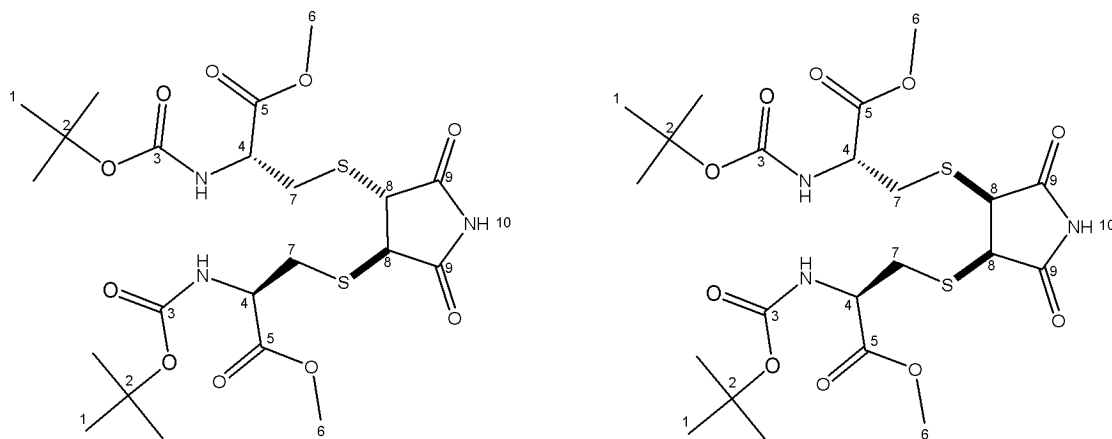
[0715]



[0716] 向 N-Boc-Cys-OMe (32mg, 0.136mmol) 在甲醇 (4mL) 中的搅拌溶液中添加乙酸钠 (82mg, 0.408mmol)。用 10 分钟再向其中加入甲醇 (4mL) 中的 N-甲基溴代马来酰亚胺 (25.8mg, 0.136mmol)。溶剂在真空中除去, 用闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中的 10% 乙酸乙酯至石油醚中的 30% 乙酸乙酯) 进行纯化, 得到所需的化合物, 其为淡白色粉末 (39.3mg, 0.114mmol), 产率为 84%。 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 6.26 (s, 1H, H-9), 5.36 (d, 1H, $J = 6.3$, 'Boc' NH), 4.66 (m, 1H, H-4), 3.79 (s, 3H, H_3 -6), 3.46 (dd, 1H, $J = 5.0$ 和 5.2, HH-7), 3.35 (dd, 1H, $J = 5.1$ 和 13.7, HH-7), 3.00 (s, 3H, H_3 -13), 1.44 (s, 9H, 3 x H_3 -1); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 170.2 (C=O), 169.5 (C=O), 167.9 (C=O), 155.0 (C=O), 149.9 (C8), 118.7 (C9), 80.9 (C2), 53.1 (C6), 52.7 (C4), 33.8 (C7), 28.3 (3 x C1), 24.1 (C13); IR (固体, cm^{-1}) 3368 (m), 2977 (m), 1695 (s); MS (ES+) m/z , (相对强度): 311 (M^+ , 100); $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ 计算的质量为 367.0940。测定值: 367.0931; $^{20}\alpha_{\text{D}}$: -18.55° ($c = 1.0$, Methanol); m.p.: 101°C ~ 103°C。

[0717] 实施例 9: 2,3-二 (N-Boc-Cys-OMe) 琥珀酰亚胺 (非对映异构体的混合物) 的制备

[0718]



[0719] 向溴代马来酰亚胺 (50mg, 0.28mmol) 在水性缓冲液 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0; DMF, 95 : 5 (9.25mL) 中的搅拌溶液中添加 DMF (0.25mL) 中的 N-Boc-Cys-OMe (660mg, 2.81mmol)。5 分钟后水性反应混合物用乙酸乙酯萃取 (3 x 25mL), 组合的有机层用饱和的氯化锂溶液 (水性) (5 x 25mL)、水 (25mL) 和盐水 (25mL) 洗涤, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤, 并在真空中除去溶剂。通过柱色谱 (石油醚中的 10% ~ 40% 乙酸乙酯) 进行纯化得到了 2,3-二 (N-Boc-Cys-OMe) 琥珀酰亚胺 (非对映异构体的混合物), 其为黄

色含蜡油 (150mg, 0.27mmol, 94% 产率), 两种对称的非对映异构体的不可分的 1 : 1 混合物; δ_{H} (400MHz, CDCl_3) 8.62 (s, 1H, 马来酰亚胺 NH 来自一个对称的非对映异构体), 8.66 (s, 1H, 马来酰亚胺 NH 来自一个对称的非对映异构体), 5.62 (d, 2H, $J = 8.4$, 2 x 'Boc' NH 来自一个对称的非对映异构体), 5.51 (d, 2H, $J = 8.0$, 2 x 'Boc' NH 来自一个对称的非对映异构体), 4.72-4.58 (m, 4 x H-4 来自两个非对映异构体), 3.80 (s, 6H, 2 x H_3 -6 来自一个对称的非对映异构体), 3.79 (s, 6H, 2x H_3 -6 来自一个对称的非对映异构体), 3.68 (s, 2H, 2 x H-8 来自一个对称的非对映异构体), 3.64 (s, 2H, 2 x H-8 来自一个对称的非对映异构体), 3.46 (dd, 2H, $J = 4.8$ 和 12.0Hz, 2 x HH-7* 来自一个对称的非对映异构体), 3.37 (dd, 2H, $J = 6.0$ 和 14.4, 2 x HH-7[†] 来自一个对称的非对映异构体), 3.21 (dd, 2H, $J = 4.8$ 和 14.0Hz, 2 x HH-7[†] 来自一个对称的非对映异构体), 3.11 (dd, 2H, $J = 6.4$ 和 14.0Hz, 2 x HH-7* 来自一个对称的非对映异构体), 1.463 (s, 18H, 6 x H_3 -1 来自一个对称的非对映异构体), 1.460 (s, 18H, 6 x H_3 -1 来自一个对称的非对映异构体);

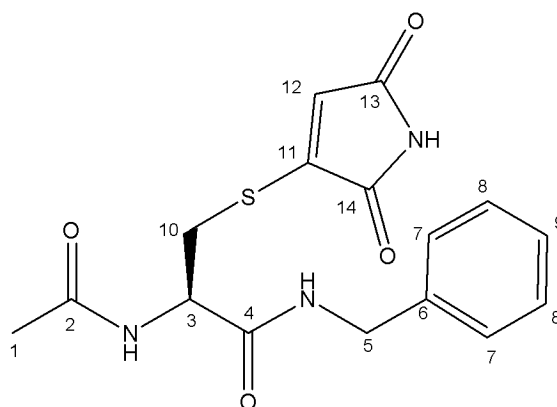
[0720] * -signals 显示为同一 AB 系统的一部分, 根据 HMQC 数据

[0721] [†] -signals 显示为同一 AB 系统的一部分, 根据 HMQC 数据

[0722] δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 174.32 (2 x C = O), 171.25 (2 x C = O), 155.33 (2 x C = O), 80.61 (2 x C2), 80.58 (2 x C2), 53.51 (2 x C4), 53.18 (2 x C4), 52.91 (2 x C6), 52.90 (2 x C6), 48.45 (2 x C8), 47.89 (2 x C8), 34.66 (2 x C7), 34.59 (2 x C7), 28.37 (6 x C1), 28.36 (6 x C1) 因为非对映异构体的重叠导致一些碳信号缺失; IR (薄膜, neat) 3348, 2978, 1719 cm^{-1} ; MS (EI) m/z (相对强度): 566 ([M+H], 20), 564 ([M-H], 100); $[\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}_2]$ -H 计算的准确质量需要 564.1669。测定值 564.1686。

[0723] 比较例 41 : N-Ac-Cys (Mal)- 苄基胺的制备

[0724]

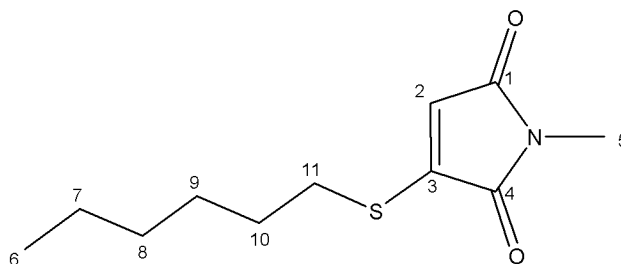


[0725] 用 5 分钟向甲醇 (42mL) 中的 N-Ac-Cys- 苄基胺 (1.00g, 4.00mmol) 如上) 中滴加甲醇 (42mL) 中的溴代马来酰亚胺 (777mg, 4.37mmol)。10 分钟后, 溶剂在真空中除去, 使用石油醚中的 10% 的乙酸乙酯对残留物进行闪式色谱, 得到所需的化合物, 其为本白色固体 (429mg, 1.2mmol) 100% 产率, 基于马来酰亚胺的 69% 的回收。 δ_{H} (500MHz, MeOD) 7.32-7.20 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.45 (s, 1H, H-12), 4.71 (t, 1H, $J = 7.3$, H-3), 4.38 (d, 2H, $J = 2.7$, H_2 -5), 3.40 (dd, 1H, $J = 7.0$ 和 13.6, HH-10), 3.25 (dd, 1H, $J = 7.2$ 和 13.6, HH-10), 1.99 (s, 3H, H_3 -1); δ_{C} (125MHz, MeOD) 173.51 (C = O), 172.22 (C = O),

171.44(C=O), 170.51(C=O), 151.58(C11), 139.48(C6), 129.54(2 x Ar-H), 128.51(2 x Ar-H), 128.26(C9), 121.01(C12) 53.04(C3), 44.25(C5), 33.72(C10), 22.42(C1); IR(膜, cm^{-1}) 3187(w), 1717(s), 1646(s); MS(ES+) m/z (相对强度): 370([M+Na], 20), 337(50), 325(90), 309(100); $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{SN}] + \text{Na}$ 计算的准确质量需要 m/z 370.0873, 测定值 370.0852(ES+); UV(乙腈) $\epsilon_{213} = 19400$, $\epsilon_{247} = 4800$ 和 $\epsilon_{337} = 2700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$; 白色固体在 180°C 分解。

[0726] 比较例 42 : N-甲基己硫基马来酰亚胺的制备

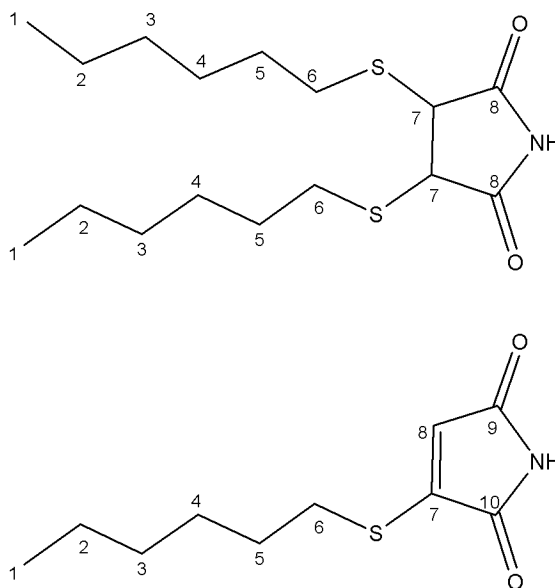
[0727]



[0728] 在剧烈搅拌的条件下用 1 小时向甲醇 (15mL) 中的 N-甲基溴代马来酰亚胺 (100mg, 0.53mmol) 和乙酸钠三水合物 (70mg, 0.53mmol) 中滴加己硫醇 (74 μL , 0.58mmol)。5 分钟后, 溶剂在真空中除去。通过柱色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 的乙酸乙酯至石油醚中 30% 的乙酸乙酯) 进行的纯化得到了所需的化合物, 其为亮黄色固体 (99mg, 0.44mmol), 产率为 83%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 6.03(s, 1H, H-2), 3.01(s, 3H, H₃-5), 2.89(t, 2H, J = 7.6, 2H, H₂-11), 1.76-1.71(m, 2H, H₂-10), 1.46-1.41(m, 2H, H₂-9), 1.33-1.27(m, 4H, H₂-7 和 CH₂-8), 0.89(t, 3H, J = 6.5, H₃-6); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 171.47(C=O), 169.94(C=O), 151.84(C3), 117.27(C2), 31.92(C11), 31.31(CH₂), 28.64(CH₂), 27.75(CH₂), 24.10(C5), 24.10(C7), 14.09(C6); IR(oil, cm^{-1}) 2727(w), 1708(s); MS(FAB+) m/z (相对强度): 250([M+Na], 40), 228(35), 199(30), 176(100); $[\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}] + \text{Na}$ 计算的准确质量需要 m/z 250.0878。测定值 250.0880(FAB+)。

[0729] 比较例 43 : 2,3-二己硫基琥珀酰亚胺和己硫基马来酰亚胺的制备

[0730]



[0731] 方法 A

[0732] 向甲醇 (60mL) 中的溴代马来酰亚胺 (300mg, 1.69mmol) 和乙酸钠 (138mg, 1.69mmol) 中添加己硫醇 (356 μ L, 2.50mmol)。5 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (石油醚中的 10% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到了 2,3 二己硫醇琥珀酰亚胺, 其为亮黄色糊状物 (13mg, 0.04mmol), 产率为 2%, 以及己硫基马来酰亚胺, 其为米色粉末 (烯烃 310mg, 1.46mmol), 产率为 86%。

[0733] 2,3 二己硫基琥珀酰亚胺

[0734] δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 8.21 (s, 1H, NH), 3.49 (s, 2H, 2 x H-7), 2.89-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 2.79-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 1.71-1.57 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.44-1.37 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.34-1.26 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.89 (t, 6H, J = 6.8, 2 x H_3 -1); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 174.60 (2 x C=O), 48.23 (2 x C7), 32.34 (2 x CH_2), 31.26 (2 x CH_2), 28.99 (2 x CH_2), 28.46 (2 x CH_2), 22.56 (2 x CH_2), 14.27 (2 x C1); IR (固体, cm^{-1}) 3198 (m), 2928 (m), 1703 (s); 未发现质量离子。

[0735] 己硫基马来酰亚胺

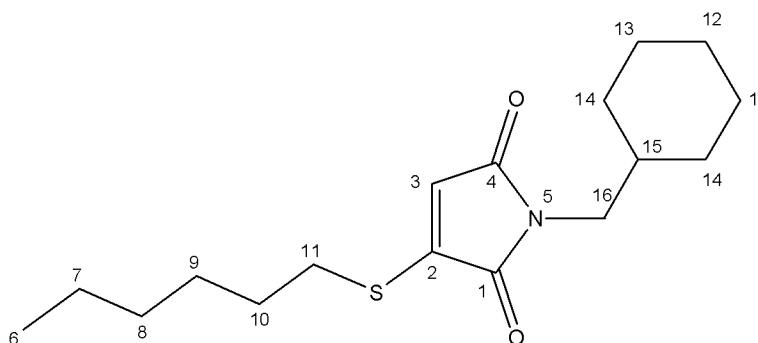
[0736] δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 7.35 (s, 1H, NH), 6.04 (s, 1H, H-8), 2.91 (t, 2H, H_2 -6), 1.78-1.72 (m, 2H, H_2 -5), 1.48-1.42 (m, 2H, CH_2), 1.33-1.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.90 (t, 3H, J = 6.9, H_3 -1); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 169.06 (C=O), 167.69 (C=O), 152.74 (C7), 118.24 (C8), 32.06 (C6), 31.26 (CH_2), 28.58 (CH_2), 27.70 (CH_2), 22.52 (CH_2), 14.03 (C1); IR (固体, cm^{-1}) 3200 (m), 2918 (m), 1703 (s); MS (ES-) m/z (相对强度): 212 ([M-H], 100); $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}]$ -H 计算的准确质量需要 m/z 212.0745, 测定值 212.0753 (ES-); m.p. 99°C ~ 101°C; UV (乙腈) $\epsilon_{247} = 12000$ 和 $\epsilon_{347} = 9500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$ 。

[0737] 方法 B

[0738] 向甲醇 (100mL) 中的溴代马来酰亚胺 (300mg, 1.69mmol) 和乙酸钠 (138mg, 1.69mmol) 中添加己硫醇 (237 μ L, 1.69mmol)。5 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (石油醚中的 10% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到了己硫基马来酰亚胺, 其为米色粉末 (362mg, 1.69mmol), 产率为 100%。

[0739] 比较例 44 :N- 亚甲基环己烷己硫基马来酰亚胺的制备

[0740]

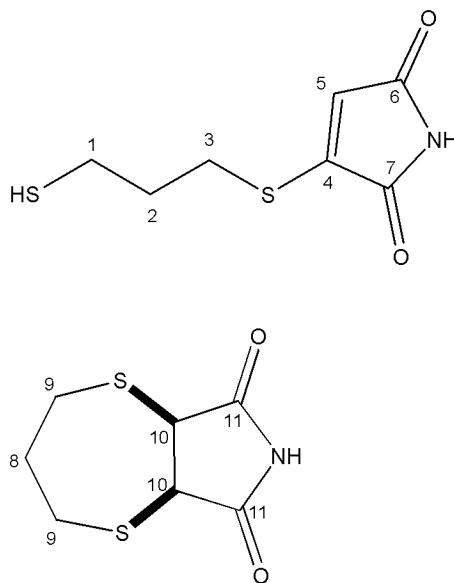


[0741] 用 5 分钟向甲醇 (50mL) 中的 N- 亚甲基环己烷溴代马来酰亚胺 (50mg, 0.19mmol) 中滴加甲醇 (50mL) 中的己硫醇 (52 μ L, 0.37mmol) 和乙酸钠 (50mg, 0.37mmol)。10 分钟后, 溶剂在真空中除去, 残留物进行闪式色谱 (石油醚) 以得到所需的化合物, 其为本白色固体 (29mg, 0.09mmol), 产率为 84%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 6.01 (s, 1H, H-3), 6.27 (s,

1H, 9-H), 3.42(d, 1H, $J = 6.8$, NH), 4.67(ddd, 1H, $J = 5.1, 5.4$ 和 6.8 , H-4), 3.80(s, 3H, H₃-6), 3.48(dd, 1H, $J = 5.1$ 和 13.8 , HH-7), 3.62(dd, 1H, $J = 5.4$ 和 14.1 , HH-7) 1.45(s, 9H, 3 x H₃-1); δ_c (125MHz, CDCl₃) 170.23(C=O), 16844(C=O), 151.49(C2), 117.08(C3), 44.36(C16), 37.00(C15), 31.91(2 x CH₂), 31.32(2 x CH₂), 30.73(CH₂), 28.66(CH₂), 27.78(CH₂), 26.33(CH₂), 25.73(2 x CH₂), 22.58(CH₂), 14.10(C6); IR(固体, cm⁻¹) 2927(m), 1700(s); MS(ES+) m/z, (相对强度): 310([M+H], 100), 180(40); [C₁₇H₂₇O₂NS]+H 计算的质量需要 310.1841, 测定值为 310.1828(ES+).

[0742] 比较例 45: 3-巯基丙硫基马来酰亚胺和 1,5-二硫代-8-氮杂-二环[5,3,0]癸烷-7,9-二酮的制备

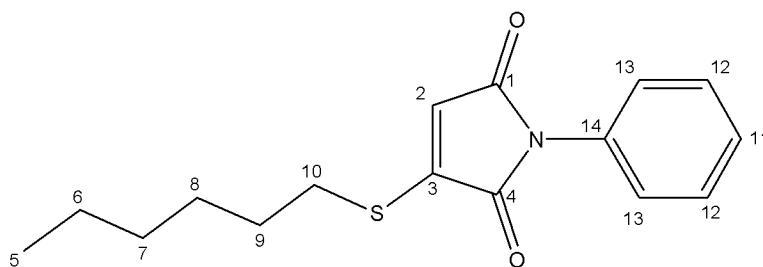
[0743]



[0744] 向甲醇(6mL)中的溴代马来酰亚胺(30mg, 0.17mmol)和乙酸钠(14mg, 0.17mmol)中添加 1,3-丙二硫醇(17 μ L, 0.17mmol)。5 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱(石油醚中的 10% 乙酸乙酯)得到 3-巯基丙硫基马来酰亚胺和 1,5-二硫代-8-氮杂-二环[5,3,0]癸烷-7,9-二酮, 其为浅黄色粉末, 是两种不可分的异构体 3-巯基丙硫基马来酰亚胺(7mg, 0.03mmol), 产率为 21% 和 1,5-二硫代-8-氮杂-二环[5,3,0]癸烷-7,9-二酮(12mg, 0.06mmol), 产率为 34% 的混合物。 δ_H (500MHz, MeOD) 6.28(s, 1H, H-5), 4.41(s, 3.2H, 2 x H-10), 3.15(t, 2H, $J = 7.3$, H₂-3), 2.82-2.77(m, 3.2H, CH₂), 2.35(t, 3.2H, $J = 13.1$, CH₂), 2.30-2.25(m, 2H, CH₂), 2.20-2.13(m, 2H, CH₂), 1.91-1.83(m, 3.2H, CH₂); δ_c (125MHz, MeOD) 177.79(2 x C11), 172.33(C=O), 170.56(C=O), 152.37(C4), 120.30(C5), 54.52(2 x C10), 34.94(2 x C9), 32.16(CH₂), 31.10(CH₂) 30.96(CH₂), 27.49(CH₂); IR(固体, cm⁻¹) 3246(m), 1703(s); MS(ES-) m/z (相对强度): 202([M-H], 100); [C₇H₉N₂O₂S₂]-H 计算的准确质量需要 m/z 201.9996, 测定值 201.9996(ES-).

[0745] 比较例 46: N-苯基己硫基马来酰亚胺的制备

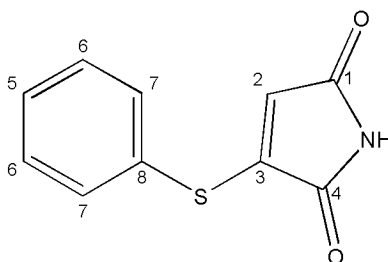
[0746]



[0747] 在剧烈搅拌下用 1 小时向甲醇 (60mL) 中的己硫醇 (111 μ L, 0.79mmol) 和乙酸钠三水合物 (108mg, 0.79mmol) 中添加甲醇 (60mL) 中的 N-苯基单溴代马来酰亚胺 (200mg, 0.79mmol)。5 分钟后溶剂在真空中除去。通过柱色谱进行的纯化 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 的乙酸乙酯至石油醚中 30% 的乙酸乙酯) 得到了所需的化合物, 其为浅黄色固体 (109mg, 0.38mmol), 产率为 48%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.45 (dd, 2H, $J = 7.1$ and 8.0, 2 x H-12), 7.36 (d, 2H, $J = 6.0$, H-11), 7.35 (d, 2H, $J = 8.1$, 2 x H-13), 6.19 (s, 1H, H-2), 2.96 (t, 2H, $J = 7.9$, H_2 -10), 1.81-1.76 (m, 2H, H_2 -9), 1.50-1.45 (m, 2H, H_2 -8), 1.34-1.32 (m, 4H, H_2 -6 和 H_2 -7), 0.91 (t, 3H, $J = 6.9$, H_3 -5); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 168.59 (C = O), 166.96 (C = O), 152.20 (C3), 131.53 (C14), 129.21 (2 x Ar-H), 127.93 (C11), 126.09 (2 x Ar-H), 117.24 (C2), 32.03 (C10), 31.33 (CH_2), 28.68 (CH_2), 27.78 (CH_2), 22.59 (CH_2), 14.11 (C5); IR (油, cm^{-1}) 2931 (w), 1703 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 290 ([M+H], 100); $[\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 290.1215, 测定值 290.1224 (CI+);

[0748] 比较例 47: 苯硫基马来酰亚胺的制备

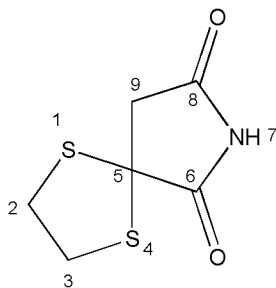
[0749]



[0750] 在剧烈搅拌的条件下用 1 小时向甲醇 (30mL) 中的苯硫酚 (57 μ L, 0.56mmol) 和乙酸钠三水合物 (136mg, 0.56mmol) 中加入甲醇 (30mL) 中的单溴代马来酰亚胺 (100mg, 0.56mmol)。5 分钟溶剂在真空中除去。通过柱色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 的乙酸乙酯至石油醚中 30% 的乙酸乙酯) 进行的纯化得到了所需的化合物, 其为浅黄色固体 (22mg, 0.11mmol), 产率为 19%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.56 (dd, 2H, $J = 1.6$ and 7.8, 2 x H-7), 7.50-7.48 (m, 3H, 3 x Ar), 5.63 (s, 1H, H-2); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 169.42 (C = O), 167.98 (C = O), 153.60 (C3), 134.45 (2 x Ar-H), 130.68 (C5), 130.42 (2 x Ar-H), 127.27 (C8), 119.91 (C2); IR (油, cm^{-1}) 3265 (m), 1770 (m), 1701 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 206 ([M+H], 100), 111 (40); $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 206.0276, 测定值 206.0273 (CI+);

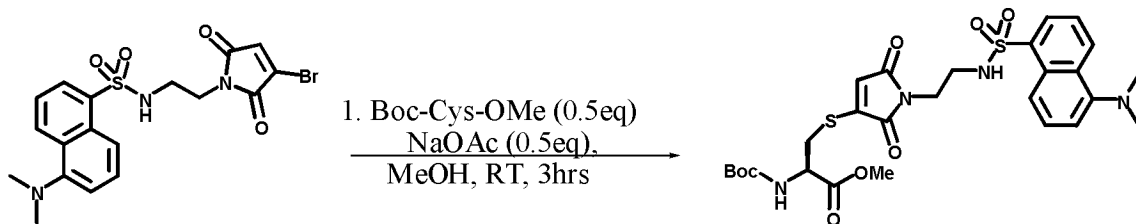
[0751] 比较例 48: 1,4-二硫代-7-氮杂-螺[4.4]壬烷-6,8-二酮的制备

[0752]



[0753] 向甲醇 (6mL) 中的溴代马来酰亚胺 (30mg, 0.17mmol) 和乙酸钠 (14mg, 0.17mmol) 中添加 1,2- 乙二硫醇。5 分钟后溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 的乙酸乙酯至石油醚中 30% 的乙酸乙酯) 得到所需的化合物, 其为浅黄色粉末 (13mg, 0.07mmol), 产率为 41%。 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 8.39 (s, 1H, NH), 3.75-3.69 (m, 2H, HH-2 和 HH-3), 3.60-3.53 (m, 2H, HH-2 和 HH-3), 3.30 (s, 2H, H_2 -9); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 177.93 (C=O), 172.76 (C=O), 61.23 (C5), 43.12 (C9), 41.05 (C2 和 C3); IR (固体, cm^{-1}) 3290 (m), 1703 (m), 1629 (s); MS (ES-) m/z (相对强度): 188 ([M-H], 100); $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}_2]^- \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 187.9840, 测定值 187.9839 (ES-); m.p.: 112°C ~ 115°C。

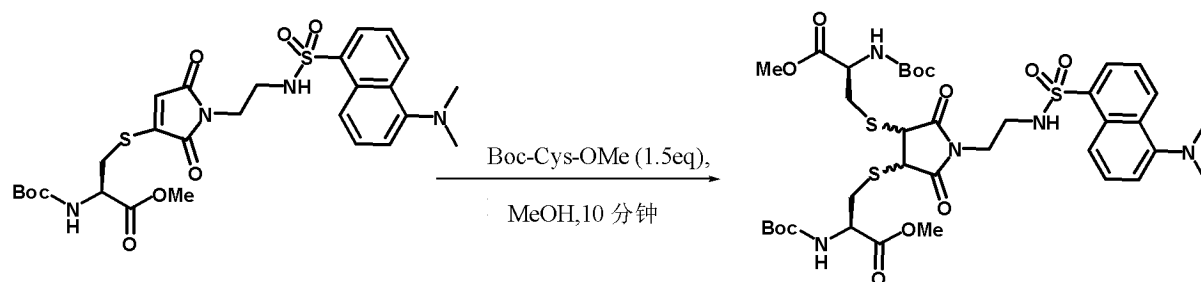
[0754] 实施例 10: (S)- 甲基 2-(叔丁氧基羰基氨基)-3-(1-(2-(5-(二甲基氨基)萘-1-亚磺酰氨基)乙基)-2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基硫代)丙酸酯的制备 [0755]



[0756] 通过使用空气加热枪短暂加热搅拌溶液使丹酰-溴代马来酰亚胺 (100mg) 溶解在甲醇 (200mL) 中。向得到的浅黄色溶液中加入 3 小时加入 N-Boc-Cys-OMe (22 μL , 0.1mmol, 0.5 当量) 和乙酸钠 (14.5mg, 0.1mmol, 0.5 当量)。反应由 TLC (洗脱液: 40% EtOAc: 60% 石油醚) 监测。一旦添加完成, 则在真空中除去甲醇, 得到黄色油状物。通过柱色谱进行的纯化得到了所需的产物 (48.29mg, 0.08mmol, 79.7%)。 ^1H NMR (600MHz CDCl_3): δ_{H} 8.54 (d, $J = 8.56\text{Hz}$, 1H, CH), 8.21 (d, 1H, $J = 8.27\text{Hz}$, CH), 8.13 (d, 1H, $J = 8.57\text{Hz}$, CH), 7.55 (m, 2H, 2 x CH), 7.25 (d, $J = 7.60\text{Hz}$, 1H, CH), 5.92 (s, 1H, CH), 4.44 (m, 1H, HN-CH-CO), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.48 (m, 2H, CH_2), 3.44 (m, 2H, CH_2), 3.38 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.13 (t, $J = 5.79$, 2H, S- CH_2), 2.88 (s, 9H, 3 x CH_3). ^{13}C NMR (600MHz CDCl_3): 173.08, 170.52, 169.69, 168.96 (4x C=O), 157.73 (-C=CH), 153.16, 150.71, 136.48, 131.39, 131.25, 131.18, 130.74, 130.65, 129.31, 124.35, 120.61, 119.22, 81.12, 53.58, 52.95, 45.89, 41.53, 33.98, 28.66. IR: 3324.7 cm^{-1} , 1775 cm^{-1} . [M+H]⁺: 605.1756, 计算值: 605.1740。

[0757] 实施例 11: (2R,2'-R)-二甲基 3,3'-(1-(2-(5-(二甲基氨基)萘-1-亚磺酰氨基)乙基)-2,5-二氧化代吡咯烷-3,4-二基)双(硫烷二基)双(2-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸酯)的制备

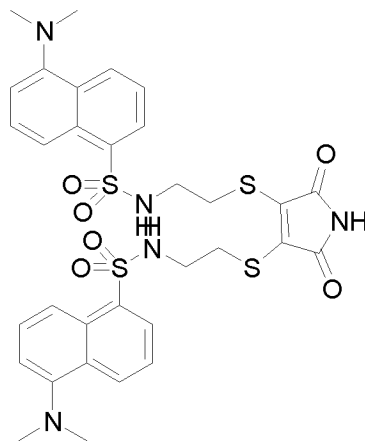
[0758]



[0759] 将丹酰 / 马来酰亚胺 / 半胱氨酸加合物 (15mg, 0.0247mmol, 1 当量) 溶解在甲醇 (100ml) 中。用 1 小时向得到的清澈溶液中加入 N-Boc-Cys-OMe (3.1 μ l, 0.0247mmol, 1 当量)。反应由 TLC (洗脱液: 40% EtOAc : 60% 石油醚) 监测。一旦添加完成, 则在真空中除去甲醇, 得到所需的产物 (12.51mg, 0.08mmol, 60%)。 ^1H NMR (600MHz CDCl_3): δ 8.44 (d, $J = 8.56\text{Hz}$, 1H, CH), 8.13 (m, 2H, 2 x CH), 7.49 (m, 2H, 2x CH), 7.17 (m, 2H, 2 x CH), 4.49 (bs, 1H, HN-CH-CO), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.48 (m, 2H, CH_2), 3.44 (m, 2H, CH_2), 3.38 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.13 (t, $J = 5.79$, 2H, S- CH_2) 2.88 (s, 9H, 3 x CH_3)。

[0760] 实施例 12: 二 - 丹酰 - 胱胺 - 马来酰亚胺的制备

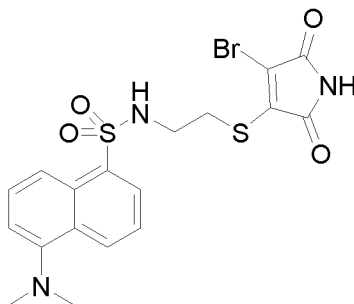
[0761]



[0762] 在圆底烧瓶中装入二 - 丹酰胱胺 (100mg, 0.16mmol)、TCEP (46mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (5ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (36mg, 0.9 当量) 加入到反应混合物中。30 分钟后, 将 NaOAc (56mg, 4 当量) 加入到反应混合物中, 并在真空中蒸发溶剂。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层组合, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。通过闪式色谱 (硅胶, 0% ~ 20% EtOAc-DCM) 得到所需的化合物, 其为黄色胶状物 (40mg, 40%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz), δ 8.5 (2H, d J 8.5Hz 芳香性的 H' s), δ 8.2 (4H, m 芳香性的 H' s), δ 7.53 (1H, s CONH), δ 7.46 (4H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.1 (2H, d, J 7.4Hz 芳香性的 H' s), δ 5.65 (2H, t, J 6.27 SO_2NH), δ 3.3 (4H, t, J 6.0 S CH_2), δ 3.17 (4H, q, J 6.0 NHCH_2), δ 2.8 (12H, s NCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150MHz), δ 165.9, 152.0, 136.5, 134.7, 130.7, 129.94, 129.85, 129.62, 129.57, 128.63, 123.3, 118.8, 115.4, 45.5, 43.6, 31.8; IR (cm^{-1}) 3288 (br) 1720 (s) MS (Na^+) m/z 相对强度: 736 (M, 100); [$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_6\text{NaS}_4$] 计算的准确质量需要 m/z 736.1368, 测定值 736.1390 (Na^+)。

[0763] 比较例 49: 溴代 - 丹酰 - 胱胺 - 马来酰亚胺的制备

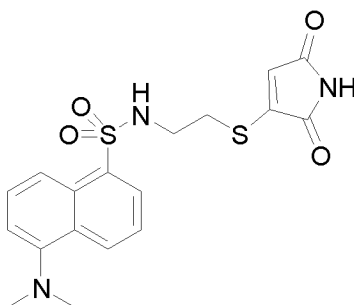
[0764]



[0765] 在圆底烧瓶中装入二-丹酰肼胺 (48mg, 0.08mmol)、TCEP (23mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (10ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (41mg, 2 当量) 加入到反应混合物中。16 小时后, 反应混合物在真空中浓缩。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层组合, 干燥 (用 MgSO_4), 通过闪式色谱 (硅胶, 0%~15% EtOAc-DCM) 得到所需的化合物 (17mg, 22%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz), δ 8.5 (1H, d, J 8.5Hz 芳香性的 H' s), δ 8.2 (2H, m 芳香性的 H' s), δ 7.6 (1H, s CONH), δ 7.53 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.15 (1H, d, J 7.4Hz 芳香性的 H' s), δ 5.30 (1H, t, J 5.6 SO_2NH), δ 3.38 (2H, t, J 6.3 SCH_2), δ 3.26 (2H, q, J 6.3 NHCH_2), δ 2.88 (6H, s NCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150MHz), δ 165.5, 162.9, 152.2, 142.5, 134.5, 130.95, 129.94, 129.92, 129.5, 128.7, 123.3, 119.0, 118.5, 115.4, 45.5, 43.7, 30.5; IR (cm^{-1}) 3295 (br) 1726 (s) MS (ES+) m/z 相对强度: 485 (M, 100); $[\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2\text{Br}]$ 计算的准确质量需要 m/z 484.0000, 测定值 783.9982。

[0766] 比较例 50: 丹酰-肼胺-马来酰亚胺的制备

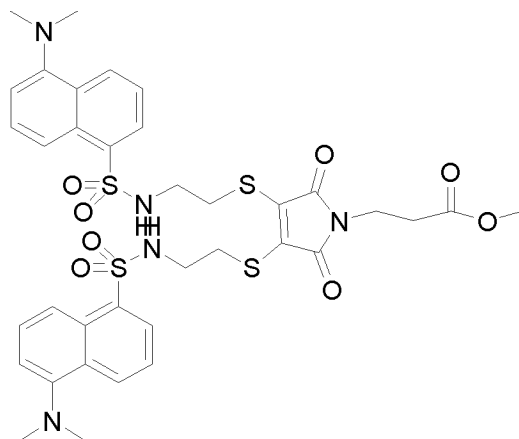
[0767]



[0768] 在圆底烧瓶中装入二-丹酰肼胺 (100mg, 0.16mmol)、TCEP (46mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (5ml) 中的溴代马来酰亚胺 (56mg, 2 当量) 加入到反应混合物中。16 小时后, 反应混合物在真空中浓缩。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层组合, 干燥 (用 MgSO_4), 通过闪式色谱 (硅胶, 0%~30% EtOAc-DCM) 得到所需的化合物 (73mg, 55%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz), δ 8.5 (1H, d, J 8.5Hz 芳香性的 H' s), δ 8.2 (2H, m 芳香性的 H' s), δ 8.1 (1H, s CONH), δ 7.5 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.15 (1H, d, J 7.5Hz 芳香性的 H' s), δ 6.0 (1H, s, CO_2CH) δ 5.89 (1H, t, J 6.4 SO_2NH), δ 3.20 (2H, q, J 6.7 NHCH_2), δ 3.99 (2H, t, J 6.9 SCH_2), δ 2.86 (6H, s NCH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150MHz), δ 169.6, 168.0, 152.0, 150.7, 134.4, 131.0, 129.9, 129.7, 129.5, 128.8, 123.4, 119.3, 118.7, 115.6, 45.5, 41.0, 31.8; IR (cm^{-1}) 3277 (br) 1720 (s) MS (ES-) m/z 相对强度: 404 (M, 100); $[\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2]$ 计算的准确质量需要 m/z 404.0739, 测定值 404.0733。

[0769] 实施例 13: N-丙酸-甲基-酯-二-丹酰-肼胺-马来酰亚胺的制备

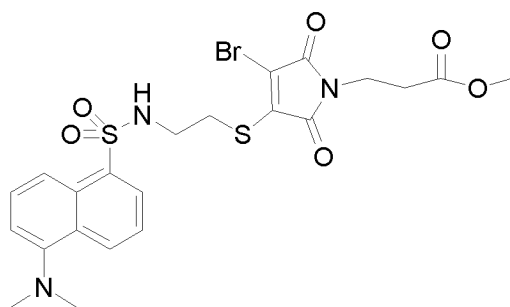
[0770]



[0771] 在圆底烧瓶中装入二-丹酰肼胺 (132mg, 0.214mmol)、TCEP (61mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (5ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (70mg, 1 当量) 加入到反应混合物中。30 分钟后, 将 NaOAc (88mg, 5 当量) 添加到反应混合物中, 并使溶剂在真空中蒸发。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层组合, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。通过闪式色谱 (硅胶, 0% ~ 20% EtOAc-DCM) 得到所需的化合物, 其为黄色胶状物 (32mg, 20%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), δ 8.5 (2H, d, J 8.5Hz 芳香性的 H' s), δ 8.2 (4H, m 芳香性的 H' s), δ 7.53 (1H, s CONH), δ 7.45 (4H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.1 (2H, d, J 7.5Hz 芳香性的 H' s), δ 5.7 (2H, t, J 6.1 SO_2NH), δ 3.75 (2H, t, J 7.0 CONCH_2), δ 3.6 (3H, s, OCH_3), δ 3.2 (4H, m, SCH_2), δ 3.18 (4H, m, NHCH_2), δ 2.9 (12H, s, NCH_3), δ 2.6 (2H, t, J 7.1 NHCH_2); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz), δ 171.3, 165.9, 135.8, 134.8, 130.5, 129.8, 129.5, 129.4, 128.4, 123.3, 119.0, 115.3, 51.9, 45.5, 43.5, 34.3, 32.6, 31.9; IR (cm^{-1}) 3295 (br) 2948 (br) 1702 (s) MS (ES-) m/z 相对强度 : 798 (M, 100); $[\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_4]$ 计算的准确质量需要 m/z 798.1760, 测定值 798.1715。

[0772] 比较例 51 : N-丙酸-甲基-酯-溴代-丹酰-肼胺-马来酰亚胺的制备

[0773]

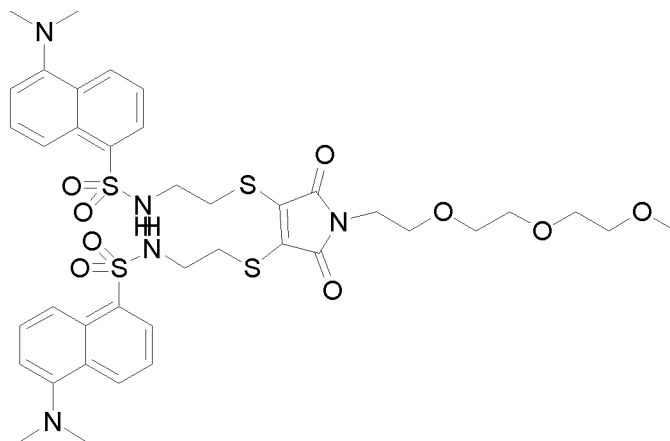


[0774] 在圆底烧瓶中装入二-丹酰肼胺 (66mg, 0.107mmol)、TCEP (31mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (5ml) 中的二溴代马来酰亚胺 (70mg, 0.5 当量) 加入到反应混合物中。16 小时后, 将 NaOAc (88mg, 5 当量) 添加到反应混合物中, 并使溶剂在真空中蒸发。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层合并, 干燥 (用 MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。通过闪式色谱 (硅胶, 0% ~ 2% MeOH- CHCl_3) 得到所需的化合物, 其为黄色胶状物 (20mg, 16%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), δ 8.5 (1H, m, 芳香性的 H), δ 8.2 (2H, m 芳香性的 H' s), δ 7.5 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.2 (1H, d, J 7.5Hz

芳香性的 H), δ 5.2 (1H, t, J 6.1 SO₂NH), δ 3.8 (2H, t, J 7.0 CONCH₂), δ 3.7 (3H, s, OCH₃), δ 3.4 (2H, m, SCH₂), δ 3.3 (2H, m, NHCH₂), δ 2.9 (6H, s, NCH₃), δ 2.6 (2H, t, J 7.1 NHCH₂); ¹³CNMR(CDCl₃, 75MHz), δ 170.95, 165.5, 163.3, 141.6, 134.5, 130.8, 129.8, 129.5, 128.5, 123.2, 118.6, 115.3, 52.0, 45.4, 43.6, 34.8, 32.5 30.6; IR(cm⁻¹) 3296(br) 2948(br) 1713(s)。

[0775] 实施例 14 :N- 二乙二醇 - 单甲基醚 - 二 - 丹酰 - 胱胺马来酰亚胺的制备

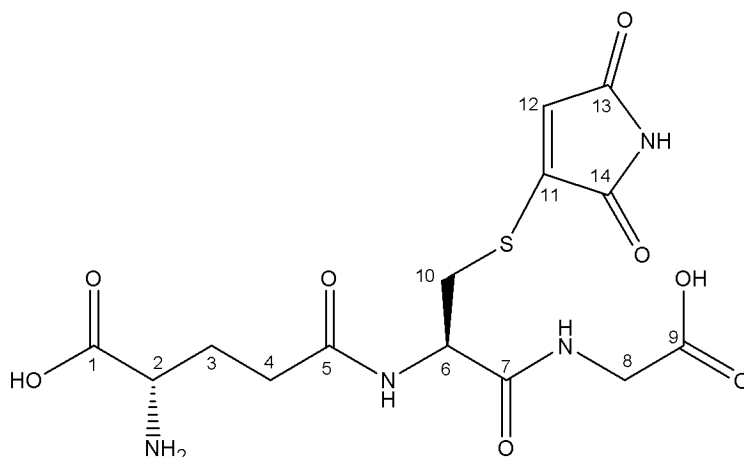
[0776]



[0777] 在圆底烧瓶中装入二 - 丹酰胱胺 (155mg, 0.25mmol)、TCEP (72mg, 1 当量) 和 MeOH (10ml)。反应混合物在氩气下于环境温度搅拌 3 小时。然后将 MeOH (5ml) 中的 PEG-二溴代马来酰亚胺 (100mg, 1 当量) 添加到反应混合物中。16 小时后, 将 NaOAc (102mg, 5 当量) 添加到反应混合物中, 并使溶剂在真空中蒸发。使残留物与 DCM 和盐水一起作用。使有机层组合, 干燥 (用 MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。通过闪式色谱 (硅胶, 0% ~ 10% THF-DCM) 得到所需的化合物, 其为黄色胶状物 (13mg, 6%)。¹HNMR (MeOH, 300MHz), δ 8.5 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 8.3 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 8.13 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.5 (4H, m, 芳香性的 H' s), δ 7.2 (2H, m, 芳香性的 H' s), δ 3.5 (12H, m, CONCH₂, OCH₂), δ 3.3 (3H, s, OCH₃), δ 3.1 (8H, m, SCH₂, NHCH₂), δ 2.8 (12H, s, NCH₃); ¹³CNMR (CDCl₃, 150MHz), δ 167.4, 153.2, 136.9, 136.2, 131.3, 131.2, 130.9, 130.2, 129.6, 124.3, 120.5, 116.4, 72.9, 71.4, 71.3, 71.1, 68.7, 59.1, 45.8, 44.5, 38.98, 36.97; IR (cm⁻¹) 3323 (br) 2946 (br) 2946 (s) 1017 (s) MS (Na⁺) m/z 相对强度 : 882 (M, 100); [C₃₉H₄₉N₅O₉NaS₄] 计算的准确质量需要 m/z 882.2311, 测定值 882.2294 (Na⁺)。

[0778] 比较例 52 :Glu-Cys (Mal)-Gly 的制备

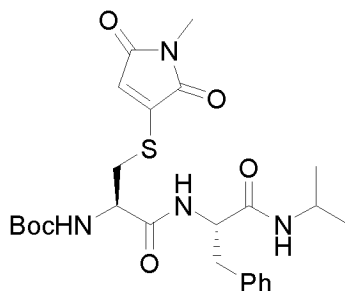
[0779]



[0780] 向甲醇 (3mL) 中的谷胱甘肽 (47mg, 0.15mmol) 中添加甲醇 (3mL) 中的溴代马来酰亚胺 (30mg, 0.15mmol)。5 分钟后在真空中除去溶剂, 以得到所需的化合物, 其为稠厚的无色油状物 (62mg, 0.15mmol), 产率为 100%。 δ_{H} (500MHz, MeOD) 6.47 (s, 1H, H-12), 4.79 (dd, 1H, $J = 5.7$ 和 8.2 , H-6), 4.06 (t, 1H, $J = 6.5$, H-2), 3.95 (s, 2H, H₂-8), 3.49 (dd, 1H, $J = 5.8$ 和 13.9 , HH-10), 3.29 (dd, 1H, $J = 8.3$ 和 13.6 , HH-10), 2.61 (t, 2H, $J = 7.1$, H₂-4), 2.29-2.15 (m, 2H, H₂-3); δ_{C} (125MHz, MeOD) 174.68 (C=O), 172.81 (C=O), 172.39 (C=O), 171.89 (C=O), 171.62 (C=O), 170.59 (C=O), 151.75 (C11), 120.91 (C12), 53.79 (C6), 52.76 (C2), 42.01 (C8), 33.92 (C10) 32.42 (C4), 27.03 (C3); IR (油, cm^{-1}) 3259 (m), 2928 (m), 1717 (s); MS (ES⁻) m/z (相对强度): 401 ([M-H], 100), 272 (30); $[\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}]$ -H 计算的准确质量需要 m/z 401.0767, 测定值 401.0773 (ES⁻); UV (乙腈) $\epsilon_{204} = 8100$, $\epsilon_{253} = 5600$ 和 $\epsilon_{342} = 1900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$ 。

[0781] 比较例 53 : Boc-Cys (MeMal)-Phe-ⁱPr 的制备

[0782]

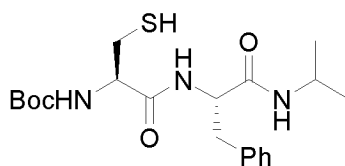


[0783] 将 O-(苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐 (344mg, 0.82mmol) 添加到 (2R)-2-[(叔丁氧基羰基)氨基]-3-[(1-甲基-2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)硫烷基]丙酸 (313mg, 0.95mmol) 和 1-羟基苯并三唑水合物 (139mg) 在 DMF (2mL) 中的搅拌溶液中, 反应在 21℃ 搅拌 3 分钟。将 (2S)-1-氧代-3-苯基-1-(丙烷-2-基氨基)丙烷-2-胺三氟乙酸盐 (262mg, 0.82mmol) 在 DMF (1.5mL) 中的溶液添加至反应混合物中, 随后加入 N,N'-二异丙基乙基胺 (294 μL , 1.64mmol), 反应在 21℃ 搅拌 4 小时。溶剂在真空中除去, 使残留物溶解在 EtOAc (60mL) 中, 并用 1M HCl (x3)、H₂O (x1)、饱和 NaHCO₃ (x3)、10% LiCl (x1) 和饱和 NaCl (x1) 洗涤, 干燥 (MgSO₄)、过滤并在真空中除去溶剂。通过沉淀 (CHCl₃/石油醚 40-60) 进行的纯化得到了所需的化合物, 其为浅褐色固体 (359mg, 0.69mmol, 84% 产率); ^1H NMR (600MHz, CD₃CN, 25℃) δ 7.32-7.28 (m, 2H),

7.25-7.21(m, 3H), 7.11(d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H), 6.46(d, $J = 6.3\text{Hz}$, 1H), 6.42(s, 1H), 4.46(td, $J = 7.6, 6.5\text{Hz}$, 1H), 4.31(td, $J = 7.3, 6.4\text{Hz}$), 3.88(双峰的七重线, $J = 6.6, 6.3\text{Hz}$, 1H), 3.30(dd, $J = 13.7, 5.8\text{Hz}$, 1H), 3.16(dd, $J = 13.7, 7.4\text{Hz}$, 1H), 2.95(dd, $J = 13.8, 7.5\text{Hz}$, 1H), 2.93(s, 3H), 1.43(s, 9H), 1.07(d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H), 1.02(d, $J = 6.6\text{Hz}$, 3H); ^{13}C NMR(151MHz, CD_3CN , 25°C) δ 169.39, 168.84, 168.77, 167.85, 155.17, 149.33, 136.77, 129.10, 127.98, 126.30, 118.57, 79.49, 54.10, 52.62, 40.91, 37.44, 32.43, 27.15, 22.95, 21.24, 21.17; IR(薄膜) 3301, 2973, 1770, 1701, 1674, 1641, 1525cm^{-1} ; LRMS(EI) 518(24%, $[\text{M}]^{+}$), 432(23), 219(33), 149(21) 110(27), 86(37), 84(100); HRMS(EI) $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}[\text{M}]^{+}$ 的计算值 518.2194, 测定值 518.2199。

[0784] 比较例 54 :Boc-Cys(MeMal)-Phe-ⁱPr 的脱保护

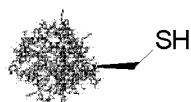
[0785]



[0786] 将 150mM 磷酸盐缓冲液 (pH 8, 25mL) 中的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐 (138mg, 0.48mmol) 添加至 Boc-Cys(MeMal)-Phe-ⁱPr (50mg, 97 μmol) 在 MeCN(25mL) 中的搅拌溶液中, 反应在 21°C 搅拌 10 分钟。Boc-Cys-Phe-ⁱPr 的合成由 LCMS(ES⁻) 408.7(100%) 证实。

[0787] 比较例 55 :Grb2-SH2L111C 突变体的克隆和表达

[0788]



[0789] Grb2-SH2L111C 的序列 (残基 53-163) :M G I E M K P H P W F F G K I P R A K A E E M L S K Q R H D G A F L I R E S E S A P G D F S L S V K F G N D V Q H F K V C R D G A G K Y F L W V V K F N S L N E L V D Y H R S T S V S R N Q Q I F L R D I E Q V P Q Q P T Y V Q A G S R S H H H H H H 结束。

[0790] 计算的质量 = 14171

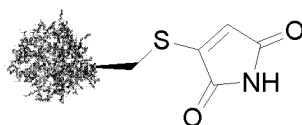
[0791] 用于 Grb2 SH2 结构域的 DNA 构建体包含一级氨基酸序列 53 ~ 163, 并克隆在质粒 QE-60(Qiagen) 上。通过使用编码突变残基的寡核苷酸的定点突变 (Stratagene Kit) 来构建 Grb2 SH2 L111C 突变体。在使用 T5 启动子的大肠杆菌 (M15[pREP4], Qiagen) 中表达两个构建体, 引入 C 端 6-His 标签用于纯化。培养物 (1L) 于 37°C 在 T.B. 中由单一菌落生长, 并在 O.D._{600} 达到 0.9 时以 1.0mM IPTG 诱导表达。使培养物表达蛋白大约 3 小时, 之后使细胞沉淀。沉淀在包含蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 的 0.1M 磷酸钠、300mM NaCl、50mM 咪唑 (pH 7.2) 中裂解。裂解产物进行离心分离, 然后使上清液施用至 Ni-NTA 柱 (Qiagen)。Grb2-SH2 L111C 以 0.1M 磷酸钠、300mM NaCl、200mM 咪唑 (pH 7.2) 由 Ni-NTA 柱洗脱。通过 Coomassie 染色的 SDS-PAGE 显示, 收集到的 Grb2 SH2 L111C 的纯度为约 95%。先前已经观察到了 Grb2 SH2 结构域通过结构域摆动进行的二聚作用。二聚的和单体的 Grb2-SH2 在 Sephacryl S-100 柱 (320mL) 上分离, 所述柱已经由 0.1M 磷酸钠 150mM NaCl (pH 8.0) 预先平衡。洗脱的两个峰对应于 Grb2-SH2 的单体的分子量 (约 14kDa) 和二聚物的分子量

(约 28kDa)。几乎 60% 的 Grb2-SH2 L111C 结构域作为单体由柱洗脱。发现分离出的单体和二聚物具有令人惊讶的动力学稳定性,因为在 4℃ 时在几个月的时间内观察到极少的相互转换。单体使用 Amicon® Ultra-4 离心过滤单元 (Millipore) 浓缩,蛋白质的最终浓度通过使用 McNemar 及其同事获得的消光系数 ($15,600\text{M}^{-1}$) 由 280nm 的吸光度确定。将蛋白质以 2mg/mL 的浓度冷冻在 100mL 的等分试样中,该试样可根据实验需要解冻。使用 ESI-MS 获得单体蛋白质的质量 (质量 14170)。

[0792] 向 0℃ 的模型蛋白的溶液 (100 μL , [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 0℃ 的 Ellman 试剂 (5 μL , 在 H_2O 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃ 维持 10 分钟,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示发生了单一反应,得到了质量 14370 的单一产物,表明 C111 可用于官能化。

[0793] 比较例 56 :Grb2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0794]

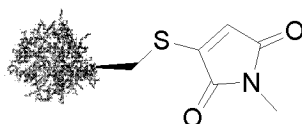


[0795] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μL , [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μL , DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出定量转换时形成了所需的产物 (质量 14266)。

[0796] 0℃ 时用 Ellman 试剂 (5 μL , 在 H_2O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃ 维持 10 分钟,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示与 Ellman 试剂没有明显反应,确切表明在 C111 发生了溴代马来酰亚胺的官能化。

[0797] 比较例 57 :Grb2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0798]



[0799] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μL , [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μL , DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出定量转换时形成了所需的产物 (质量 14280)。

[0800] 0℃ 时用 Ellman 试剂 (5 μL , 在 H_2O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃ 维持 10 分钟,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示与 Ellman 试剂没有明显反应,确切表明在 C111 发生了 N- 甲基溴代马来酰亚胺的官能化。

[0801] 比较例 58 :磷介导的 Grb2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的还原性断裂

[0802]

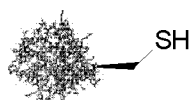


[0803] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应于蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0804] 0℃时用 TCEP·HCl(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理该混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 得到所需的产物(质量 14619), 转化率 80%。

[0805] 比较例 59: β-巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的还原性断裂

[0806]



[0807] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0808] 混合物用 β-巯基乙醇(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 4 小时。分析显示, 蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 在定量转换时生成了所需的产物(质量 = 14173)。

[0809] 比较例 60: 谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0810]



[0811] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0812] 混合物用谷胱甘肽(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 4 小时。分析显示, 蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 在定量转换时生成了所需的产物(质量 = 14173)。

[0813] 比较例 61: 膦介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物的还原性断裂

[0814]



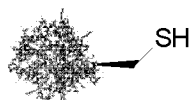
[0815] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1

秒钟,然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类,其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0816] 0℃时用 TCEP·HCl (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 3 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物完全断裂,得到了所需产物 (质量 = 14168),转化率为 85%。

[0817] 比较例 62 : β - 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物的还原性断裂

[0818]

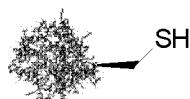


[0819] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14280 的单一蛋白种类,其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0820] 混合物用 β - 巯基乙醇 (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理,涡旋 1 秒钟,在 37℃维持 4 小时。分析显示,蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物完全地断裂,在定量转换时生成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0821] 比较例 63 : 谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0822]



[0823] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14280 的单一蛋白种类,其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0824] 混合物用谷胱甘肽 (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理,涡旋 1 秒钟,在 37℃维持 4 小时。分析显示,蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物完全断裂,在定量转换时生成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0825] 比较例 64 : 乙二硫醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺加合物的断裂

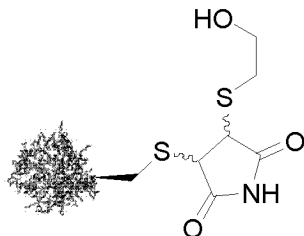
[0826]



[0827] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类,其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0828] 混合物用乙二硫醇 ($5\ \mu\text{L}$, H_2O 中的 282mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 37°C 维持 4 小时。分析显示, 蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 在定量转换时生成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0829] 比较例 65 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物的制备
[0830]

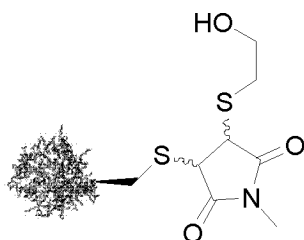


[0831] 0°C 时向模型蛋白的溶液 ($100\ \mu\text{L}$, [蛋白质] 2.0mg/mL , 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl , $\text{pH } 8.0$) 中加入溴代马来酰亚胺 ($5\ \mu\text{L}$, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0832] 混合物用 2- 巯基乙醇 ($5\ \mu\text{L}$, H_2O 中的 2.82mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 0°C 维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 / 溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物 (质量 = 14345), 产率为 54%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0833] 比较例 66 :GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物的制备

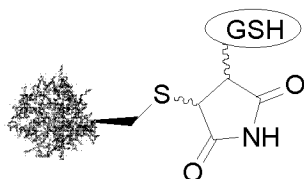
[0834]



[0835] 0°C 时向模型蛋白的溶液 ($100\ \mu\text{L}$, [蛋白质] 2.0mg/mL , 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl , $\text{pH } 8.0$) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 ($5\ \mu\text{L}$, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0836] 混合物用 2- 巯基乙醇 ($5\ \mu\text{L}$, H_2O 中的 2.82mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 0°C 维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 / 溴代马来酰亚胺 /2- 巯基乙醇加合物 (质量 = 14359), 产率为 90%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0837] 实施例 15 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的制备
[0838]



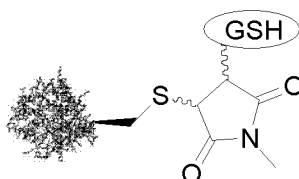
[0839] 0°C 时向模型蛋白的溶液 ($100\ \mu\text{L}$, [蛋白质] 2.0mg/mL , 100mM 磷酸钠, 150mM

NaCl, pH 8.0) 中加入溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14265 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物。

[0840] 0℃ 时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 / 溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物 (质量 = 14574), 转化率为 44%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0841] 实施例 16 :GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 甲基溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的制备

[0842]

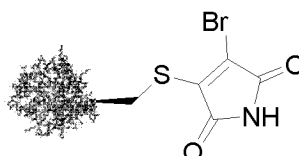


[0843] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 甲基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14278 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺加合物。

[0844] 0℃ 时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 3 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了蛋白质 /N- 甲基溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物 (质量 = 14588), 转化率为 95%。剩余的物质是 GrB2-SH2 结构域 L111C。

[0845] 比较例 67 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺加合物的制备

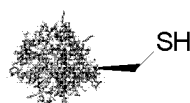
[0846]



[0847] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示在定量生产时形成所需的产物 (质量 14345)。

[0848] 比较例 68 :2- 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺加合物的还原性断裂

[0849]



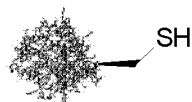
[0850] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对

应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0851] 0℃时混合物用 2- 巯基乙醇 (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理。混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 在定量生产时生成了所需的产物 (质量 = 14171)。

[0852] 比较例 69 : 谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺加合物的还原断裂

[0853]

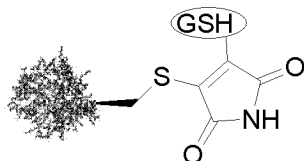


[0854] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0855] 混合物用谷胱甘肽 (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理, 涡旋 1 秒钟, 在 0℃维持 4 小时, 之后混合物用 LC-MS 分析。分析显示, 蛋白质 / 溴代马来酰亚胺加合物完全断裂, 在定量生产时生成了所需的产物 (质量 = 14170)。

[0856] 实施例 17 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的制备

[0857]

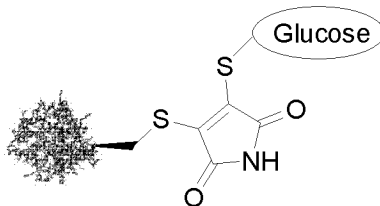


[0858] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0859] 0℃时混合物用谷胱甘肽 (5 μL, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 并在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换中形成了所需的产物 (质量 = 14573)。

[0860] 实施例 18 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / β-1- 硫葡萄糖加合物的制备

[0861]



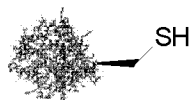
[0862] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应

应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0863] 0℃时用 β -1- 硫葡萄糖的钠盐 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在近似定量的生产中形成了所需的产物 (质量 = 14461)。

[0864] 实施例 19 : 谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的断裂

[0865]



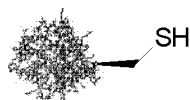
[0866] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0867] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14573)。

[0868] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量生产中形成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0869] 实施例 20 : 生理相关的谷胱甘肽浓度 (5mM) 下的谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的断裂

[0870]



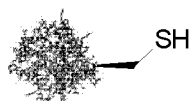
[0871] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类, 其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0872] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14573)。

[0873] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H₂O 中的 100mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量生产中形成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0874] 实施例 21 : 生理相关的谷胱甘肽浓度 (1mM) 下的谷胱甘肽介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / 谷胱甘肽加合物的断裂

[0875]



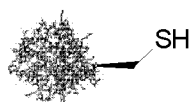
[0876] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0)中加入二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类,其对应蛋白质/二溴代马来酰亚胺加合物。

[0877] 0℃时用谷胱甘肽(5 μL, H₂O 中的 2.82mM 溶液)处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 2 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质/二溴代马来酰亚胺/谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类(质量=14573)。

[0878] 蛋白质/二溴代马来酰亚胺/谷胱甘肽加合物的溶液进行缓冲液交换(Micro Bio-Spin 6 色谱柱, Bio-Rad),得到加合物(95 μL, [加合物]0.2mg/mL, 20mM HEPES, 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, pH 7.4)。向其中加入谷胱甘肽(5 μL, 在 20mM HEPES, 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA 中的 20mM 溶液, pH 7.4)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 37℃维持 4 小时。分析显示在定量转换时形成了 Grb2-SH2(L111C), 质量为 14170。

[0879] 实施例 22:β-巯基乙醇介导的 Grb2-SH2 结构域 L111C/二溴代马来酰亚胺/谷胱甘肽加合物的断裂

[0880]



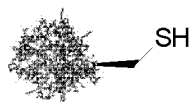
[0881] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0)中加入二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类,其对应蛋白质/二溴代马来酰亚胺加合物。

[0882] 0℃时用谷胱甘肽(5 μL, H₂O 中的 2.82mM 溶液)处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 2 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质/二溴代马来酰亚胺/谷胱甘肽加合物是唯一存在的蛋白质种类(质量=14573)。

[0883] 0℃时用 β-巯基乙醇(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液)处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物(质量=14172)。

[0884] 实施例 23:谷胱甘肽介导的 Grb2-SH2 结构域 L111C/二溴代马来酰亚胺/β-1-硫葡萄糖加合物的断裂

[0885]



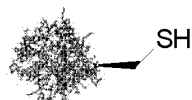
[0886] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0)中加入二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类,其对应蛋白质/二溴代马来酰亚胺加合物。

[0887] 0℃时用 β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H_2O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 2 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14461)。

[0888] 0℃时用谷胱甘肽 (5 μ L, H_2O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14173)。

[0889] 实施例 24 : β - 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物的断裂

[0890]



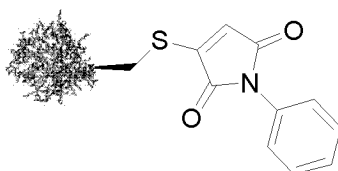
[0891] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时。使用 LC-MS 的分析显示出质量 14346 的单一蛋白种类,其对应蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺加合物。

[0892] 0℃时用 β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H_2O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 2 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 / 二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14461)。

[0893] 0℃时用 β - 巯基乙醇 (5 μ L, H_2O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 4 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14172)。

[0894] 比较例 70 :GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 苯基溴代马来酰亚胺加合物的制备

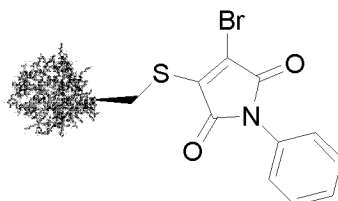
[0895]



[0896] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 苯基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了所需的产物 (质量 = 14351)。

[0897] 比较例 71 :GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 苯基二溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0898]



[0899] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 20mM MES, 150mM NaCl, pH 6) 中加入 N- 苯基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟,

然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了所需的产物（质量 = 14431）。

[0900] 比较例 72 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 苯基二溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0901]

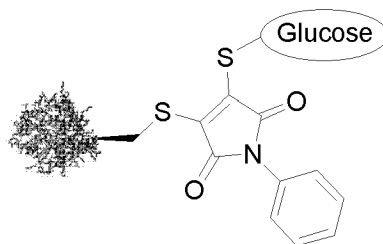


[0902] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 20mM MES, 150mM NaCl, pH 6) 中加入 N- 苯基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出定量生成蛋白质 /N- 苯基溴代马来酰亚胺加合物 (质量 = 14431)。

[0903] 0℃时用 β -巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14179)。

[0904] 实施例 25 : GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 苯基二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物的制备

[0905]

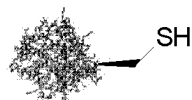


[0906] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 20mM MES, 150mM NaCl, pH 6) 中加入 N- 苯基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质 /N- 苯基二溴代马来酰亚胺加合物 (质量 = 14431)。

[0907] 0℃时用 β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 /N- 苯基二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14547)。

[0908] 实施例 26 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 苯基二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物的断裂

[0909]



[0910] 0℃时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 20mM MES, 150mM NaCl, pH 6) 中加入 N- 苯基溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成蛋白质 /N- 苯基二溴代马来酰亚胺加合物 (质量 = 14431)。

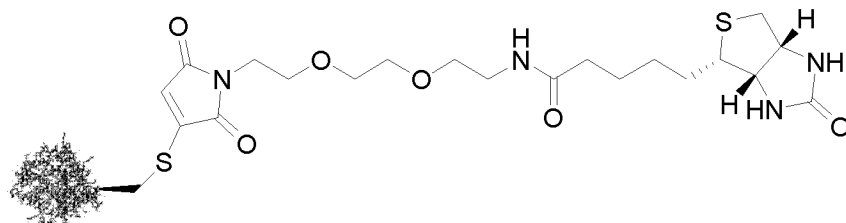
[0911] 0℃时用 β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡

旋 1 秒钟,然后在 0°C 维持 2 小时,之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 /N- 苯基二溴代马来酰亚胺 / β -1- 硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14547)。

[0912] 0℃时用 β-巯基乙醇 (5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14178)。

[0913] 实施例 27 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺加合物的制备

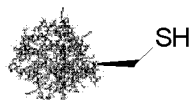
[0914]



[0915] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入生物素-PEG-溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋1秒钟, 然后在0℃维持1小时。使用LC-MS的分析显示出在定量转换时形成了所需的产物(质量=14634)。

[0916] 实施例 28 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 生物素-PEG- 溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0917]

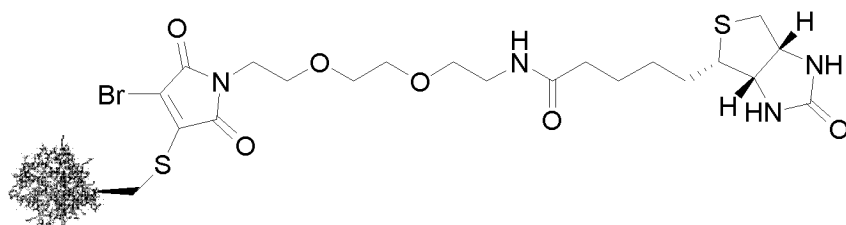


[0918] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2. 0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8. 0) 中加入生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2. 82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量转换时形成了蛋白质 / 生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺加合物 (质量 = 14634)。

[0919] 37℃时用 β -巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 37℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14180)。

[0920] 实施例 29 :GrB2-SH2 结构域 L111C/ 生物素 -PEG- 二溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0921]

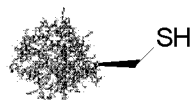


[0922] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入生物素-PEG-二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 2 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量转换时形成了

所需的产物 (质量 = 14701), 产率大于 80%。

[0923] 实施例 30 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 生物素 -PEG- 二溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0924]

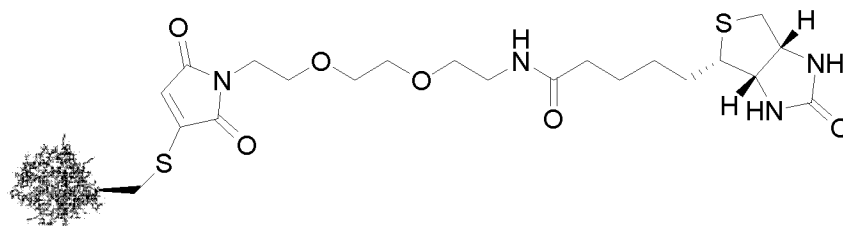


[0925] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入生物素 -PEG- 二溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量转换时形成了蛋白质 / 生物素 -PEG- 二溴代马来酰亚胺加合物 (质量 = 14701), 转化率大于 80%。

[0926] 0℃ 时用 β -巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理混合物。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示形成了所需的混合物 (质量 = 14171), 产率大于 80%。

[0927] 实施例 31 : 在中性抗生物素蛋白涂覆的琼脂糖珠上的 GrB2-SH2 结构域 L111C/ 生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺加合物的下拉捕获 (pull down) 和释放

[0928]



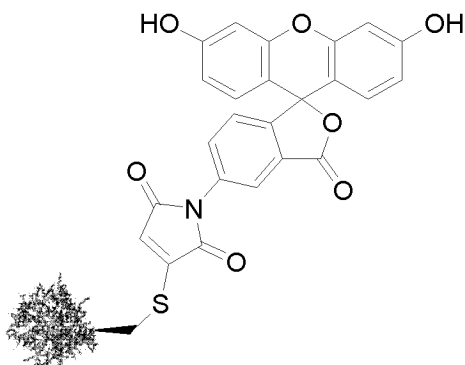
[0929] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺 (5 μ L, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃ 保持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示在定量生产时形成了所需的产物 (质量 14634)。

[0930] 蛋白 / 生物素 -PEG- 溴代马来酰亚胺加合物 (200 μ L) 和未经修饰的模型蛋白 (200 μ L) 独立地以 PBS 缓冲液 (3 x 500 μ L) 在浓缩器 (Vivaspin, 截流值 10k) 中洗涤, 得到蛋白质溶液 (300 μ L) (In)。对于获得的各蛋白质溶液, 中性抗生物素蛋白涂覆的琼脂糖珠 (750 μ L, 50% 的水性浆料) 用 PBS (2 x 500 μ L) 洗涤。蛋白质溶液 (300 μ L) 随后添加至珠子中, 并使混合物在 4℃ 温育 30 分钟。混合物进行离心, 并流穿 (FT) 收集。珠子用 PBS (2 x 500 μ L) 洗涤, 收集两个洗出组分 (W1 和 W2)。通过在包含 β -巯基乙醇 (25mM) 的 PBS (300 μ L) 中于 37℃ 温育 2 小时使蛋白质由珠子释放。离心样品, 并收集包含断裂的 GrB2-SH2 结构域 L111C 的洗脱液 (E1)。结果显示在图 1 中。

[0931] 通过光密度分析法与蛋白系列稀释的比较确定出蛋白质的回收量为 44%。不过, 校正不可逆的物理吸附的蛋白质 (使用未修饰的蛋白质对照确定) 后, 校正的回收量为 71%。

[0932] 实施例 32 : GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 荧光素溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0933]



[0934] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 荧光素二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃保持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示形成了所需的化合物(质量 14597), 转化率为 61%。

[0935] 实施例 33: β- 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 荧光素溴代马来酰亚胺加合物的断裂

[0936]

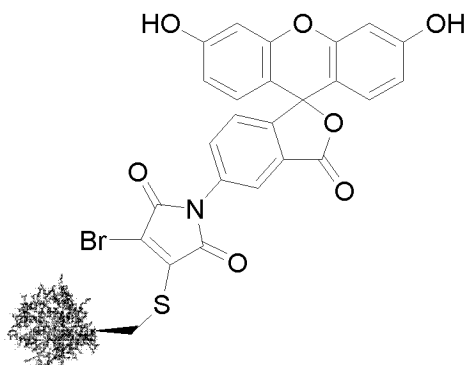


[0937] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 荧光素二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃保持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示形成了蛋白质 / 荧光素溴代马来酰亚胺加合物(质量 14597), 转化率为 90%。

[0938] 37℃时混合物用 β- 巯基乙醇(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示生成了所需的产物(质量 = 14171), 转化率为 87%。

[0939] 实施例 34: GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 荧光素二溴代马来酰亚胺加合物的制备

[0940]

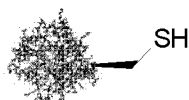


[0941] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 荧光素二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出形成了所需的产物(质量 14675), 转化率 61%。

[0942] 实施例 35: β- 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/N- 荧光素二溴代马来酰

亚胺加合物的断裂

[0943]

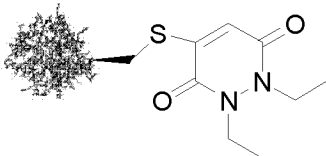


[0944] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 N- 荧光素二溴代马来酰亚胺(5 μL, DMF 中的 2.82mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 0℃保持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示形成了蛋白质 / 荧光素二溴代马来酰亚胺加合物(质量 14597), 转化率为 61%。

[0945] 37℃时混合物用 β- 巯基乙醇(5 μL, H₂O 中的 282mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 4 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示生成了所需的产物(质量 = 14171), 转化率为 85%。

[0946] 比较例 73 :GrB2-SH2 结构域 L111C/BrDDPD 加合物的制备

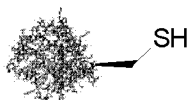
[0947]



[0948] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 BrDDPD(5 μL, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了所需的产物(质量 14348)。

[0949] 比较例 74 : β- 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/BrDDPD 加合物的断裂

[0950]

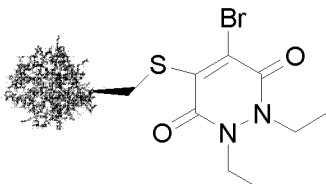


[0951] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 BrDDPD(5 μL, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质 / BrDDPD 加合物(质量 14348)。

[0952] 混合物在 4℃透析 40 小时(100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0), 并在 37℃用 β- 巯基乙醇(5 μL, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 37℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物(质量 = 14180)。

[0953] 比较例 75 :GrB2-SH2 结构域 L111C/DiBrDDPD 加合物的制备

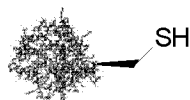
[0954]



[0955] 0℃时向模型蛋白的溶液(100 μL, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM

NaCl, pH 8.0) 中加入 DiBrDDPD (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了所需的产物 (质量 14427)。

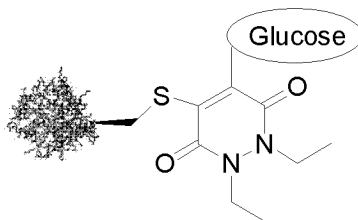
[0956] 比较例 76 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/DiBrDDPD 加合物的断裂
[0957]



[0958] 0°C 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 DiBrDDPD (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质/DiBrDDPD 加合物 (质量 14427)。

[0959] 混合物在 4°C 透析 40 小时 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0), 然后在 37°C 用 β -巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 37°C 维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14180)。

[0960] 实施例 36 : GrB2-SH2 结构域 L111C/DiBrDDPD/ β -1-硫葡萄糖加合物的制备
[0961]



[0962] 0°C 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 DiBrDDPD (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质/DiBrDDPD 加合物 (质量 14427)。

[0963] 混合物在 4°C 透析 40 小时 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0), 然后在 0°C 用 β -1-硫葡萄糖 (5 μ L, H₂O 中的 28.2mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在室温维持 1 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质/DiBrDDPD/ β -1-硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14543)。

[0964] 实施例 37 : β -巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/DiBrDDPD/ β -1-硫葡萄糖加合物的断裂

[0965]



[0966] 0°C 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质] 2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 DiBrDDPD (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37°C 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质/DiBrDDPD 加合物 (质量 14427)。

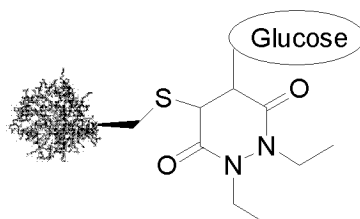
[0967] 混合物在 4°C 透析 40 小时 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0), 然后在 0°C 用

β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H₂O 中的 28.2mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在室温维持 1 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示蛋白质 /DiBrDDPD/ β -1- 硫葡萄糖加合物是唯一存在的蛋白质种类 (质量 = 14543)。

[0968] 在室温混合物用 β - 巯基乙醇 (5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 并在室温维持 30 分钟, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示出在定量转换时形成了所需的产物 (质量 = 14180)。

[0969] 实施例 38 :GrB2-SH2 结构域 L111C/BrDDPD/ β -1- 硫葡萄糖加合物的制备

[0970]

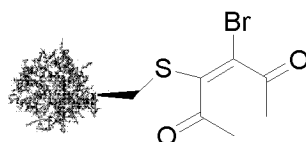


[0971] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 BrDDPD (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时形成了蛋白质 /BrDDPD 加合物 (质量 14348)。

[0972] 混合物在 4℃ 透析 40 小时 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0), 然后在 0℃ 用 β -1- 硫葡萄糖 (5 μ L, H₂O 中的 28.2mM 溶液) 处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 然后在 37℃ 维持 1 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了蛋白质 /BrDDPD/ β -1- 硫葡萄糖加合物 (质量 = 14543), 转化率为 17%。

[0973] 比较例 77 :GrB2-SH2 结构域 L111C/Z-2,3- 二溴代 - 丁 -2- 烯二酸二甲基酯加合物的制备

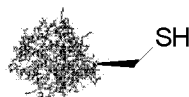
[0974]



[0975] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 Z-2,3- 二溴代 - 丁 -2- 烯二酸二甲基酯 (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出形成了所需的产物 (质量 14440)。

[0976] 比较例 78 : β - 巯基乙醇介导的 GrB2-SH2 结构域 L111C/Z-2,3- 二溴代 - 丁 -2- 烯二酸二甲基酯加合物的断裂

[0977]



[0978] 0℃ 时向模型蛋白的溶液 (100 μ L, [蛋白质]2.0mg/mL, 100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 8.0) 中加入 Z-2,3- 二溴代 - 丁 -2- 烯二酸二甲基酯 (5 μ L, DMF 中的 282mM 溶液)。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃ 维持 1 小时。使用 LC-MS 的分析显示出在定量生产时

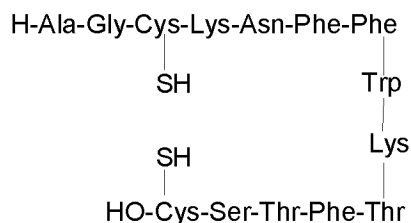
形成了所需的产物（质量 14370）。

[0979] 37℃时混合物用 β -巯基乙醇（5 μ L, H₂O 中的 2.82mM 溶液）处理。使混合物涡旋 1 秒钟, 在 37℃维持 2 小时, 之后用 LC-MS 分析混合物。分析显示在定量转换时形成了所需的产物（质量 14180）。

[0980] 实施例 39 : 促生长素抑制素的修饰和再生

[0981] 还原的促生长素抑制素的制备

[0982]



[0983] 使冻干的促生长素抑制素（质量 = 1638）溶解在缓冲液（50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF）中, 至浓度为 152.6 μ M (0.25mg/ml), 然后在环境温度下用 1.1 当量的 TCEP 还原 1 小时。通过添加 4 当量的二溴代马来酰亚胺至样品的等分试样中并利用 LC-MS 分析来确认还原的完成。

[0984] 促生长素抑制素与卤代马来酰亚胺及其衍生物的桥连

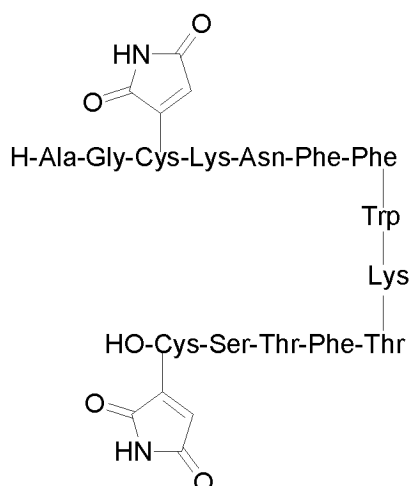
[0985] 如所述生成还原的促生长素抑制素。在环境温度下加入 1.1 当量的卤代马来酰亚胺或二溴代马来酰亚胺衍生物（100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5-15.0% DMF 中）, 用 1 小时由 LC-MS 监测产物的生成。结果显示在图 2 中。

[0986] 促生长素抑制素与二硫代马来酰亚胺的桥连

[0987] 如所述生成还原的促生长素抑制素。在环境温度下加入各种量的二硫代马来酰亚胺（100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5-7.5% DMF 中）, 用 1 小时由 LC-MS 监测产物的生成。结果显示在图 3 中。

[0988] 以溴代马来酰亚胺对促生长素抑制素的修饰

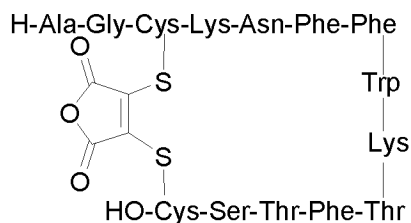
[0989]



[0990] 如所述生成还原的促生长素抑制素。在环境温度下加入 2.1 当量的溴代马来酰亚胺（100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 7.5% DMF 中）, 在 1 小时内利用 LC-MS 观察到完全转化为二加合产物。

[0991] 二溴代马来酸酐对促生长素抑制素的修饰

[0992]



[0993] 如所述生成还原的促生长素抑制素。加入 5 当量的二溴代马来酸酐 (DMF 中), 产物的生成由 LC-MS 检测。在 90 分钟内生成了 17.3% 的桥接的促生长素抑制素。

[0994] 利用各种还原剂对桥接的促生长素抑制素的断裂

[0995] 如所述制备马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素。加入 100 当量的各种还原剂 (1000 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中), 在 4℃ 时用 2 天的时间通过 LC-MS 监测去修饰的肽和副产物 (还原剂与游离的肽 - 半胱氨酸的混合的二硫化物) 的生成。促生长素抑制素与 GSH 的混合的二硫化物仅能通过 MALDI-TOF MS 监测。结果显示在图 4 中。

[0996] 利用各种量的 DTT 或 2- 巯基乙醇对桥接的促生长素抑制素的断裂

[0997] 如所述制备马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素。加入各种量的 DTT 或 2- 巯基乙醇 (1000 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中), 在 4℃ 时用 6 小时通过 LC-MS 监测去修饰的肽和副产物 (还原剂与游离的肽 - 半胱氨酸的混合的二硫化物) 的生成。结果显示在图 5 中。

[0998] 桥接的促生长素抑制素的催化断裂

[0999] 如所述制备马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素。加入 20 当量的 2-巯基乙醇 (1000 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中), 随后加入缓冲液或 5 当量的碘化钠或苯硒酚 (100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 7.5% DMF 中), 在环境温度下用 20 分钟通过 LC-MS 监测去修饰的肽和副产物 (2-巯基乙醇或苯硒酚与游离的肽-半胱氨酸的混合的二硫化物) 的生成。结果显示在图 6 中。

[1000] N-官能化的马来酰亚胺桥接的促生长素抑制素的断裂

[1001] 如所述,还原促生长素抑制素并使其与N-官能化的马来酰亚胺衍生物桥接。加入100当量的2-巯基乙醇(1000倍储备液,在50mM磷酸钠,pH 6.2,40% MeCN,2.5% DMF中),在4°C时用2天的时间通过LC-MS监测去修饰的肽和副产物(2-巯基乙醇与游离的肽-半胱氨酸的混合的二硫化物)的生成。结果显示在图7中。

[1002] 单溴代马来酰亚胺与促生长素抑制素的二加合产物的断裂

[1003] 还原的促生长素抑制素与 2.1 当量的单溴代马来酰亚胺反应以生成二加合产物。接着加入 100 当量的 2-巯基乙醇 (1000 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中), 在环境温度下用 2.5 小时由 LC-MS 监测单加合产物、去修饰的肽和副产物 (2-巯基乙醇与游离的肽-半胱氨酸的混合的二硫化物) 的生成。结果显示在图 8 中。

[1004] 促生长素抑制素的相当的原位桥接

[1005] 在促生长素抑制素中加入各种量的二硫代马来酰亚胺(100倍储备液,在50mM磷酸钠,pH 6.2,40% MeCN,2.5%~7.5% DMF中),使反应在环境温度下温育10分钟。接着

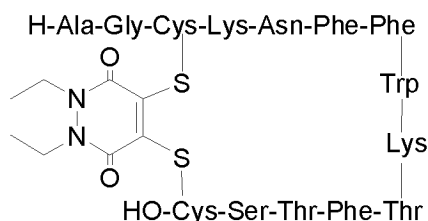
加入各种量的 TCEP 或苯硒酚 (100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5-7.5% DMF 中新鲜制备), 在环境温度下用 1 小时由 LC-MS 监测桥接的促生长素抑制素的生成。结果显示在图 9 中。

[1006] 促生长素抑制素的原位聚乙二醇化

[1007] 在促生长素抑制素中加入 5 当量的 N-PEG5000-二苯硫酚马来酰亚胺或 10 当量的 N-PEG5000-二苯硫酚马来酰亚胺 (100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF 中), 使反应在环境温度下温育 10 分钟。接着分别加入 3 当量的 TCEP 或 5 当量的苯硒酚 (100 倍储备液, 在 50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5-7.5% DMF 中新鲜制备), 在环境温度下用 2 小时由 LC-MS 监测聚乙二醇化的促生长素抑制素的生成。结果显示在图 10 中。

[1008] DiBrDDPD 对促生长素抑制素的修饰

[1009]



[1010] 使冻干的促生长素抑制素 (质量 = 1638) 溶解在缓冲液 (50mM 磷酸钠, pH 6.2, 40% MeCN, 2.5% DMF) 中, 至浓度为 152.6 μ M (0.25mg/mL), 在 21 $^{\circ}$ C 用 1.1 当量的 TCEP 还原 1 小时。还原的完成由 LCMS (质量 = 1640) 证实。加入 DiBrDDPD (100mol 当量), 并使反应在 21 $^{\circ}$ C 维持 10 分钟。观察到促生长素抑制素 /DiBrDDPD 加合物以定量转换形成 (质量 = 1803)。

[1011] 使用膜片钳证实桥接的促生长素抑制素的保留生物活性

[1012] 为了验证桥接修饰是否对得到的促生长素抑制素类似物的活性存在有害影响, 发明人通过膜片钳试验测试了二溴代马来酰亚胺桥接的类似物、聚乙二醇化的二溴代马来酰亚胺桥接的类似物和荧光素二溴代马来酰亚胺桥接的类似物。表达 HKIR3.1/3.2 通道和人促生长素抑制素受体 2 的 HEK293 细胞接受这些化合物处理, 并获取全细胞膜片钳电流记录。全部三种类似物引发了幅度与促生长素抑制素本身相当的 GIRK 电流的强力活化。作为对照, 当细胞用百日咳毒素或通过 GIRK 抑制剂 Tertiapin Q 处理时, 电流被极大地抑制。该数据证实桥接的促生长素抑制素类似物保留了促生长素抑制素对促生长素抑制素受体 2 的激动作用的生物活性。

[1013] 细胞培养

[1014] 细胞培养法和稳定的细胞株的生成如 J Biol Chem 275, 921-9 (2000) 中所述进行。稳定地表达 Kir3.1 和 Kir3.2A 通道的 HEK293 细胞 (人类胚胎肾脏细胞株) 于 37 $^{\circ}$ C 在潮湿气氛 (95% O₂, 5% CO₂) 下维持在补充有 10% 胎牛血清和 727 μ g 的 G418 (Invitrogen) 的极限必需培养基中。以 SSTR2 DNA (Missouri S&T cDNA Resource Center) 连同 pEGFP-N1 (Clontech) 一起对细胞进行瞬时转染, pEGFP-N1 用于使用落射荧光来使转染细胞可视化。每 97 μ l 的细胞培养基 (不包含血清或抗生素) 使用 5 μ l 的 Eugene HD (Roche) 和 800ng SSTR2-DNA 与 40ng EGFP-DNA 进行转染。

[1015] 用于膜片钳实验的促生长素抑制素和类似物的制备

[1016] 如上所述制备桥接的促生长素抑制素。促生长素抑制素及其类似物于 4℃ 在缓冲液 (50mM 磷酸钠, pH 6.2) 中透析 24 小时以除去有机溶剂。透析后确定浓度, 并将肽在 4℃ 保存。使用最终浓度为 20 μ M 的促生长素抑制素和类似物 (在细胞外的膜片钳缓冲液中进行稀释)。

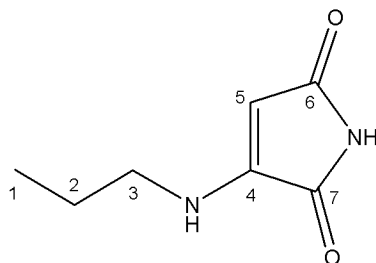
[1017] 电生理学

[1018] 使用 Axopatch 200B 放大器 (Axon Instruments) 进行膜片钳全细胞的电流记录, 该放大器使用由丝状硼硅酸盐化的玻璃毛细管 (Harvard Apparatus, 1.5mm OD x 1.17mm ID) 拉出的阻抗为 3M Ω ~ 4M Ω 的火焰磨光的吸液管。获取数据, 并用 Digidata1322A interface (Axon Instruments) 和 pCLAMP 软件 (版本 8.1, Axon Instruments) 分析。使用快速灌注系统施用促生长素抑制素和类似物 (Rapid Solution Changer, RSC-160, Bio-Logic France)。以 -60mV 对细胞进行夹钳。细胞外液是 (mM): NaCl 80、KCl 60、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、HEPES 10、NaH₂PO₄ 0.33、葡萄糖 10, pH 7.4; 同时细胞内液是 (mM): 葡糖酸钾 110、KCl 20、NaCl 10、MgCl₂ 1、MgATP 2、EGTA2GTP 0.3, pH 7.4。应用激动剂之后, 电流被激发, 首先为延迟“滞后”, 随之是快速升至峰值幅值“升至峰值的时间”。撤除激动剂后, 电流衰减返回基线。对于各细胞, 评价是否存在由施用药物的压力导致的流动伪像。这通过在记录之初应用来自一个排出管的槽液来进行。Tertiapin (GIRK 电流的抑制剂 (Alomone)) 以 100nM 的最终浓度使用。细胞用 Gi/o 蛋白的抑制剂, 百日咳毒素 (Sigma, 100ng/ml) 温育整夜。将药物制备为浓缩的储备液, 并在 -20℃ 保存。

[1019] 结果显示在图 11 和 12 中。

[1020] 比较例 79: 丙基氨基马来酰亚胺的制备

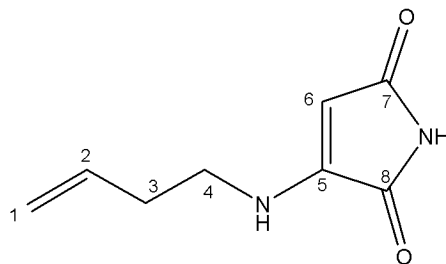
[1021]



[1022] 向甲醇 (15mL) 中的丙胺 (75 μ L, 1.09mmol) 和乙酸钠 (92mg, 1.12mmol) 中滴加甲醇 (15mL) 中的溴代马来酰亚胺 (200mg, 1.12mmol)。10 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (石油醚中 10% 乙酸乙酯) 进行的纯化, 得到了所需的化合物, 其为亮黄色蜡状固体 (82mg, 0.53mmol), 产率 49%。 δ_{H} (500MHz, CDCl₃) 7.36 (s, 1H, NH), 5.45 (s, 1H, NH), 4.80 (d, 1H, J = 1.3, H-5), 3.14 (dt, 2H, J = 6.2 和 7.2, H₂-3), 1.71-1.63 (m, 2H, H₂-2), 0.99 (t, 3H, J = 7.4, H₃-1); δ_{C} (125MHz, CDCl₃) 172.31 (C = O), 167.73 (C = O), 149.83 (C4), 85.29 (C5), 46.16 (C3), 21.91 (C2), 11.42 (C1); IR (固体, cm⁻¹) 3190 (m), 2962 (m), 1693 (m), 1627 (s); MS (EI) m/z (相对强度): 154 (M⁺, 60), 125 (98), 84 (100); [C₇H₁₀N₂O₂]⁺ 计算的准确质量需要 m/z 154.0737, 测定值 154.0734 (EI); UV (乙腈) ϵ_{240} = 7400 和 ϵ_{348} = 5700 cm⁻¹ M⁻¹ d³。

[1023] 比较例 80: 丁-3-烯基氨基马来酰亚胺的制备

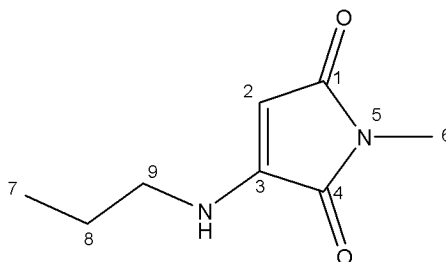
[1024]



[1025] 向甲醇 (15mL) 中的 3-丁烯基胺盐酸盐 (200mg, 1.12mmol) 和乙酸钠 (184mg, 2.24mmol) 中滴加溶解在甲醇 (15mL) 中的溴代马来酰亚胺 (200mg, 1.12mmol)。10 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (石油醚中 10% 乙酸乙酯) 进行的纯化, 得到了所需的化合物, 其为亮黄色蜡状固体 (142mg, 0.85mmol), 产率为 76%。 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 7.10 (s, 1H, NH), 5.77 (tdd, 1H, $J = 6.9, 10.7$ 和 17.4 , H-2), 5.38 (s, 1H, NH), 5.18-5.15 (m, 2H, H_2 -1), 4.83 (d, 1H, $J = 1.3$, H-6), 3.24 (t, 2H, $J = 6.7$, H_2 -4), 2.40 (dtd, 2H, $J = 1.2, 6.8$ 和 6.9 , H_2 -3); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 171.94 (C=O), 167.45 (C=O), 149.53 (C5), 133.89 (C2), 118.51 (C1), 85.80 (C6), 43.30 (C4), 32.68 (C3); IR (固体, cm^{-1}) 3290 (m), 1703 (m), 1629 (s); MS (ES⁻) m/z (相对强度): 165 ([M-H], 100); $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2] - \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 165.0659, 测定值 165.0664 (ES⁻); m.p.: $68^\circ\text{C} \sim 76^\circ\text{C}$; UV (乙腈) $\epsilon_{241} = 8300$ 和 $\epsilon_{348} = 6100 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$ 。

[1026] 比较例 81 : N-甲基丙基氨基马来酰亚胺的制备

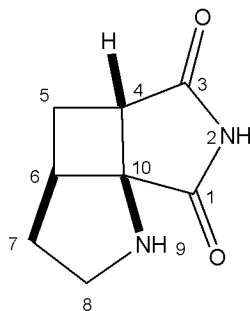
[1027]



[1028] 向甲醇 (30mL) 中的丙胺 (52 μL , 0.78mmol) 和乙酸钠 (64mg, 0.78mmol) 中滴加甲醇 (30mL) 中的 N-甲基单溴代马来酰亚胺 (150mg, 0.78mmol)。10 分钟后, 溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (石油醚中 10% 乙酸乙酯) 进行的纯化, 得到所需的化合物, 其为亮黄色蜡状固体 (41mg, 0.24mmol), 产率为 31%。 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 5.43 (s, 1H, NH), 4.80 (s, 1H, H-2), 3.16-3.13 (m, 2H, H_2 -9), 2.98 (s, 3H, H_3 -6), 1.71-1.64 (m, 2H, H_2 -8), 0.99 (t, $J = 7.5$, H_3 -7); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 172.71 (C=O), 167.66 (C=O), 149.51 (C3), 83.84 (C2), 46.01 (C9), 23.44 (C6), 21.87 (C8), 11.38 (C7); IR (膜, cm^{-1}) 3317 (m), 2944 (w), 1698 (s), 1651 (s); MS (EI) m/z (相对强度): 168 (M⁺, 70), 139 (100), 111 (40); $[\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2] +$ 计算的准确质量需要 m/z 168.0893, 测定值 168.0887 (EI); UV (乙腈) $\epsilon_{210} = 15900$, $\epsilon_{240} = 2800$, $\epsilon_{283} = 500$ 和 $\epsilon_{368} = 500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ d}^3$ 。

[1029] 比较例 82 : 2,9-氮杂三环 [5,3,0,0¹⁰⁻⁴] 癸烷 -1,3-二酮的制备

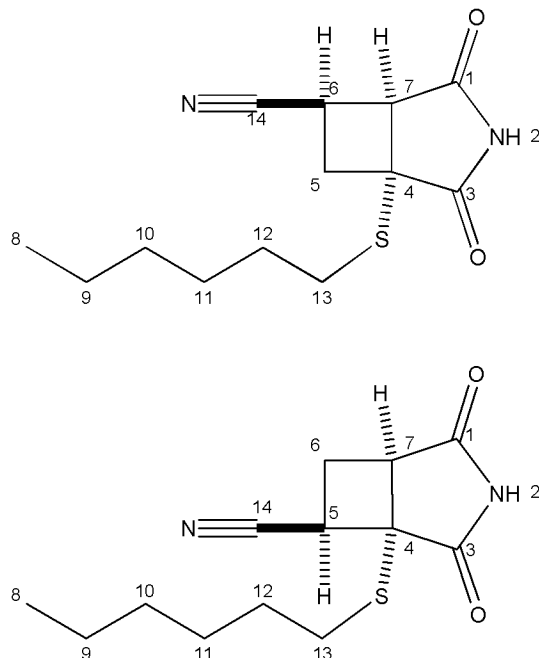
[1030]



[1031] 将丁-3-烯基氨基马来酰亚胺 (42mg, 0.25mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中, 得到 0.01M 的溶液。将得到的溶液脱气 30 分钟, 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 4 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 乙酸乙酯至乙酸乙酯中 5% 甲醇) 进行的纯化得到了所需的化合物, 其为本白色固体 (39mg, 0.23mmol), 产率 93%。
 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 3.50 (ddd, 1H, $J = 2.6, 4.8$ 和 11.8 , HH-8), 3.18-3.12 (m, 2H, HH-8 和 H-6), 2.98 (dd, 1H, $J = 3.9$ 和 10.7 , H-4), 2.21 (ddd, 1H, $J = 4.0, 8.6$ 和 13.2 , HH-5), 2.01 (ddd, 1H, 5.8, 10.5 和 13.4 , HH-5), 1.79 (m, 2H, H_2 -7); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 179.04 ($\text{C} = \text{O}$), 178.95 ($\text{C} = \text{O}$), 70.85 (C10), 48.43 (C8), 44.25 (C4), 43.82 (C6), 32.93 (C7) 24.96 (C5); IR (固体, cm^{-1}) 3198 (m), 2944 (m), 1701 (s); MS (EI) m/z (相对强度): 166 (M^+ , 45), 125 (100); $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ 计算的准确质量需要 m/z 166.07387, 测定值 166.07386 (EI); m. p.: $110^\circ\text{C} \sim 113^\circ\text{C}$ 。

[1032] 比较例 83: (4SR, 6RS, 7SR) 2-氮杂-4-己硫基-6-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5RS, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1033]



[1034] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (22.5mL) 和丙烯腈 (2.5mL) 中, 得到 0.005M 的溶液。对得到的溶液脱气 30 分钟, 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 乙酸乙酯至石油醚中 50% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到了 (4SR, 6RS, 7SR) 2-氮杂-4-己硫基-6-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮, 其为稠厚的无色油状物 (9mg, 0.034mmol), 产率

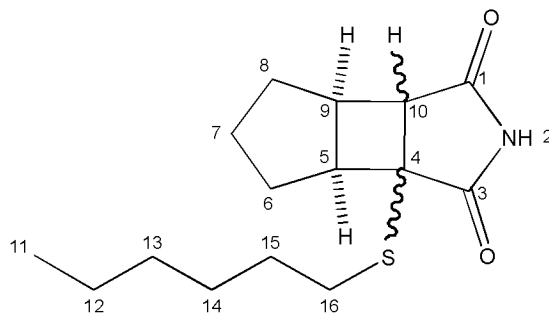
为 29%，和 (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮，其为稠厚的无色油状物 (12mg, 0.045mmol)，产率为 39%。

[1035] (4SR,6RS,7SR) 2-氮杂-4-己硫基-6-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 3.53(dt, 1H, $J = 1.4$ 和 8.1 , H-6), 3.16-3.10(m, 2H, HH-5 和 H-7), 2.89-2.80(m, 2H, H_2 -13), 2.56-2.50(m, 1H, HH-5), 1.67-1.55(m, 4H, H_2 -12 和 H_2 -11), 1.42-1.37(m, 2H, H_2 -10), 1.33-1.27(m, 2H, H_2 -9), 0.89(t, 3H, $J = 6.9$, H_3 -8); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 174.49(C=O), 172.91(C=O), 116.82(C4), 52.38(C14), 44.16(C6), 31.33(C13), 30.87(C7), 30.29(CH_2), 29.26(CH_2), 28.64(CH_2), 25.92(CH_2), 22.82(C5), 14.11(C8); IR(油, cm^{-1}) 3223(w), 2926(w), 1778(w), 1714(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 267([M+H], 40), 213(70), 180(100); $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 267.1167, 测定值 267.1175(CI+)

[1036] (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-腈-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 3.66(dd, 1H, $J = 6.0$ 和 9.5 , H-5), 3.23(dd, 1H, $J = 5.2$ 和 10.9 , H-7), 3.01-2.82(m, 3H, HH-6 和 H_2 -13), 2.67(ddd, 1H, $J = 5.3, 9.6$ 和 14.7 , HH-6), 1.65-1.60(m, 2H, H_2 -12), 1.42-1.36(m, 2H, H_2 -11), 1.32-1.27(m, 4H, H_2 -9 和 H_2 -10), 0.88(t, 3H, $J = 6.8$, H_3 -8); δ_{C} (125MHz, CDCl_3) 175.08(C=O), 174.82(C=O), 117.13(C4), 51.24(C14), 44.26(C5), 31.36(C13), 30.96(C7), 29.82(CH_2), 29.19(CH_2), 28.62(CH_2), 25.72(C6), 22.58(CH_2), 14.26(C8); IR(油, cm^{-1}) 3247(w), 2927(w), 1717(s); MS(CI) m/z (相对强度): 267([M+H], 75), 214(100), 180(70); $[\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 267.1167 测定值 267.1158(CI)。

[1037] 比较例 84: (5RS,9SR) 2-氮杂-4-己硫基-2-氮杂-三环 [3.5.0.0^{5,9}] 二-1,3-酮的制备

[1038]

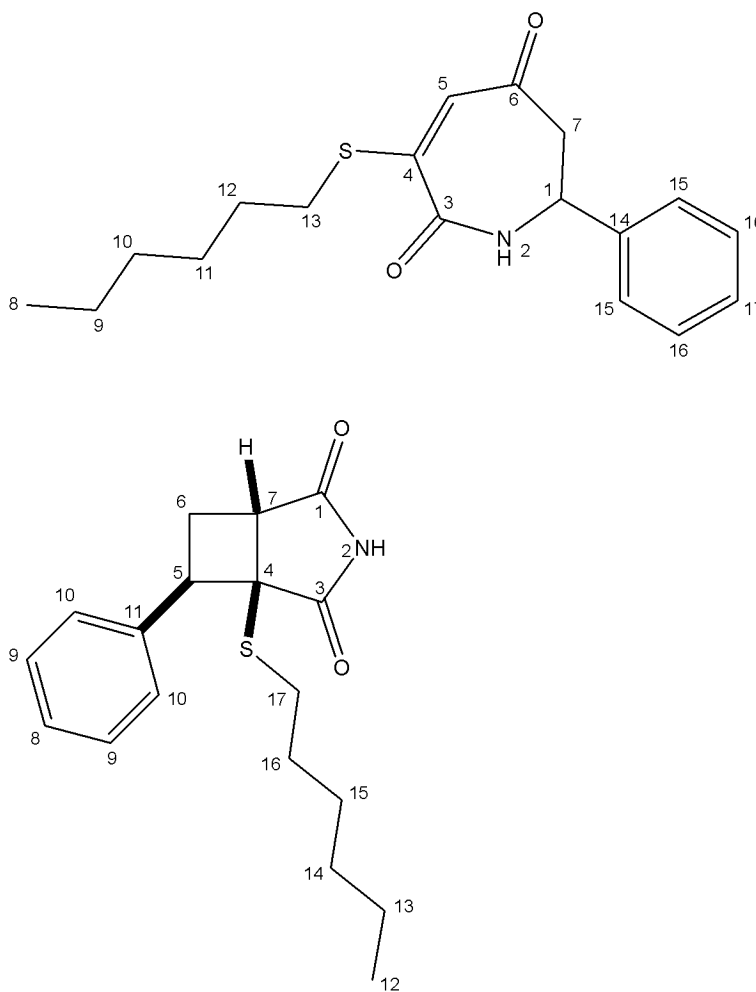


[1039] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (22.5mL) 和环戊烯 (3mL, 36mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。对得到的溶液脱气 30 分钟，并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去，通过闪式色谱 (梯度洗脱，石油醚中 10% 乙酸乙酯至石油醚中 50% 乙酸乙酯) 进行的纯化提供了所需的化合物，其为稠厚的无色油状物 (12mg, 0.045mmol)，产率 77%，是两种不可分的非对映异构体的混合物。COSY 的分析显示某些信号来自同一化合物，以下标 ‘a’ 和 ‘b’ 表示，但各非对映异构体的具体强度未知。信号的重叠阻碍了 NOe 分析。 δ_{H} (500MHz, CDCl_3) 3.15-3.07(m, 2H, H-5_a 和 H-10_a), 3.00(t, 1H, $J = 6.8$, H-5_b), 2.94(td, 1H, $J = 3.9$ 和 6.6 , H-9_b), 2.87-2.82(m, 2H, H-9_a 和 HH-16_a), 2.64-2.59(m, 1H, HH-16_b), 2.52-2.47(m, 3H, H-10_b, HH-16_a 和 HH-16_b), 2.07(dd, 2H, $J = 6.3$ 和 6.9 , HH-15_a 和 HH-15_b), 1.96-1.89(m, 2H, HH-15_a 和 HH-15_b), 1.88-1.82(m,

^1H , $\text{H}_2\text{-7}_a$ 和 $\text{H}_2\text{-7}_b$) 1.64-1.50 (m, 8H, $\text{H}_2\text{-6}_a$, $\text{H}_2\text{-6}_b$, $\text{H}_2\text{-8}_a$ 和 $\text{H}_2\text{-8}_b$), 1.38-1.25 (m, 12H, $\text{H}_2\text{-12}_a$, $\text{H}_2\text{-12}_b$, $\text{H}_2\text{-13}_a$, $\text{H}_2\text{-13}_b$, $\text{H}_2\text{-14}_a$ 和 $\text{H}_2\text{-14}_b$), 0.89-0.86 (m, 6H, $\text{H}_3\text{-11}_a$ 和 $\text{H}_3\text{-11}_b$); δ_c (125MHz, CDCl_3) 179.09 (C = O), 177.12 (C = O), 176.93 (C = O), 171.83 (C = O), 51.31 (C4), 51.33 (C4), 50.68 (C10), 45.32 (C10), 43.26 (C9), 41.70 (C5), 32.38 (CH_2), 30.98 (CH_2), 30.95 (CH_2), 30.78 (CH_2), 28.92 (CH_2), 28.50 (CH_2), 28.30 (CH_2), 28.22 (CH_2), 28.10 (CH_2), 28.13 (CH_2), 25.09 (CH_2), 22.14 (CH_2), 22.11 (CH_2), 13.66 (2 x C11), 由于非对映异构体的重叠导致一些碳信号缺失; IR (油, cm^{-1}) 3120 (w), 2927 (m), 1711 (s), 1627 (s); MS (ES-) m/z (相对强度): 280 ([M-H], 50), 212 (100); [$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}$]-H 计算的准确质量需要 m/z 280.1371, 测定值 280.1382 (ES-).

[1040] 比较例 85: 4-己硫基-1-苯基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮和 (4RS,5SR,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1041]



[1042] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (133 μL , 1.2mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 4-己硫基-1-苯基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮, 其为稠厚的无色油状物 (11mg, 0.034mmol), 产率为 30%, 和 (4RS,5SR,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮, 其为稠厚的无色油状物 (26mg,

0.082mmol), 产率为 70%。

[1043] 4-己硫基-1-苯基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮

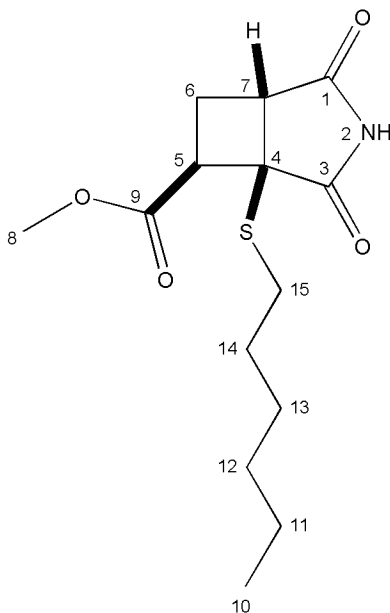
[1044] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.34-7.24 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.15 (d, 1H, $J = 1.5$, H-5), 4.11 (t, 1H, $J = 7.7$, H-1), 3.01 (ddd, 1H, $J = 1.5, 7.8$ 和 15.8 , HH-7), 2.96 (dd, 1H, $J = 7.8$ 和 15.6 , HH-7), 2.36-2.26 (m, 2H, H_2 -13), 1.50-1.41 (m, 2H, H_2 -12), 1.35-1.33 (m, 6H, H_2 -9, H_2 -10 和 H_2 -11), 0.85 (t, 3H, $J = 7.0$, H_3 -8); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 170.96 (C=O), 169.95 (C=O), 147.26 (C4), 141.10 (C14), 129.41 (C5), 128.89 (2 x Ar-H), 127.86 (C17), 127.71 (2 x Ar-H), 47.24 (C1), 32.47 (C13), 31.43 (CH_2), 29.19 (CH_2), 28.61 (CH_2), 22.60 (CH_2), 14.10 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3288 (w), 2928 (w), 1775 (w), 1717 (s); MS (FAB+) m/z (相对强度): 340 ([M+Na], 20), 329 (35), 207 (20), 176 (100); $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}] + \text{Na}$ 计算的准确质量需要 m/z 340.1347, 测定值 340.1351 (FAB+)。

[1045] (4RS,5SR,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

[1046] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.77 (s, 1H, NH), 7.39-7.31 (m, 5H, 5 x Ar-H), 4.05 (t, 1H, $J = 8.8$, H-5), 3.17 (dd, 1H, $J = 3.4$ 和 10.9 , H-7), 3.04 (ddd, 1H, $J = 8.4, 11.1$ 和 12.7 , HH-6), 2.63 (ddd, 1H, $J = 3.6, 9.0$ 和 12.8 , HH-6), 2.43 (ddd, 1H, $J = 6.7, 7.9$ 和 11.3 , HH-17), 2.13 (ddd, 1H, $J = 6.6, 8.0$ 和 11.3 , HH-17), 1.30-1.08 (m, 8H, H_2 -13, H_2 -14 和 H_2 -15 和 H_2 -16), 0.83 (t, 3H, $J = 7.3$, H_3 -12); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 178.76 (C=O), 177.62 (C=O), 136.51 (C11), 128.77 (2 x Ar-H), 128.70 (2 x Ar-H), 128.03 (C8), 57.17 (C4), 45.70 (C5), 43.87 (C7), 31.26 (C17), 28.70 (CH_2), 28.65 (CH_2), 28.52 (CH_2), 26.22 (C6), 22.46 (CH_2), 14.10 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3218 (w), 2926 (w) 1771 (m), 1703 (s); MS (FAB+) m/z (相对强度): 340 ([M+Na], 20), 199 (25), 176 (100); $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}] + \text{Na}$ 计算的准确质量需要 m/z 340.1347, 测定值 340.1357 (FAB+)。

[1047] 比较例 86: (4RS,7SR,5RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-羧酸甲基酯-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1048]

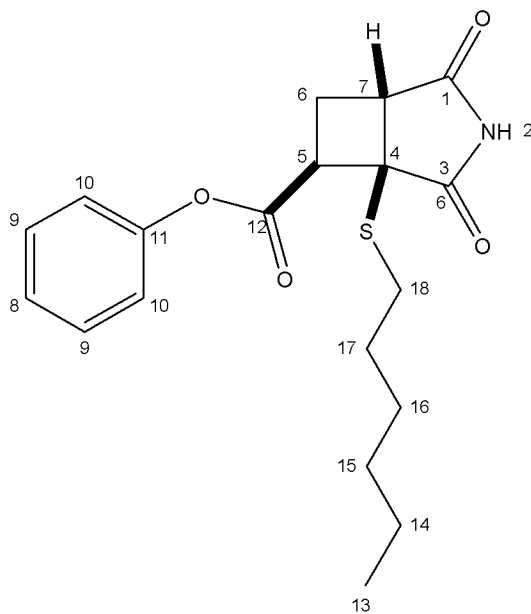


[1049] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (21.9mL) 和丙烯酸甲酯

(3.1mL, 36mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟,并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去,通过闪式色谱 (梯度洗脱,石油醚中 10% 乙酸乙酯至石油醚中 50% 乙酸乙酯) 进行的纯化提供了所需的化合物,其为稠厚的无色油状物 (17mg, 0.056mmol), 产率 48%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.50 (s, 1H, NH), 3.81 (s, 3H, H_3 -8), 3.57 (dd, 1H, $J = 5.8$ 和 8.5 , H-5), 3.18 (dd, 1H, $J = 5.0$ 和 10.7 , H-7), 3.11 (ddd, 1H, $J = 5.5$, 11.0 和 12.9 , HH-6), 2.73 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5 , HH-15), 2.64 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5 , HH-15), 2.29 (ddd, 1H, $J = 5.2$, 8.5 和 13.2 , HH-6), 1.52-1.47 (m, 2H, H_2 -14), 1.35-1.30 (m, 2H, H_2 -13), 1.29-1.21 (m, 4H, H_2 -11 和 H_2 -12), 0.87 (t, 3H, $J = 6.7$, H_3 -10); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 176.65 (C=O), 171.13 (C=O), 170.48 (C=O), 52.59 (C8), 52.39 (C4), 44.56 (C7), 44.06 (C5), 31.41 (C15), 29.73 (CH_2), 29.16 (CH_2), 28.68 (CH_2), 23.57 (C12), 22.57 (C11), 14.11 (C10); IR (油, cm^{-1}) 3244 (w), 2928 (w), 1778 (w), 1714 (s); MS (FAB+) m/z (相对强度): 322 ($[\text{M}+\text{Na}]$, 100), 300 (30), 214 (25); $[\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{SN}] + \text{Na}$ 计算的准确质量需要 m/z 322.1089, 测定值 322.1082 (FAB+)。

[1050] 比较例 87: (4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-羧酸苯酯-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1051]

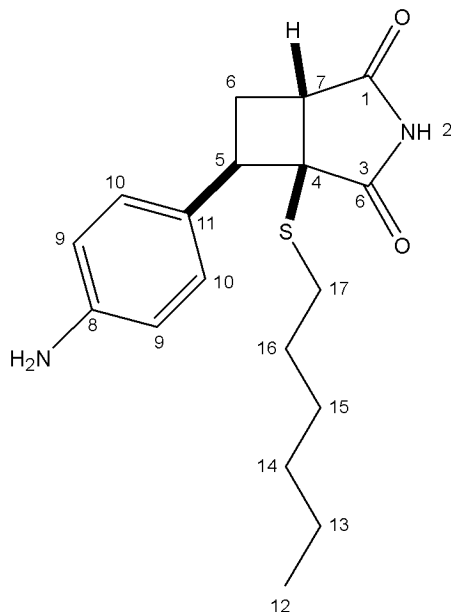


[1052] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟,加入丙烯酸苯酯 (160 μL , 1.20mmol),并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去,通过闪式色谱 (梯度洗脱,石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化提供了所需的化合物,其为稠厚的无色油状物 (21mg, 0.058mmol), 产率 48%,和己硫基马来酰亚胺二聚物 (12mg, 0.028mmol), 产率 47%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.41 (s, 1H, NH), 7.41-7.39 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.27-7.25 (m, 1H, H-8), 7.20 (d, 1H, $J = 7.8$, 2 x Ar-H), 3.80 (dd, 1H, $J = 5.1$ 和 8.5 , H-5), 3.29 (dd, 1H, $J = 5.1$ 和 10.7 , H-7), 3.20 (ddd, 1H, $J = 5.5$, 10.9 和 13.0 , HH-6), 2.62 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5 , HH-18), 2.73 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5 , HH-18), 2.40 (ddd, 1H, $J = 5.6$, 8.8 和 13.5 , HH-6), 1.54-1.48 (m, 2H, H_2 -17), 1.33-1.16 (m, 6H, H_2 -14, H_2 -15 和 H_2 -16), 0.84 (t,

^3H , $J = 6.9$, $\text{H}_3\text{-13}$); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 176.35 (C=O), 176.19 (C=O), 168.85 (C=O), 150.66 (C11), 129.64 (2 x Ar-H), 126.34 (C8), 121.54 (2 x Ar-H), 52.59 (C4), 44.78 (C7), 44.17 (C5), 31.36 (CH_2), 29.94 (C18), 29.09 (CH_2), 28.68 (CH_2), 23.83 (C6), 22.56 (CH_2), 14.08 (C13); IR (油, cm^{-1}) 3213 (w), 2927 (w) 1757 (m), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 362 ([M+H], 35), 268 (100), 149 (25); $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 362.1426, 测定值 362.1431 (CI+).

[1053] 比较例 88: (4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-(对氨基)苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

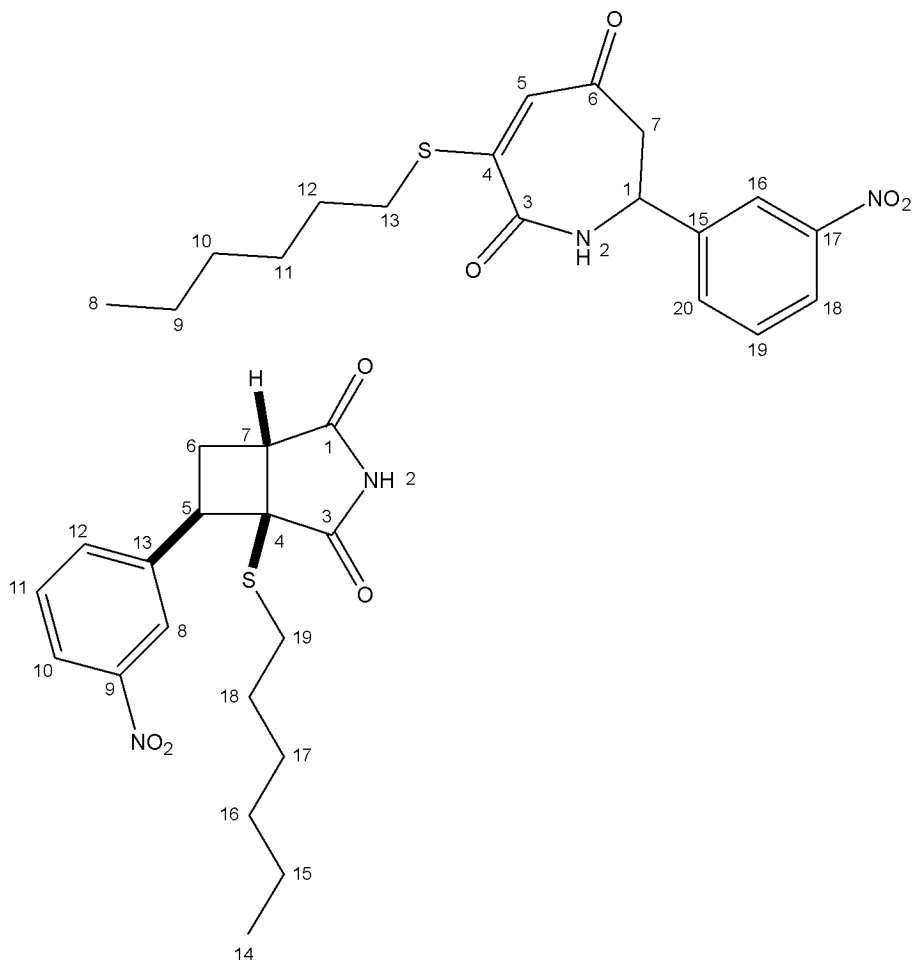
[1054]



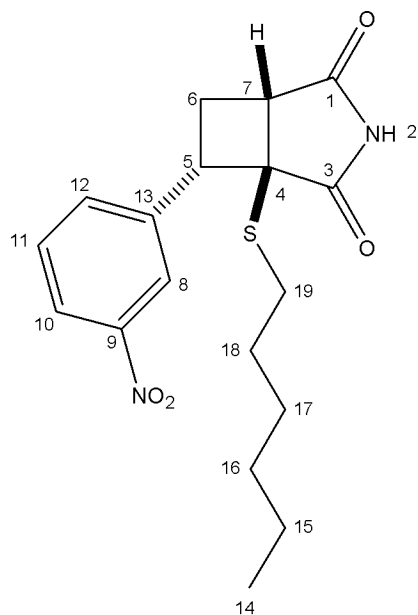
[1055] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟, 加入 4-乙烯基苯胺 (136 μL , 1.2mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到了所需的化合物, 其为稠厚的无色油状物 (7mg, 0.021mmol), 产率 17%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.17 (s, 1H, NH), 7.10 (d, 2H, $J = 8.5$, 2 x Ar-H), 6.67 (d, 2H, $J = 8.5$, 2 x Ar-H), 3.94 (t, 1H, $J = 9.0$, H-5), 3.13 (dd, 1H, $J = 3.7$ 和 11.1, H-7), 2.98 (ddd, 1H, $J = 8.8$, 11.2 和 12.9, HH-6), 2.58 (ddd, 1H, $J = 3.5$, 9.1 和 12.8, HH-6), 2.42 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5, HH-17), 2.17 (dt, 1H, $J = 7.5$ 和 11.5, HH-17), 1.34-1.29 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-16}$), 1.25-1.11 (m, 6H, $\text{H}_2\text{-13}$, $\text{H}_2\text{-14}$ 和 $\text{H}_2\text{-15}$), 0.80 (t, 3H, $J = 7.4$, $\text{H}_3\text{-12}$); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 178.64 (C=O), 177.48 (C=O), 146.28 (C8), 129.81 (2 x Ar-H), 126.20 (C11), 114.81 (2 x Ar-H), 57.97 (C4), 45.48 (C5), 43.79 (C7), 31.35 (CH_2), 29.07 (CH_2), 28.65 (C17), 26.41 (C6), 22.54 (CH_2), 14.12 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3214 (w), 2928 (w) 1769 (m), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 333 ([M+H], 55), 119 (100); $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 333.1637, 测定值 333.1642 (CI+).

[1056] 比较例 89: 4-己硫基-1-(间硝基)苯基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮、(4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5RS, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1057]



[1058]



[1059] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入 3- 硝基苯乙烯 (136 μ L, 1.2mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 4- 己硫基 -1-(间硝基) 苯基 -1,7- 二

氢-2H-吡啶因-3,6-二酮,其为稠厚的无色油状物(23mg,0.063mmol),产率55%,(4RS,5SR,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮,其为稠厚的无色油状物(0.5mg,0.001mmol)(连同4-己硫基-1-(间硝基)苯基-1,7-二氢-2H-吡啶因-3,6-二酮),产率1%,以及(4RS,5RS,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮,其为稠厚的无色油状物(12mg,0.33mmol),产率21%(伴随二聚物)。

[1060] 2-氮杂-4-己硫基-1-(间硝基)苯基-1,7-二氢-2H-吡啶因-3,6-二酮

[1061] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.22(s, 1H, H-16), 8.14(d, 1H, $J = 8.5$, Ar-H), 7.68(t, 1H, $J = 7.6$, Ar-H), 7.53(t, 1H, $J = 7.8$, H-19), 7.20(s, 1H, NH), 6.29(s, 1H, H-5), 4.25(t, 1H, $J = 7.9$, H-1), 3.03(dd, 1H, $J = 8.4$ 和 15.4 , HH-7), 2.98(dd, 1H, $J = 7.4$ 和 15.2 , HH-7), 2.37-2.26(m, 2H, H_2 -13), 1.30-1.24(m, 2H, H_2 -12), 1.21-1.08(m, 6H, 3 x CH_2), 0.81(t, 3H, $J = 7.1$, H_3 -8); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 170.70(C=O), 169.54(C=O), 148.60(C16), 146.35(C4), 143.94(C14), 133.83(Ar-H), 129.96(Ar-H), 129.86(C5), 122.96(Ar-H), 122.59(Ar-H), 46.78(C1), 32.52(C7), 31.56(CH_2), 31.37(C13), 29.03(CH_2), 28.52(CH_2), 22.57(CH_2), 14.11(C8); IR(油, cm^{-1}) 3282(w), 2928(m) 1775(w), 1717(s); 未发现质量离子。

[1062] (4RS,5RS,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮信号为粗体

[1063] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.59(s, 0.2H, NH), 8.22-8.16(m, 0.4H, 2 x Ar-H), 8.15(d, 1H, $J = 8.4$, H-10), 8.07(s, 1H, H-8), 7.84(s, 1H, NH), 7.66(d, 0.2H, $J = 7.5$, Ar-H), 7.62(d, 1H, $J = 7.6$, H-12), 7.56(t, 0.2H, $J = 8.0$, H-11), 7.53(t, 1H, $J = 8.0$, H-11), 4.14(t, 0.2H, $J = 8.6$, H-5), 4.10(t, 1H, $J = 9.4$, H-5), 3.30(dd, 1H, $J = 6.1$ 和 10.4 , H-7), 3.23(dd, 0.2H, $J = 3.0$ 和 11.6 , H-7), 3.17(dt, 1H, $J = 10.3$ 和 13.3 , HH-6), 3.05(ddd, 0.2H, $J = 8.5$, 11.1 和 13.1 , HH-6), 2.73(ddd, 0.2H, $J = 3.6$, 9.0 和 12.9 , HH-6), 2.68-2.56(m, 3H, HH-6 和 H_2 -19), 2.45(ddd, 0.2H, $J = 6.7$, 8.1 和 11.4 , HH-19), 2.13(ddd, 0.2H, $J = 6.8$, 8.0 和 11.3 , HH-19), 1.40-1.35(m, 2.4H, H_2 -18 和 H_2 -18), 1.31-1.23(m, 6H, H_2 -15, H_2 -16 和 H_2 -17), 1.21-1.08(m, 1.2H, H_2 -15, H_2 -16 和 H_2 -17), 0.87(t, 3H, $J = 6.9$, H_3 -14), 0.81(t, 0.6H, $J = 7.1$, H_3 -14); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 176.25(C=O), 174.16(C=O), 148.44(C9), 139.02(C13), 133.88(Ar-H), 129.69(Ar-H), 123.07(Ar-H), 121.92(Ar-H), 57.34(C4), 46.76(C5), 44.18(C7), 31.36(CH_2), 30.21(CH_2), 29.33(C19), 28.68(CH_2), 26.07(C6), 22.57(CH_2) 14.11(C14); IR(油, cm^{-1}) 2934(w), 1719(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 363([M+H], 65), 214(90), 180(100); $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 363.1379, 测定值 363.1397(CI+)。

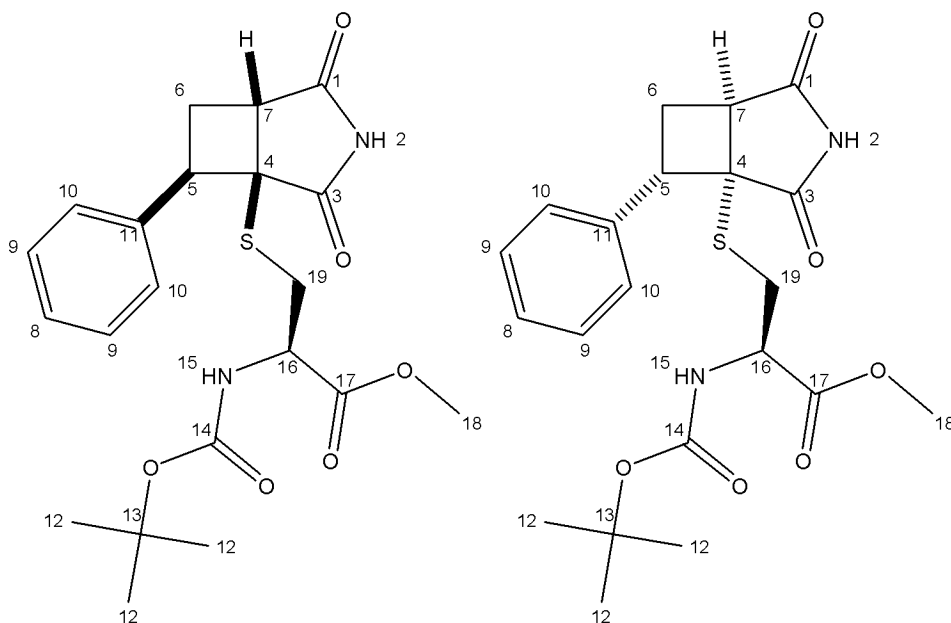
[1064] (4RS,5RS,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-(间硝基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

[1065] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.59(s, 1H, NH), 8.22-8.16(m, 2H, 2 x Ar-H), 7.66(d, 1H, $J = 7.5$, Ar-H), 7.56(t, 1H, $J = 8.0$, H-11), 4.14(t, 1H, $J = 8.6$, H-5), 3.23(dd, 1H, $J = 3.0$ 和 11.6 , H-7), 3.05(ddd, 1H, $J = 8.5$, 11.1 和 13.1 , HH-6), 2.73(ddd, 1H, $J = 3.6$, 9.0 和 12.9 , HH-6), 2.45(ddd, 1H, $J = 6.7$, 8.1 和 11.4 , HH-19), 2.13(ddd, 1H, $J = 6.8$, 8.0 和 11.3 ,

HH-19), 1.30-1.24(m, 2H, H₂-18), 1.21-1.08(m, 6H, H₂-15, H₂-16 和 H₂-17), 0.81(t, 3H, J = 7.1, H₃-14); δ_c (150MHz, CDCl₃) 177.94(C=O), 176.84(C=O), 148.14(C9), 138.76(C13), 135.29(Ar-H), 129.24(Ar-H), 123.39(Ar-H), 123.16(Ar-H), 56.71(C4), 45.09(C5), 43.69(C7), 31.26(CH₂), 28.88(CH₂), 28.84(C19), 28.51(C6), 26.33(CH₂), 22.57(CH₂), 14.06(C14); IR(油, cm⁻¹) 3214(w), 2928(w) 1773(m), 1709(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 363([M+H], 10), 214(15), 84(100); [C₁₈H₂₂N₂O₄S]+H 计算的准确质量需要 m/z 363.1379, 测定值 363.1394(CI+).

[1066] 比较例 90:(4RS,5SR,7RS) 2-氮杂-4-(N-Boc-L-Cys-OMe)-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1067]

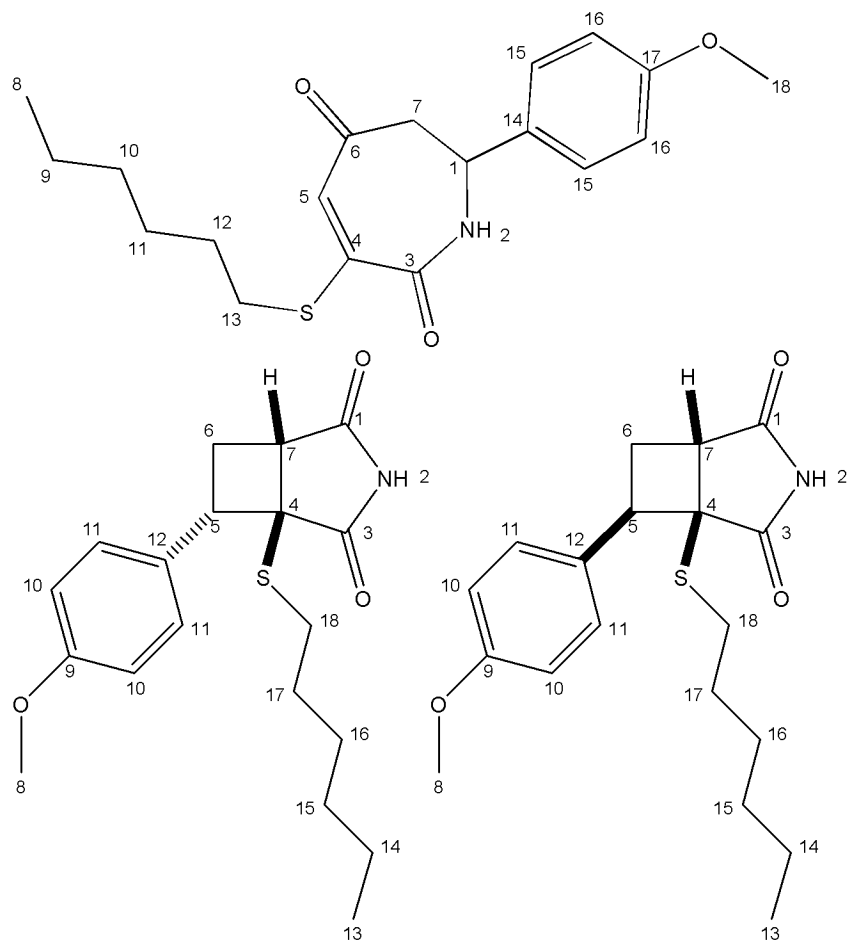


[1068] 将 N-Boc-Cys(Mal)-OMe (50mg, 0.15mmol) 溶解在乙腈 (30mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (136 μ L, 1.2mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化提供了所需的化合物, 其为稠厚的无色油状物 (16mg, 0.037mmol), 产率 24%, 这是两种主要的非对映异构体 (小信号表明两种其他的非对映异构体, 可能是与添加苯乙烯有关的区域异构体) 的混合物。粗产物的再分析表明反应的成功率为至少 80%。 δ_H (600MHz, CDCl₃) 8.08(s, 2H, 2 x H-2), 7.40-7.31(m, 10H, 10 x Ar-H), 5.0(d, 1H, J = 8.2, H-15), 4.9(d, 1H, J = 7.5, H-15), 4.26-4.23(m, 1H, H-16), 4.18-4.12(m, 1H, H-16), 4.06(t, 2H, J = 8.5, 2 x H-5), 3.669(s, 3H, H₃-18), 3.674(s, 3H, H₃-18), 3.19(ddd, 1H, J = 2.4 和 11.0, H-7), 3.11(dd, 1H, J = 3.2 和 11.0, H-7) 3.04-2.93(m, 3H, 2 x HH-6 和 HH-19), 2.91(dd, 1H, J = 6.6 和 12.8, HH-19), 2.64-2.60(m, 2H, 2 x HH-6), 2.51(dd, 1H, J = 4.6 和 12.8, HH-19), 2.43(dd, 1H, J = 7.3 和 13.0, HH-19), 1.45(s, 9H, 3 x H₃-12), 1.43(s, 9H, 3 x H₃-12); δ_c (150MHz, CDCl₃) 178.41(C=O), 177.25(C=O), 177.20(C=O), 171.40(C=O), 171.10(C=O), 170.98(C=O), 155.28(C=O), 155.18(C=O), 136.28(C11), 136.25(C11), 128.94(2 x Ar-H), 128.93(2 x Ar-H), 128.49(2 x Ar-H), 128.46(2 x Ar-H), 128.38(C8), 128.33(C8), 80.44(2 x C13),

56.71 (C4), 56.48 (C4), 53.03 (C16), 52.87 (C16), 52.78 (C18), 52.75 (C18), 45.92 (C5), 45.82 (C5), 43.76 (C7), 43.61 (C7), 31.28 (C6), 31.09 (C6), 28.38 (6 x C12), 26.33 (C19), 26.21 (C19); IR (油, cm^{-1}) 3215(w), 2971(w) 1738(s), 1715(s); MS (CI+) m/z (相对强度): 435 ([M+H], 10), 379 (30), 335 (100); $[\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}] + \text{H}$ 计算的准确质量需要 m/z 435.1590, 测定值 435.1576 (CI+).

[1069] 比较例 91: 1-(对甲氧基)苯基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮、(4RS,5RS,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮和 (4RS,5SR,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1070]



[1071] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟, 加入 4-甲氧基苯乙烯 (154 μL , 1.20mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 1-(对甲氧基)苯基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮, 其为无色油状物 (10mg, 0.037mmol), 产率 25%, 和 (4RS,5RS,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮 (主要) 与 (4RS,5SR,7RS)-2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮 (次要), 其为无色油状物 (27mg, 0.77mmol), 产率 67%, 这是非对映异构体的混合物 (10 : 1)。

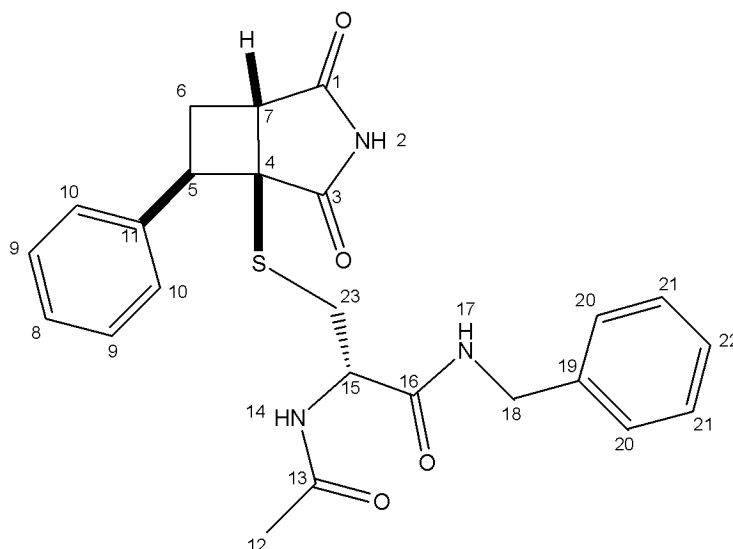
[1072] 4-己硫基-1-(对甲氧基)苯基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.21 (d, 2H, $J = 8.5$, 2 x Ar-H), 7.18 (s, 1H, NH), 6.84 (d, 2H, $J = 9.0$, 2 x Ar-H),

6.13(s, 1H, H-5), 4.08(t, 1H, $J = 7.9$, H-1), 3.80(s, 3H, H₃-18), 2.99(dd, 1H, $J = 7.2$ 和 15.7, HH-7), 2.91(dd, 1H, $J = 8.7$ 和 15.7, HH-7), 2.35-2.26(m, 2H, H₂-13), 1.51-1.43(m, 2H, H₂-12), 1.33-1.16(m, 6H, H₂-9H₂-10 和 H₂-11), 0.85(t, 3H, $J = 7.0$, H₃-8); δ_c (150MHz, CDCl₃) 171.03(C = O), 170.05(C = O), 159.06(C17), 147.37(C4), 132.92(C14), 129.37(C5), 128.79(2 x Ar-H), 114.18(2 x Ar-H), 55.38(C18), 46.61(C1), 32.59(C7), 31.45(C13), 31.38(CH₂), 29.22(CH₂), 28.64(CH₂), 22.61(CH₂), 14.14(C8); IR(油, cm⁻¹) 3275(w), 2927(m) 1774(w), 1717(s); MS(CI+) m/z(相对强度): 347([M+], 15), 237(70), 230(100), 202(60); [C₁₉H₂₅NO₃S]⁺ 计算的准确质量需要 m/z 347.1550, 测定值 363.1553(CI+).

[1073] (4RS, 5RS, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1, 3-二酮(粗体)和(4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-(对甲氧基)苯基-二环[3.2.0]庚烷-1, 3-二酮 δ_H (600MHz, CDCl₃) 8.71(s, 1H, NH), 8.45(s, 0.1H, NH), 7.24(d, 2H, $J = 7.86$ 2 x Ar-H), 7.15(d, 0.2H, $J = 8.7$, 2 x Ar-H), 6.90(d, 1H, $J = 8.6$, 2 x Ar-H), 6.86(d, 0.2H, $J = 8.6$, 2 x Ar-H), 3.99(t, 1H, $J = 8.8$, H-5), 3.94(dd, 0.1H, $J = 8.4$ 和 10.1, H-5), 3.81(s, 3H, H₃-8), 3.77(s, 0.3H, H₃-8), 3.20(dd, 0.1H, $J = 4.5$ 和 11.9, H-7), 3.13(dd, 1H, $J = 3.4$ 和 11.0, H-7), 3.09(dt, 0.1H, $J = 10.6$ 和 13.2, HH-6), 2.98(ddd, 1H, $J = 8.7$, 11.2 和 12.9, HH-6), 2.67(dt, 0.1H, $J = 7.3$ 和 11.5, HH-18), 2.63-2.53(m, 1.1H, HH-6 和 HH-18), 2.54(ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.4 和 11.9, HH-6), 2.43(ddd, 1H, $J = 6.7$, 8.2 和 11.3, HH-18), 2.15(ddd, 1H, $J = 6.7$, 8.4 和 11.4, HH-18), 1.56-1.52(m, 0.2H, H₂-17), 1.39-1.33(m, 0.2H, CH₂), 1.31-1.09(m, 8.4H, H₂-14, H₂-15, H₂-16, H₂-17 和 2 x CH₂) 0.87(t, 0.3H, $J = 7.1$, H₃-13), 0.83(t, 3H, $J = 7.1$, H₃-13); 主要非对映异构体的唯一信号显示 δ_c (150MHz, CDCl₃) 177.81(C = O), 175.48(C = O), 159.39(C9), 129.94(2 x Ar-H), 128.56(C12), 113.65(2 x Ar-H), 57.63(C4), 55.38(C8), 45.25(C5), 43.78(C7), 31.33(CH₂), 29.2(CH₂), 29.01(CH₂), 28.62(CH₂), 26.53(C18), 22.52(C6), 14.10(C13); IR(油, cm⁻¹) 3216(w), 2928(m) 1771(m), 1707(s); MS(CI+) m/z(相对强度): 348([M+H], 20), 135(20), 134(100); [C₁₉H₂₅NO₃S]⁺H 计算的准确值量需要 m/z 348.1633, 测定值 363.1642(CI+).

[1074] 比较例 92:(4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-4-(N-Ac-L-Cys-苄基胺)-5 苯基-二环[3.2.0]庚烷-1, 3-二酮的制备

[1075]



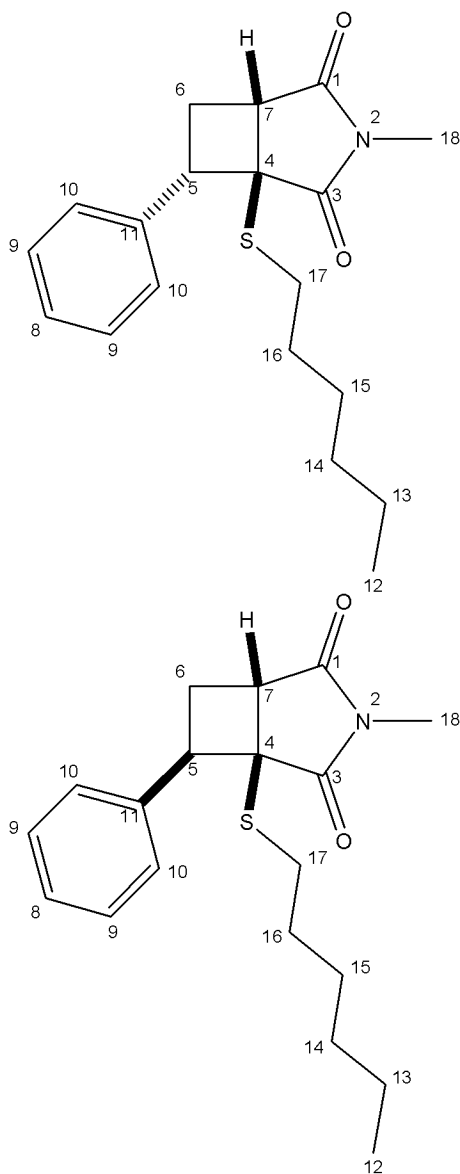
[1076] 将 N-Ac-L-Cys- 苄基胺 (29mg, 0.084mmol) 溶解在乙腈 (50mL) 中以提供 0.002M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (10 μ L, 0.084mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 30% 乙酸乙酯至乙酸乙酯中 10% 甲醇) 进行的纯化得到所需的化合物, 其为无色油状物 (33mg, 0.073mmol), 产率 87%, 是 [2+2] 反应的非对映异构体的混合物。对粗产物的再分析表明反应的成功率大约为 70%。

[1077] 将 N-Ac-L-Cys- 苄基胺 (58mg, 0.17mmol) 溶解在乙腈 (80mL) 中以提供 0.002M 的溶液。所得溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (191 μ L, 1.70mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 30% 乙酸乙酯至乙酸乙酯中 10% 甲醇) 进行的纯化得到所需的化合物, 其为无色油状物 (14mg, 0.031mmol), 产率 19%。对粗产物的再分析表明反应的成功率为至少 75%。

[1078] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 8.69 (s, 1H, H-2), 7.36-7.26 (m, 8H, 8 x Ar-H), 7.18 (d, 2H, J = 7.0, 2 x Ar-H), 6.65 (t, 1H, J = 5.6, H-17), 6.51 (d, 1H, J = 7.4, H-14), 4.33 (d, 2H, J = 6.0, H₂-18), 4.30 (td, 1H, J = 1.2 和 5.4, H-15), 4.05 (t, 1H, J = 8.9, H-5), 3.16 (dd, 1H, J = 3.1 和 11.1, H-7), 3.04 (ddd, 1H, J = 8.9, 11.1 和 12.8, HH-23), 2.94 (dd, 1H, J = 6.6 和 13.3, HH-6), 2.59 (ddd, 1H, J = 3.4, 8.9 和 12.5, HH-23), 2.31 (dd, 1H, J = 5.3 和 13.6, HH-6), 1.98 (s, 3H, H₃-12); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 179.07 (C = O), 176.97 (C = O), 171.10 (C = O), 169.67 (C = O), 137.67 (Ar), 136.16 (Ar), 129.02 (2 x Ar-H), 128.80 (2 x Ar-H), 128.55 (2 x Ar-H), 128.35 (Ar-H), 128.78 (2 x Ar-H), 127.66 (Ar-H), 57.44 (C4), 52.61 (C15), 46.09 (C5), 43.68 (C7), 43.66 (C18), 30.58 (C6), 26.15 (C23), 23.17 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3437 (w), 1726 (s); MS (FAB+) m/z (相对强度): 695 ([M+H], 10), 439 (10), 286 (100); $[C_{32}H_{34}N_6O_8S_2] + H$ 计算的准确质量需要 m/z 695.1958, 测定值 695.1964 (FAB+)。

[1079] 比较例 93: (4RS, 5RS, 7RS) 2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1080]



[1081] 将 N-甲基己硫基马来酰亚胺 (27mg, 0.119mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (136 μ L, 1.19mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4R,5R,7R)-2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮, 其为无色油状物 (5mg, 0.015mmol), 产率 13%, 和 (4R,5SR,7R)-2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮, 其为无色油状物 (23mg, 0.069mmol), 产率 58%。

[1082] (4R,5R,7R)-2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮

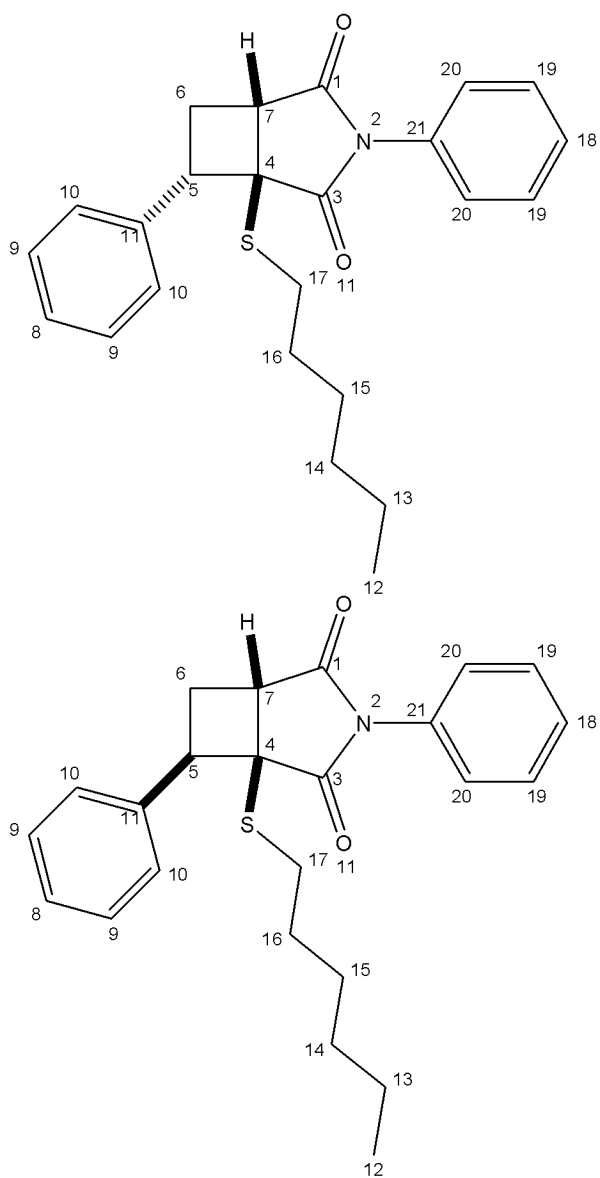
[1083] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 7.32-7.30 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.13 (d, 2H, J = 7.9, 2 x H-10), 3.99 (dd, 1H, J = 7.8 和 10.2, H-5), 3.20 (dd, 1H, J = 4.8 和 10.3, H-7), 3.13-3.07 (m, 1H, HH-6), 2.93 (s, 3H, H₃-18), 2.65 (td, 1H, J = 7.5 和 11.4, HH-17), 2.58 (td, 1H, J = 7.5 和 11.8, HH-17), 2.46 (ddd, 1H, J = 4.9, 7.7 和 12.0, HH-6), 1.55-1.25 (m, 8H, H₂-13, H₂-14, H₂-15 和 H₂-16), 0.87 (t, 3H, J = 7.0, H₃-12); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 177.78 (C = O), 175.17 (C = O), 137.21 (C11), 128.71 (2 x Ar-H), 127.93 (C8), 127.24 (2 x Ar-H),

48.23 (C5), 42.71 (C7), 31.42 (CH₂), 30.07 (C17), 29.33 (CH₂), 28.69 (CH₂), 25.71 (CH₂), 25.25 (C18), 22.58 (CH₂), 14.12 (C12); IR(油, cm⁻¹) 2927(w) 1715(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 332([M+H], 40), 228(40), 86(70), 84(100); [C₁₉H₂₅NO₂S]+H 计算的准确质量需要 m/z 332.1684, 测定值 333.1697(CI+).

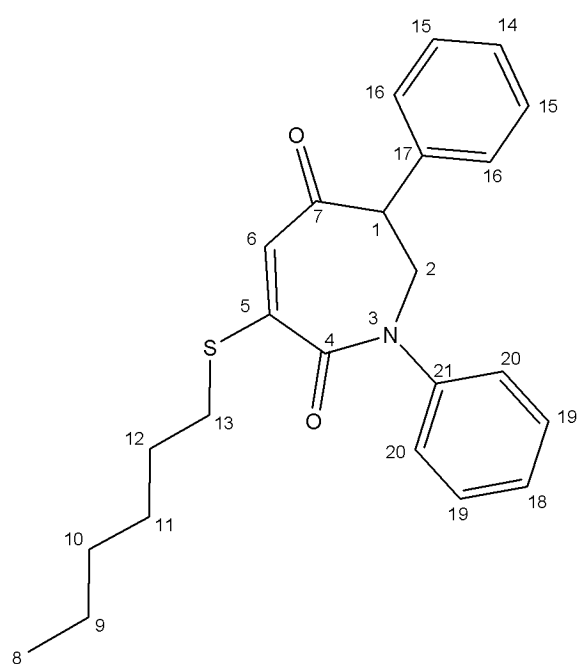
[1084] (4RS,5SR,7RS) 2-氮杂-2-甲基-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

[1085] δ_{H} (600MHz, CDCl₃) 7.39-7.30 (m, 5H, 5 x Ar-H), 3.90 (t, 1H, J = 8.7, H-5) 3.13-3.11 (m, 4H, H₃-18 和 H-7), 3.00 (ddd, 1H, J = 8.5, 11.0 和 12.8, HH-6), 2.53 (ddd, 1H, J = 3.7, 9.1 和 12.8, HH-6), 2.40 (ddd, 1H, J = 6.4, 8.1 和 11.3, HH-17), 2.06 (ddd, 1H, J = 6.5, 8.3 和 11.3, HH-17), 1.25-1.08 (m, 8H, H₂-13, H₂-14, H₂-15 和 H₂-16), 0.82 (t, 3H, J = 7.4, H₃-12); δ_{C} (150MHz, CDCl₃) 178.73 (C=O), 177.70 (C=O), 136.77 (C11), 128.89 (2 x Ar-H), 128.27 (2 x Ar-H), 127.99 (C8), 55.69 (C4), 45.62 (C5), 42.61 (C7), 31.29 (CH₂), 28.94 (CH₂), 28.68 (CH₂), 28.55 (C17), 26.26 (C6), 25.70 (C18), 22.58 (CH₂), 14.09 (C12); IR(油, cm⁻¹) 2927(w) 1703(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 332([M+H], 100); [C₁₉H₂₅NO₂S]+H 计算的准确质量需要 m/z 332.1684, 测定值 332.1680(CI+).

[1086] 比较例 94: (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-2-苯基-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮、(4RS,5SR,7RS) 2-氮杂-2-苯基-4-己硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮和 1-苯基-3-苯基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮的制备 [1087]



[1088]



[1089] 将 N- 苯基己硫基马来酰亚胺 (34mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (135 μ L, 1.18mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。溶剂在真空中除去, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4RS, 5RS, 7RS) 2- 氮杂-2- 苯基-4- 己硫基-5- 苯基- 二环 [3. 2. 0] 庚烷-1, 3- 二酮和 (4RS, 5SR, 7RS) 2- 氮杂-2- 苯基-4- 己硫基-5- 苯基- 二环 [3. 2. 0] 庚烷-1, 3- 二酮, 其为无色油状物 (37mg, 0.94mmol), 产率 80%, 是非对映异构体的混合物 (11 : 2), 以及 1- 苯基-3- 苯基-4- 己硫基-1, 7- 二氢-2H- 吡庚因-3, 6- 二酮, 其为无色油状物 (0.5mg, 0.001mmol), 产率 1%, (4RS, 5RS, 7RS) 2- 氮杂-2- 苯基-4- 己硫基-5- 苯基- 二环 [3. 2. 0] 庚烷-1, 3- 二酮和 (4RS, 5SR, 7RS) 2- 氮杂-2- 苯基-4- 己硫基-5- 苯基- 二环 [3. 2. 0] 庚烷-1, 3- 二酮。

[1090] (4RS, 5RS, 7RS) 2- 氮杂-2- 苯基-4- 己硫基-5- 苯基- 二环 [3. 2. 0] 庚烷-1, 3- 二酮 (粗体)

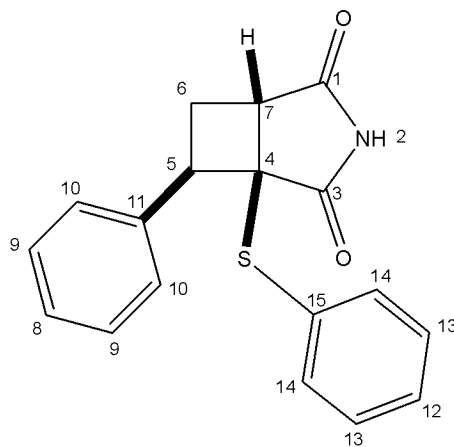
[1091] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.54-7.52 (m, 11H, 2 x Ar-H), 7.46-7.42 (m, 4H, 4 x Ar-H), 7.41-7.37 (m, 46H, 8 x Ar-H 和 2 x Ar-H), 7.27-7.26 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.06-7.05 (m, 2H, 2 x Ar-H), 4.09 (t, 1H, J = 8.5, H-5), 4.08 (t, 5.5H, J = 8.5, H-5), 3.35 (dd, 1H, J = 4.7 和 10.5, H-7), 3.29 (dd, 5.5H, J = 4.0 和 10.9, H-7), 3.20 (td, 1H, J = 10.3 和 13.3, HH-6), 3.09 (ddd, 5.5H, J = 8.2, 11.0 和 13.0, HH-6), 2.78 (td, 1H, J = 7.4 和 11.7, HH-17), 2.72-2.68 (m, 6.5H, HH-6 和 HH-6), 2.66 (dd, 1H, J = 4.8 和 7.4, HH-17), 2.52 (ddd, 5.5H, J = 6.5, 8.2 和 11.4, HH-17), 2.16 (ddd, 5.5H, J = 6.6, 8.4 和 11.4, HH-17), 1.63-1.58 (m, 2H, H_2 -16), 1.42-1.37 (m, 2H, H_2 -15), 1.36-1.09 (m, 24H, 4 x CH_2 和 2 x CH_2), 0.88 (t, 3H, J = 6.7, H_3 -12), 0.83 (t, 16.5H, J = 7.3, H_3 -12); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 177.65 (C = O), 176.82 (C = O), 176.67 (C = O), 174.08 (C = O), 136.96 (C11), 136.82 (C11), 132.06 (C21), 131.86 (C21), 129.40 (2 x Ar-H), 129.22 (Ar-H), 128.96 (2 x Ar-H), 128.84 (Ar-H), 128.79 (Ar-H), 128.34 (2 x Ar-H), 128.08 (Ar-H), 127.51 (Ar-H), 126.56 (2 x Ar-H), 126.34 (Ar-H), 55.57 (C4), 55.47 (C4), 48.78 (C5), 45.87 (C5), 44.88 (C7), 42.79 (C7), 31.45 (C17), 31.31 (C17), 30.27 (CH_2), 29.46 (CH_2), 29.08 (CH_2), 28.75 (CH_2), 28.56 (CH_2), 26.95 (CH_2), 22.60 (CH_2), 22.52 (CH_2), 14.14 (C12), 14.10 (C12) 一些碳信号由于非对映异构体的重叠而缺失; IR (油, cm^{-1}) 2926 (w) 1709 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 394 ([M+H], 70), 290 (100), 105 (100); [$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S}$] + H 计算的准确质量需要 m/z 394.1841, 测定值 394.1834 (CI+)。

[1092] 1- 苯基-3- 苯基-4- 己硫基-1, 7- 二氢-2H- 吡庚因-3, 6- 二酮

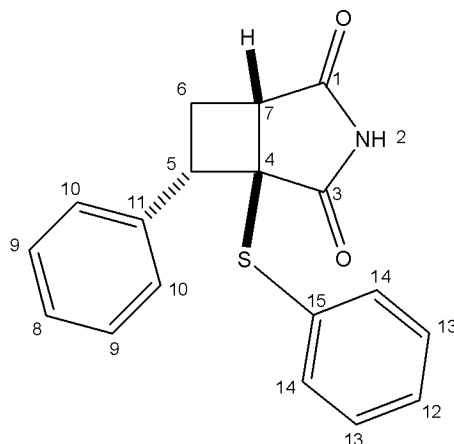
[1093] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.54-7.27 (m, 10H, 10 x Ar-H), 6.32 (s, 1H, H-6), 4.19 (t, 1H, J = 88.0, H-1), 3.14-3.03 (m, 2H, H_2 -2), 2.39-2.29 (m, 2H, H_2 -13), 1.61-1.10 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.89-0.81 (m, 3H, H_3 -8); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 146.31 (C = O), 141.19 (C = O), 130.19 (Ar), 129.41 (Ar), 129.20 (Ar-H), 128.93 (2 x Ar-H), 128.49 (2 x Ar-H), 127.90 (Ar-H), 127.76 (2 x Ar-H), 126.03 (2 x Ar-H), 47.19 (C1), 32.70 (CH_2), 31.43 (CH_2), 29.83 (CH_2), 29.20 (CH_2), 28.63 (CH_2), 22.61 (CH_2), 14.13 (C8); IR (油, cm^{-1}) 2926 (m) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 394 ([M+H], 40), 278 (100); [$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{S}$] + H 计算的准确质量需要 m/z 394.1841, 测定值 394.1829 (CI+)。

[1094] 比较例 95 : (4RS,5SR,7RS) 2- 氮杂 -4- 苯硫基 -5- 苯基 - 二环 [3. 2. 0] 庚烷 -1, 3- 二酮和 (4RS,5RS,7RS) 2- 氮杂 -4- 苯硫基 -5- 苯基 - 二环 [3. 2. 0] 庚烷 -1, 3- 二酮的制备

[1095]



[1096]



[1097] 将苯硫基马来酰亚胺 (17mg, 0.082mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以得到 0.003M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (111 μ L, 0.82mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4RS,5SR,7RS) 2- 氮杂 -4- 苯硫基 -5- 苯基 - 二环 [3. 2. 0] 庚烷 -1, 3- 二酮, 其为无色油状物 (1.5mg, 0.005mmol), 产率 6%, 和 (4RS,5RS,7RS) 2- 氮杂 -4- 苯硫基 -5- 苯基 - 二环 [3. 2. 0] 庚烷 -1, 3- 二酮, 其为无色油状物 (17.5mg, 0.056mmol), 产率 69%。

[1098] (4RS,5SR,7RS) 2- 氮杂 -4- 苯硫基 -5- 苯基 - 二环 [3. 2. 0] 庚烷 -1, 3- 二酮

[1099] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 8.05 (s, 1H, NH), 7.42-7.41 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.35-7.17 (m, 8H, 8 x Ar-H), 4.05 (t, 1H, J = 10.1, H-5), 3.29 (dd, 1H, J = 5.5 和 13.0, H-7), 3.01 (dt, 1H, J = 10.3 和 13.0, HH-6), 2.56 (ddd, 1H, J = 5.6, 10.1 和 13.4, HH-6); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 176.69 (C=O), 174.10 (C=O), 136.56 (C11), 136.01 (2 x Ar-H), 130.13 (Ar-H), 129.66 (2 x Ar-H), 129.28 (C15), 128.72 (2 x Ar-H), 128.01 (Ar-H), 127.32 (2 x Ar-H), 60.59 (C4), 46.32 (C5), 43.70 (C7), 25.51 (C6); IR (油, cm^{-1}) 3226 (w), 2925 (w), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 310 ([M+H], 10), 206 (30), 111 (100); $[C_{18}H_{15}NO_2S]+H$ 计算的准确质

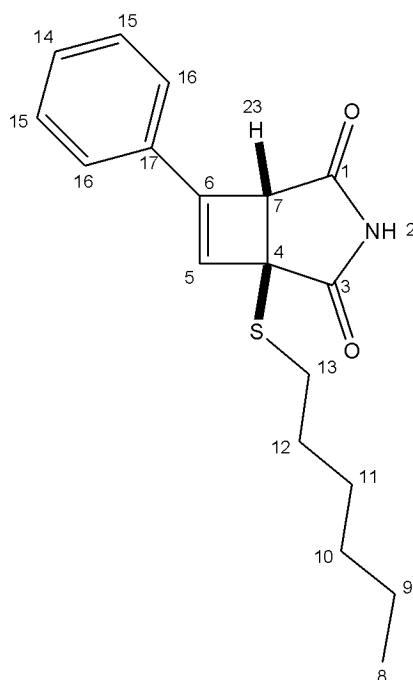
量需要 m/z 310.0902, 测定值 310.0901 (CI+).

[1100] (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-4-苯硫基-5-苯基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

[1101] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 8.24 (s, 1H, NH), 7.43-7.30 (m, 6H, 8 x Ar-H), 7.27-7.24 (m, 2H, 2 x Ar-H), 4.13 (t, 1H, $J = 9.0$, H-5), 3.20-3.13 (m, 2H, HH-6 和 H-7), 2.55 (ddd, 1H, $J = 5.6, 8.3$ 和 13.4 , HH-6); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 177.99 (C=O), 177.17 (C=O), 135.80 (C11), 135.80 (2 x Ar-H), 129.64 (Ar-H), 129.54 (2 x Ar-H), 128.95 (C15), 128.51 (2 x Ar-H), 128.45 (2 x Ar-H), 128.22 (Ar-H), 60.72 (C4), 45.80 (C5), 43.39 (C7), 25.20 (C6); IR (油, cm^{-1}) 3211 (w), 1772 (w) 1707 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 310 ([M+H], 50), 206 (100), 104 (40); $[C_{18}H_{15}NO_2S] + H$ 计算的准确质量需要 m/z 310.0902, 测定值 310.0905 (CI+).

[1102] 比较例 96: (4RS,7RS) 2-氮杂-4-己硫基-二环[3.2.0]庚-5-烯-1,3-二酮的制备

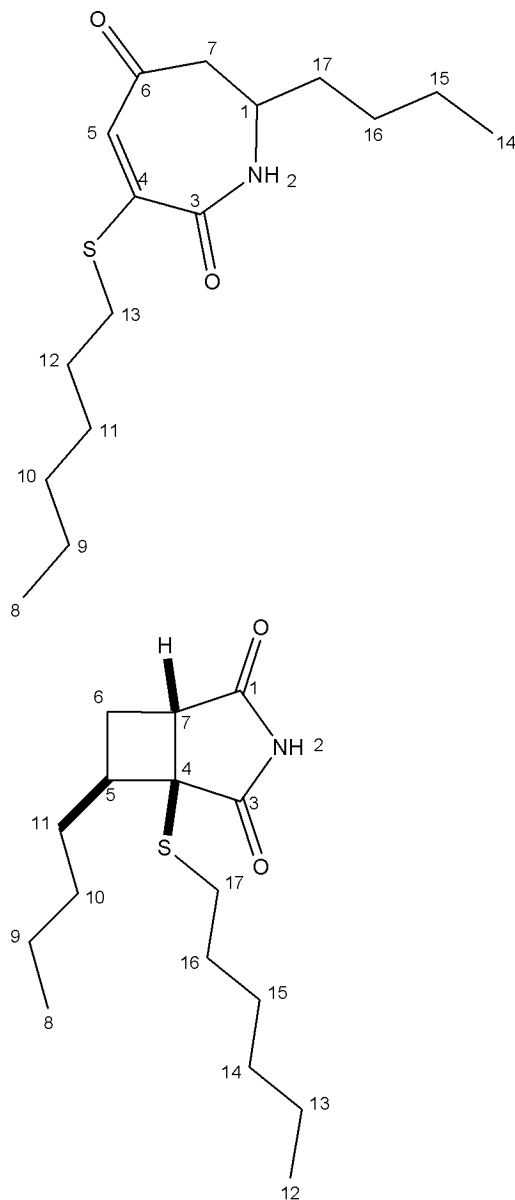
[1103]



[1104] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.12mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯基乙炔 (128 μ L, 1.16mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 30 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到所需的化合物, 其为无色油状物 (4.5mg, 0.014mmol), 产率 18% (基于回收的 SM), 以及伴随的 SM (1.5mg, 0.007mmol), 产率 6%。
 δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 7.86 (s, 1H, NH), 7.68 (d, 2H, $J = 7.86$, 2 x Ar-H), 7.40-7.34 (m, 3H, 3 x Ar-H), 6.58 (s, 1H, H-5), 3.73 (s, 1H, H-7), 2.57 (dt, 1H, $J = 2.3$ 和 7.4 , H_2 -13), 1.77-1.19 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.85 (t, 3H, $J = 7.3$, H_3 -8); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 173.46 (C=O), 173.28 (C=O), 149.72 (C17), 130.25 (C6), 130.02 (C14), 128.85 (2 x Ar-H), 126.32 (2 x Ar-H), 125.76 (C5), 53.78 (C7), 31.33 (CH_2), 29.70 (CH_2), 29.32 (CH_2), 28.61 (CH_2), 22.55 (CH_2), 14.11 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3228 (w), 2925 (m), 1770 (w) 1709 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 316 ([M+H], 100), 214 (30); $[C_{18}H_{22}NO_2S] + H$ 计算的准确质量需要 m/z 316.0371, 测定值 316.1365 (CI+).

[1105] 比较例 97:1-丁基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮和(4RS,5SR,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-丁基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1106]



[1107] 将己硫基马来酰亚胺(25mg,0.116mmol)溶解在乙腈(20.7mL)和己-1-烯(4.3mL,11.6mmol)中以提供0.005M的溶液。得到的溶液脱气30分钟,并在搅拌时在派莱克斯(PYREX)玻璃仪器中照射5分钟。在真空中除去溶剂,通过闪式色谱(梯度洗脱,石油醚至石油醚中30%乙酸乙酯)进行的纯化得到1-丁基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮,其为无色油状物(4mg,0.013mmol),产率12%(伴随(4RS,5SR,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-丁基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮),和(4RS,5SR,7RS)2-氮杂-4-己硫基-5-丁基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮,其为无色油状物(16mg,0.054mmol),产率47%。

[1108] 1-丁基-4-己硫基-1,7-二氢-2H-吡庚因-3,6-二酮

[1109] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 7.29(s, 1H, NH), 6.43(s, 1H, H-5), 2.91-2.76(m, 3H, H-1 和 H_2 -17), 2.70(dd, 1H, $J = 1.4$ 和 5.8, HH-7), 2.64(dd, 1H, $J = 1.4$ 和 7.9, HH-7), 2.49(t,

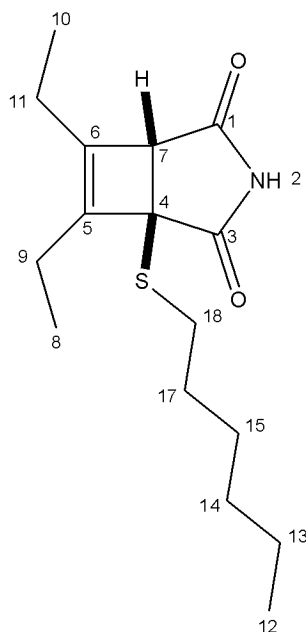
1H, $J = 7.4$, H₂-13), 1.81-1.25 (m, 12H, 6 x CH₂), 0.93-0.85 (m, 6H, H₃-8 和 H₃-14); δ_c (150MHz, CDCl₃) 174.39 (C=O), 171.40 (C=O), 148.19 (C4), 129.28 (C5), 43.90 (C1), 34.97 (CH₂), 31.53 (CH₂), 30.60 (CH₂), 29.70 (CH₂), 29.07 (CH₂), 28.76 (CH₂), 28.51 (CH₂), 22.66 (CH₂), 22.65 (CH₂), 14.16 (CH₃), 14.13 (CH₃); IR (油, cm⁻¹) 3226 (w), 2927 (m) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 298 ([M+H], 80), 187 (100); [C₁₆H₂₇NO₂S]+H 计算的准确质量需要 m/z 298.1841, 测定值 298.1841 (CI+).

[1110] (4RS,5SR,7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-丁基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮

[1111] δ_H (600MHz, CDCl₃) 8.19 (s, 1H, NH), 3.09 (dd, 1H, $J = 4.5$ 和 10.2, H-7), 2.70-2.64 (m, 1H, H-5), 2.53-2.45 (m, 2H, H₂-17), 2.37-2.28 (m, 2H, H₂-6), 1.80-1.73 (m, 1H, HH-11), 1.59-1.50 (m, 2H, HH-11 和 HH-10), 1.38-1.20 (m, 11H, HH-10 和 5 x CH₂), 0.90 (t, 3H, $J = 7.1$, CH₃), 0.87 (t, 3H, $J = 7.3$, CH₃); δ_c (150MHz, CDCl₃) 178.73 (C=O), 177.81 (C=O), 56.10 (C4), 44.29 (C7), 40.99 (C5), 31.42 (C17), 29.24 (CH₂), 28.99 (CH₂), 28.90 (CH₂), 28.74 (CH₂), 28.73 (CH₂), 27.92 (CH₂), 22.59 (CH₂), 22.58 (CH₂), 14.12 (CH₃), 14.09 (CH₃); IR (油, cm⁻¹) 3209 (w), 2927 (m) 1774 (w), 1711 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 298 ([M+H], 100); [C₁₆H₂₇NO₂S]+H 计算的准确质量需要 m/z 298.1841 测定值 298.1845 (CI+).

[1112] 比较例 98: (4RS,7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5-乙基-6-乙基-二环 [3.2.0] 庚-5-烯-1,3-二酮的制备

[1113]

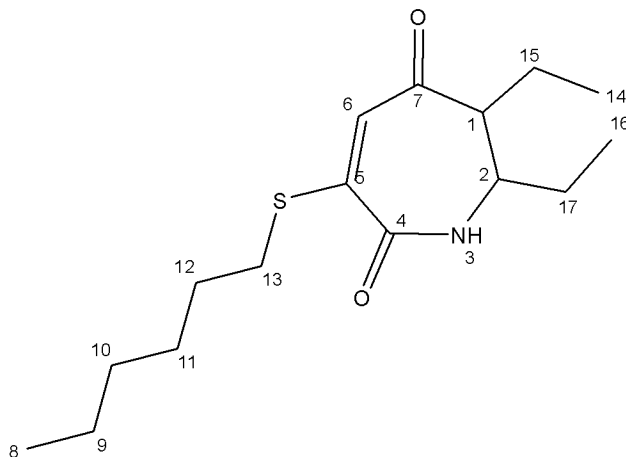


[1114] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.116mmol) 溶解在乙腈 (21.1mL) 和己-3-炔 (3.9mL, 11.6mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到所需的化合物, 其为无色油状物 (17mg, 0.057mmol), 产率 49%。 δ_H (600MHz, CDCl₃) 8.26 (s, 1H, NH), 3.88 (s, 1H, H-7), 2.99 (ddd, 1H, $J = 7.5, 9.1$ 和 12.8, HH-18), 2.87 (ddd, 1H, $J = 5.1, 8.7$ 和 12.9, HH-18), 2.39-2.20 (m, 2H, HH-9 和 HH-11), 1.95-1.75 (m, 2H, HH-9 和 HH-11), 1.56-1.10 (m, 8H, 4 x CH₂), 0.90-0.86 (m, 9H, H₃-8, H₃-10 和 H₃-12); δ_c (150MHz, CDCl₃) 172.66 (C=O), 171.34 (C

= 0), 148.84 (C = C), 142.53 (C = C), 70.45 (C4), 48.86 (C18), 48.09 (C7), 31.45 (CH₂), 28.51 (CH₂), 23.53 (CH₂), 22.50 (CH₂), 21.89 (CH₂), 21.62 (CH₂) 14.09 (C12), 12.03 (CH₃), 11.84 (CH₃); IR (油, cm⁻¹) 2931 (m) 1717 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 312 ([M+OH], 100), 178 (100); [C₁₆H₂₅NO₂S]+OH 计算的准确质量需要 m/z 312.1633, 测定值 312.1648 (CI+).

[1115] 比较例 99: 1-乙基-2-乙基-6-己硫基-1,2-二氢-3H-吡庚因-4,7-二酮的制备

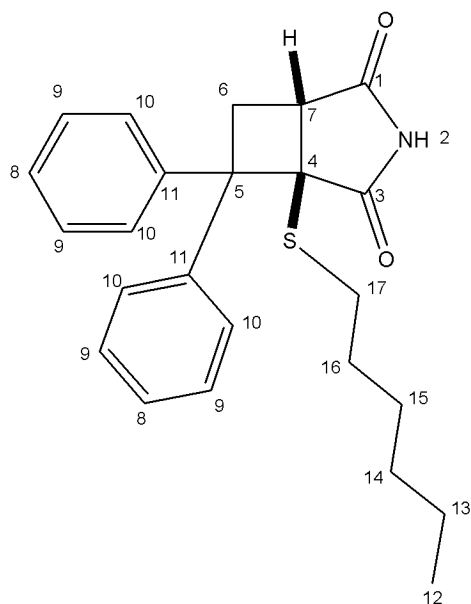
[1116]



[1117] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.116mmol) 溶解在乙腈 (21.1mL) 和反己-3-烯 (3.9mL, 11.6mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到所需的化合物, 其为无色油状物 (2mg, 0.007mmol), 产率 6%。δ_H (600MHz, CDCl₃) 7.32 (s, 1H, NH), 6.49 (s, 1H, H-6), 2.92 (ddd, 1H, J = 4.6, 6.3 和 10.8, H-1), 2.83 (ddd, 1H, J = 5.2, 9.4 和 12.8, HH-13), 2.75 (dd, 1H, J = 5.9 和 10.9, H-2), 2.62 (ddd, 1H, J = 6.7, 9.6 和 12.7 HH-13), 2.07-2.00 (m, 1H, HH-17), 1.89-1.83 (m, 1H, HH-15), 1.79-1.40 (m, 6H, HH-15, HH-17 和 2 x CH₂), 1.33-1.30 (m, 4H, 2 x CH₂), 1.10 (t, 3H, J = 7.5, H₃-16), 0.92 (t, 3H, J = 7.4, CH₃), 0.89 (t, 3H, J = 7.0, CH₃); δ_C (150MHz, CDCl₃) 171.00 (C = O), 169.53 (C = O), 149.76 (C5), 129.27 (C6), 62.54 (C2), 51.16 (C13), 40.42 (C1), 31.48 (CH₂), 28.65 (CH₂), 23.65 (CH₂), 23.32 (CH₂), 22.52 (CH₂), 17.23 (C17) 14.11 (CH₃), 13.96 (CH₃), 12.33 (CH₃); IR (油, cm⁻¹) 2962 (m) 1717 (s); MS (CI+) m/z (相对强度): 314 ([M+OH], 75), 180 (100); [C₁₆H₂₆NO₂S]+OH 计算的准确质量需要 m/z 314.1790, 测定值 314.1799 (CI+).

[1118] 比较例 100: (4RS, 7RS) 2-氮杂-4-己硫基-5,5-二苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

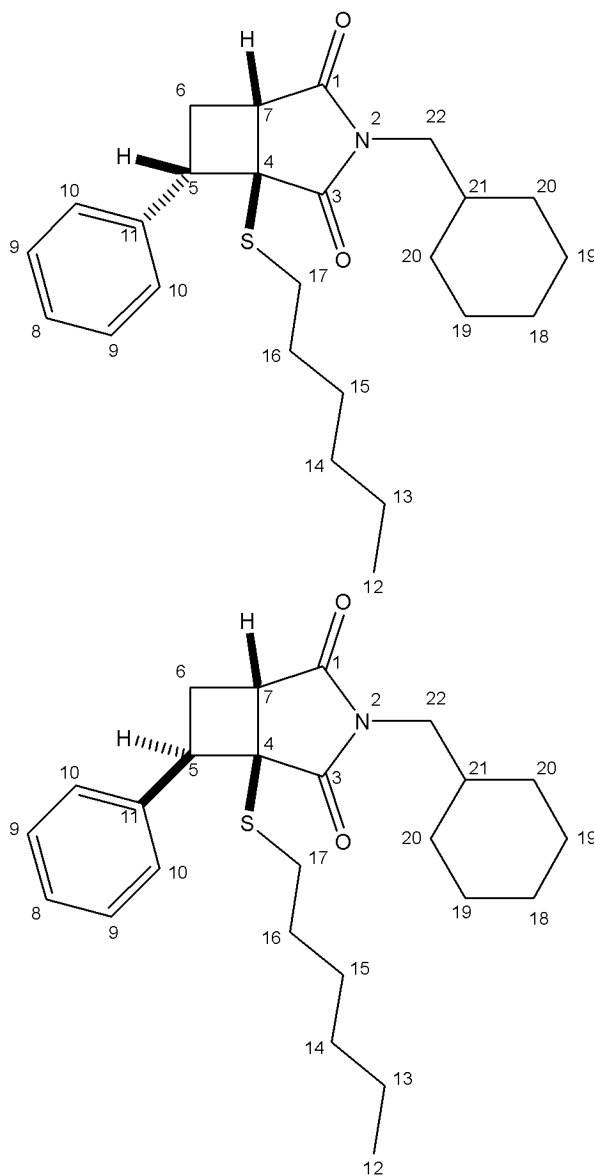
[1119]



[1120] 将己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.116mmol) 溶解在乙腈 (21mL) 和 1,1-二苯乙烯 (203 μ L, 1.16mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟,并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂,通过闪式色谱 (梯度洗脱,石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到所需的化合物,其为无色油状物 (30mg, 0.075mmol),产率 64%。 δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.15 (s, 1H, NH), 7.42 (m, 2H, 2 x H-8), 7.36-7.21 (m, 8H, 8 x Ar-H), 3.54 (dd, 1H, $J = 10.3$ 和 12.9 , HH-6), 3.34 (dd, 1H, $J = 5.7$ 和 10.3 , H-7), 3.18 (dd, 1H, $J = 5.8$ 和 12.9 , HH-6), 2.43 (dt, 1H, $J = 7.3$ 和 11.0 , HH-17), 2.34 (dt, 1H, $J = 7.4$ 和 11.0 , HH-17), 1.40-1.34 (m, 2H, H_2 -16), 1.26-1.20 (m, 4H, H_2 -14 和 H_2 -15), 1.18-1.13 (m, 2H, H_2 -13), 0.84 (t, 3H, $J = 7.5$, H_3 -12); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 177.16 (C = O), 175.87 (C = O), 142.09 (2 x Ar), 141.80 (2 x Ar), 128.17 (2 x Ar-H), 128.13 (2 x Ar-H), 128.10 (2 x Ar-H), 128.06 (2 x Ar-H), 127.44 (Ar-H), 127.32 (Ar-H), 63.03 (C5), 57.20 (C4), 44.38 (C7), 35.17 (C6), 31.35 (CH_2), 30.07 (C17), 28.77 (CH_2), 28.71 (CH_2), 22.53 (CH_2), 14.11 (C12); IR (油, cm^{-1}) 2927 (m), 1772 (w), 1709 (s); MS (ES-) m/z (相对强度): 392 ([M], 10), 212 (100); $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{S}]$ 计算的准确质量需要 m/z 392.1684, 测定值 392.1674 (ES-)。

[1121] 比较例 101: (4RS, 5RS, 7RS) 2-氮杂-2-亚甲基环己烷-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5SR, 7RS) 2-氮杂-2-亚甲基环己烷-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1122]



[1123] 将N-亚甲基己硫基马来酰亚胺 (25mg, 0.116mmol) 溶解在乙腈 (21mL) 和 1,1-二苯乙烯 (203 μ L, 1.16mmol) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟,并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 5 分钟。在真空中除去溶剂,通过闪式色谱 (梯度洗脱,石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-2-亚甲基环己烷-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS,5SR,7RS) 2-氮杂-2-亚甲基环己烷-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮,其为无色油状物 (30mg, 0.075mmol),是非对映异构体的混合物 (10 : 1),产率为 64%。

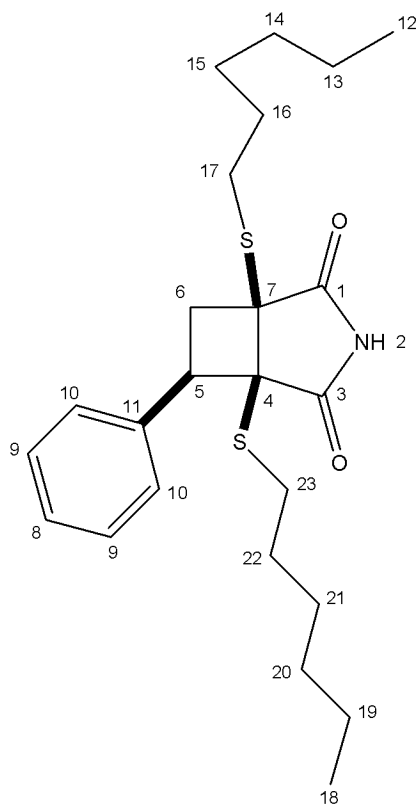
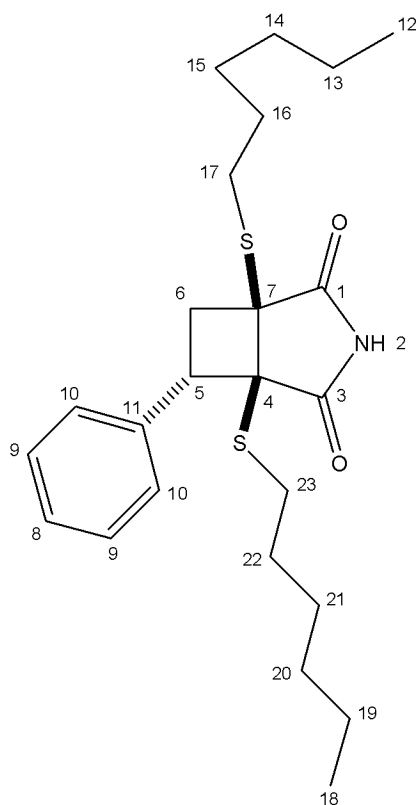
[1124] (4RS,5RS,7RS) 2-氮杂-2-亚甲基环己烷-4-己硫基-5-苯基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮为黑体

[1125] δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 7.39-7.29 (m, 5.2H, 5 x Ar-H and 0.2 x Ar-H), 7.24 (d, 0.1H, $J = 7.4$, H-8), 7.16 (d, 2H, $J = 7.4$, 0.2 x H-10), 4.00 (dd, 0.1H, $J = 8.2$ 和 9.9, H-5), 3.89 (t, 1H, $J = 8.7$, H-5), 3.46 (d, 2.2H, $J = 7.5$, H_2 -22 和 H_2 -22), 3.19 (dd, 0.1H, $J = 5.1$ 和 10.5, H-7), 3.12 (dd, 1H, $J = 3.5$ 和 10.9, H-7), 3.07 (td, 0.1H, $J = 10.5$ 和 13.1, HH-6), 3.00 (ddd, 1H, $J = 8.5$, 11.5 和 12.6, HH-6), 2.64 (ddd, 0.1H, $J = 6.9$, 11.4 和 14.8,

HH-17), 2.56(td, 0.1H, $J = 6.9$ 和 11.6 , HH-6), 2.53(ddd, 1H, $J = 3.3, 9.1$ 和 12.9 , HH-6), 2.48(ddd, 0.1H, $J = 5.4, 8.0$ 和 13.2 , HH-17), 2.39(td, 1H, $J = 7.4$ 和 11.4 , HH-17), 2.08(td, 1H, $J = 7.7$ 和 11.4 , HH-17), 1.83-0.99(m, 2H, 20.9H), 0.87(t, 3H, $J = 7.0$, H₃-12), 0.82(t, 3H, $J = 7.5$, H₃-12); δ_c (150MHz, CDCl₃) 179.12(C=O), 178.35(C=O), 178.15(C=O), 175.41(C=O), 137.23(C11), 137.12(C11), 129.08(2 x Ar-H), 128.76(2 x Ar-H), 128.47(2 x Ar-H), 128.16(C8), 127.99(C8), 127.51(2 x Ar-H), 55.84(C4), 55.69(C4), 48.06(C5), 45.97(C5), 45.63(C22), 45.48(C22), 42.94(C7), 42.83(C7), 36.67(C21), 36.58(C21), 31.64(CH₂), 31.49(CH₂), 31.08(CH₂), 31.01(CH₂), 30.96(CH₂), 30.34(CH₂), 30.04(CH₂), 29.67(CH₂), 29.28(CH₂), 28.98(CH₂), 28.82(CH₂), 26.76(CH₂), 26.63(CH₂), 26.52(CH₂), 26.45(CH₂), 25.96(CH₂), 25.94(CH₂), 25.82(CH₂), 14.34(C12), 14.31(C12) 一些碳信号由于非对映异构体的重叠而缺失; IR(油, cm⁻¹) 2925(m) 1703(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 414([M+H], 100), 309(20); [C₂₅H₃₅NO₂S]+H 计算的准确质量需要 m/z 414.2461, 测定值 414.2452(CI+)。

[1126] 比较例 102: (4RS, 5SR, 7SR) 2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-7-己硫基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5RS, 7SR) 2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-7-己硫基-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的制备

[1127]



[1128] 将 2,3 二己硫基马来酰亚胺 (38mg, 0.115mmol) 溶解在乙腈 (25mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (133 μ L, 1.2mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 20 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4R,5R,7R)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯

基-7-己硫基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮,其为无色油状物(3mg,0.007mmol),产率6%,和(4RS,5RS,7SR)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-7-己硫基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮,其为无色油状物(3mg,0.007mmol),产率6%。

[1129] (4RS,5SR,7SR)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-7-己硫基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

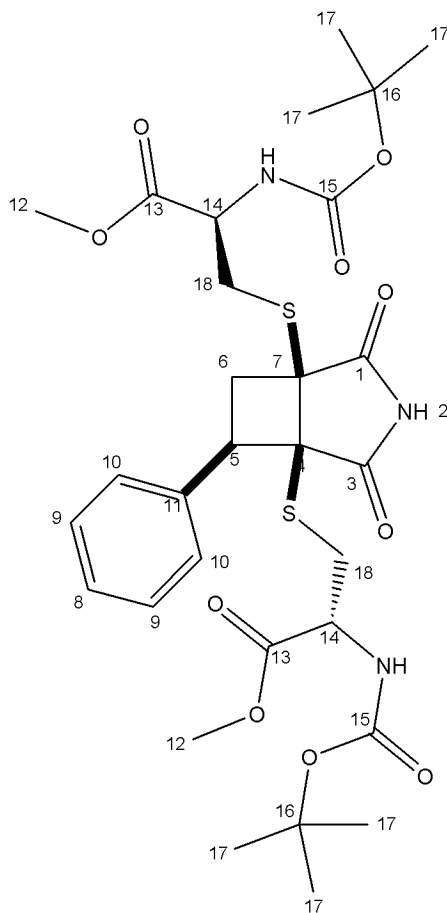
[1130] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 7.96(s, 1H, NH), 7.33(d, 2H, $J = 7.0$, 2 x Ar-H), 7.28(t, 1H, $J = 7.0$, H-8), 7.21(d, 2H, $J = 7.5$, 2 x Ar-H), 4.02(t, 1H, $J = 10.0$, H-5), 2.98-2.92(m, 2H, HH-6 和 -S-CHH-), 2.87(dd, 1H, $J = 10.8$ 和 13.6, HH-6), 2.83-2.72(m, 2H, -S-CHH- 和 -S-CHH-), 2.69(dt, 1H, $J = 7.4$ 和 10.8, -S-CHH-) 1.68-1.57(m, 4H, H_2 -16 和 H_2 -22), 1.45-1.31(m, 4H, H_2 -15 和 H_2 -21), 1.31-1.25(m, 8H, H_2 -13, H_2 -14, H_2 -19 和 H_2 -20), 0.86(t, 6H, $J = 7.0$, H_3 -12 和 H_3 -18); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 176.91(C=O), 172.96(C=O), 136.09(C11), 128.83(2 x Ar-H), 128.13(C8), 127.41(2 x Ar-H), 62.86(C4), 54.36(C7), 46.49(C5), 33.28(C6), 31.51(CH_2), 31.47(CH_2), 30.65(SCH_2), 30.09(SCH_2), 29.22(CH_2), 28.96(CH_2), 28.80(CH_2), 28.74(CH_2), 22.63(CH_2), 22.60(CH_2), 14.17(CH_3), 14.15(CH_3); IR(油, cm^{-1}) 3194(w), 2928(m) 1774(w), 1722(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 432([M-H], 5), 332(50), 316(95), 207(100); $[\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_2\text{S}_2]$ -H 计算的准确质量需要 m/z 432.2026, 测定值 432.2029(CI+)。

[1131] (4RS,5RS,7SR)-2-氮杂-4-己硫基-5-苯基-7-己硫基-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮

[1132] δ_{H} (600MHz, CDCl_3) 8.10(s, 1H, NH), 7.41(d, 2H, $J = 6.9$, 2 x Ar-H), 7.37(t, 1H, $J = 6.9$, H-8), 7.33(d, 2H, $J = 6.9$, 2 x Ar-H), 3.92(t, 1H, $J = 8.9$, H-5), 2.95(dd, 1H, $J = 8.9$ 和 12.9, HH-6), 2.86(dt, 1H, $J = 6.9$ 和 14.2, -S-CHH-), 2.78-2.66(m, 2H, HH-6 和 -S-CHH-), 2.60(ddd, 1H, $J = 6.3$, 8.3 和 10.9, -S-CHH-) 2.00(ddd, 1H, $J = 5.6$, 8.6 和 10.7, -S-CHH-), 1.65-1.60(m, 2H, HH-16 和 HH-22), 1.43-1.06(m, 14H, HH-16, HH-22, H_2 -13, H_2 -14, H_2 -15, H_2 -19, H_2 -20 和 H_2 -21), 0.88(t, 3H, $J = 6.7$, CH_3), 0.82(t, 3H, $J = 7.1$, CH_3); δ_{C} (150MHz, CDCl_3) 176.59(C=O), 176.44(C=O), 136.03(C11), 129.50(2 x Ar-H), 128.83(C8), 128.29(2 x Ar-H), 62.32(C4), 54.58(C7), 45.33(C5), 34.85(C6), 31.48(CH_2), 31.33(CH_2), 30.51(CH_2), 29.21(CH_2), 29.06(CH_2), 28.90(CH_2), 28.76(CH_2), 28.53(CH_2), 22.62(CH_2), 22.50(CH_2), 14.16(CH_3), 14.11(CH_3); IR(油, cm^{-1}) 3215(w), 2926(m) 1774(w), 1715(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 432([M-H], 5), 329(60), 207(100), 161(60); $[\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_2\text{S}_2]$ -H 计算的准确质量需要 m/z 432.2026, 测定值 432.2034(CI+)。

[1133] 实施例 40: (4RS,5RS,7SR)-2-氮杂-4-(N-Boc-Cys-OMe)-5-苯基-7-(N-Boc-Cys-OMe)-二环[3.2.0]庚烷-1,3-二酮的制备

[1134]



[1135] 将 2,3-二-(N-Boc-Cys-OMe)-马来酰亚胺 (76mg, 0.135mmol) 溶解在乙腈 (29mL) 中以提供 0.005M 的溶液。得到的溶液脱气 30 分钟, 加入苯乙烯 (148 μ L, 1.35mmol), 并在搅拌时在派莱克斯 (PYREX) 玻璃仪器中照射 30 分钟。在真空中除去溶剂, 通过闪式色谱 (梯度洗脱, 石油醚中 10% 乙酸乙酯至石油醚中 30% 乙酸乙酯) 进行的纯化得到 (4RS, 5RS, 7SR) 2-氮杂-4-(N-Boc-Cys-OMe)-5-苯基-7-(N-Boc-Cys-OMe)-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5SR, 7SR) 2-氮杂-4-(N-Boc-Cys-OMe)-5-苯基-7-(N-Boc-Cys-OMe)-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮的混合物, 其为无色油状物 (28mg, 0.042mmol), 产率 36%。该混合物的光谱极为复杂, 不过 MS 证实了化合物的身份, 所有的化合物具有相同的质量。(4RS, 5RS, 7SR) 2-氮杂-4-(N-Boc-Cys-OMe)-5-苯基-7-(N-Boc-Cys-OMe)-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮和 (4RS, 5SR, 7SR) 2-氮杂-4-(N-Boc-Cys-OMe)-5-苯基-7-(N-Boc-Cys-OMe)-二环 [3.2.0] 庚烷-1,3-二酮也随 [5+2] 产物分离, 该产物是无色油状物 (46mg)。¹H NMR 和 MS 的数据表明该产物的 40% (质量) 是所需的偶联产物 (18mg, 0.028mmol), 产率 20%。 δ_H (600MHz, $CDCl_3$) 8.32(d, 4.7H, J = 8.7, N-H), 8.05(s, 1.2H, N-H), 7.79(s, 1H, N-H), 7.40-7.20(m, 60H, Ar-H), 5.65(d, 1H, J = 7.2, H-N), 5.57(d, 5.2H, J = 8.2, H-N), 5.45(d, 4.9H, J = 7.3, H-N), 5.40(d, 1.9H, J = 7.8, H-N), 4.92(d, 2.5H, J = 7.3, H-14), 4.74(d, 3.7H, J = 7.8, H-14), 4.62-4.54(m, 8H, H-14), 4.16-4.11(m, 2.7H), 4.09-4.06(m, 3.9H), 3.97-3.9(m, 7.8H), 3.80-3.75(m, 50.5H, H_3 -12), 3.66(s, 22.6H, H_3 -12) 3.47-3.04(m, 41.4, H_2 -18), 2.99-2.94(m, 9.5H, H_2 -18), 2.82-2.73(m, 9.5H, H_2 -18), 1.46-1.42(m, 240H, H_3 -17); δ_C (150MHz, $CDCl_3$) 175.94(C = O), 175.84(C = O), 175.82(C = O), 171.10(C = O), 171.04(C = O), 170.95(C = O),

155.28 (Ar), 129.63 (Ar-H), 129.50 (Ar-H), 128.96 (Ar-H), 128.88 (Ar-H), 128.80 (Ar-H), 128.75 (Ar-H), 128.59 (Ar-H), 128.53 (Ar-H), 128.41 (Ar-H), 80.51 (C16), 80.22 (C16), 52.97 (C12), 52.93 (C12), 52.71 (C14), 52.61 (C14), 45.25 (C5), 32.92 (C18), 32.86 (C18), 31.19 (C18), 31.08 (C18), 29.83 (C6), 28.42 (C17) 一些碳信号由于非对映异构体的重叠而缺失; IR(油, cm^{-1}) 2924(m), 1712(s); MS(CI+) m/z (相对强度): 666 ([M-H], 100); $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}_2]\text{-H}$ 计算的准确质量需要 m/z 666.2155, 测定值 666.2188 (CI+)。

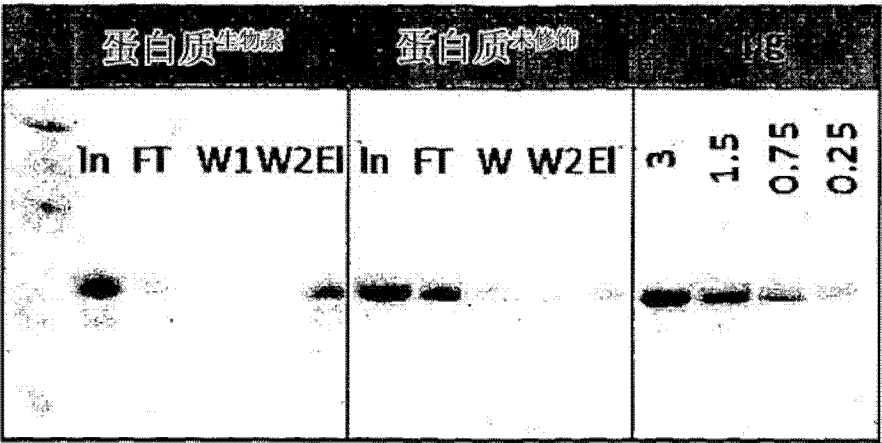


图 1

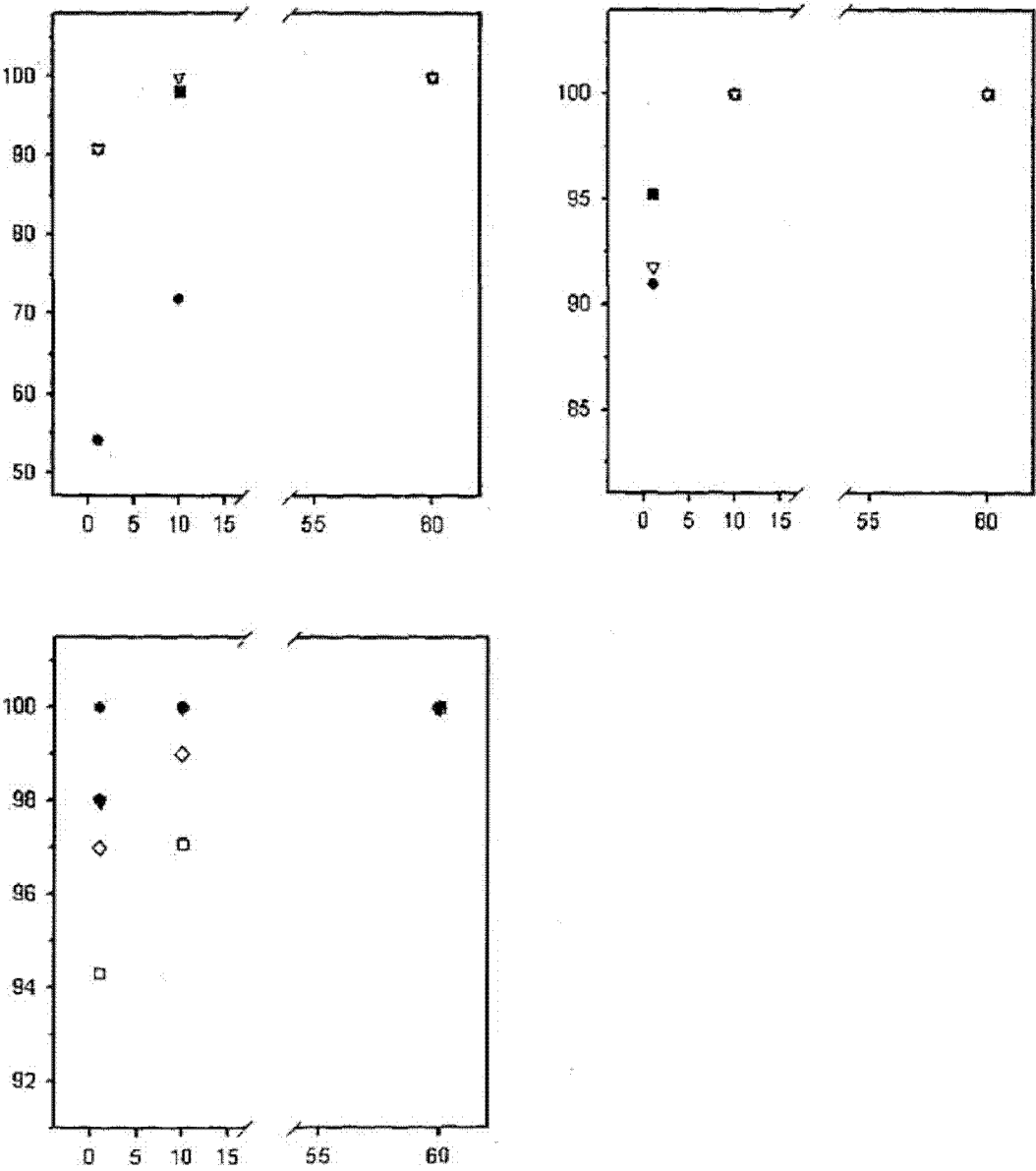


图 2

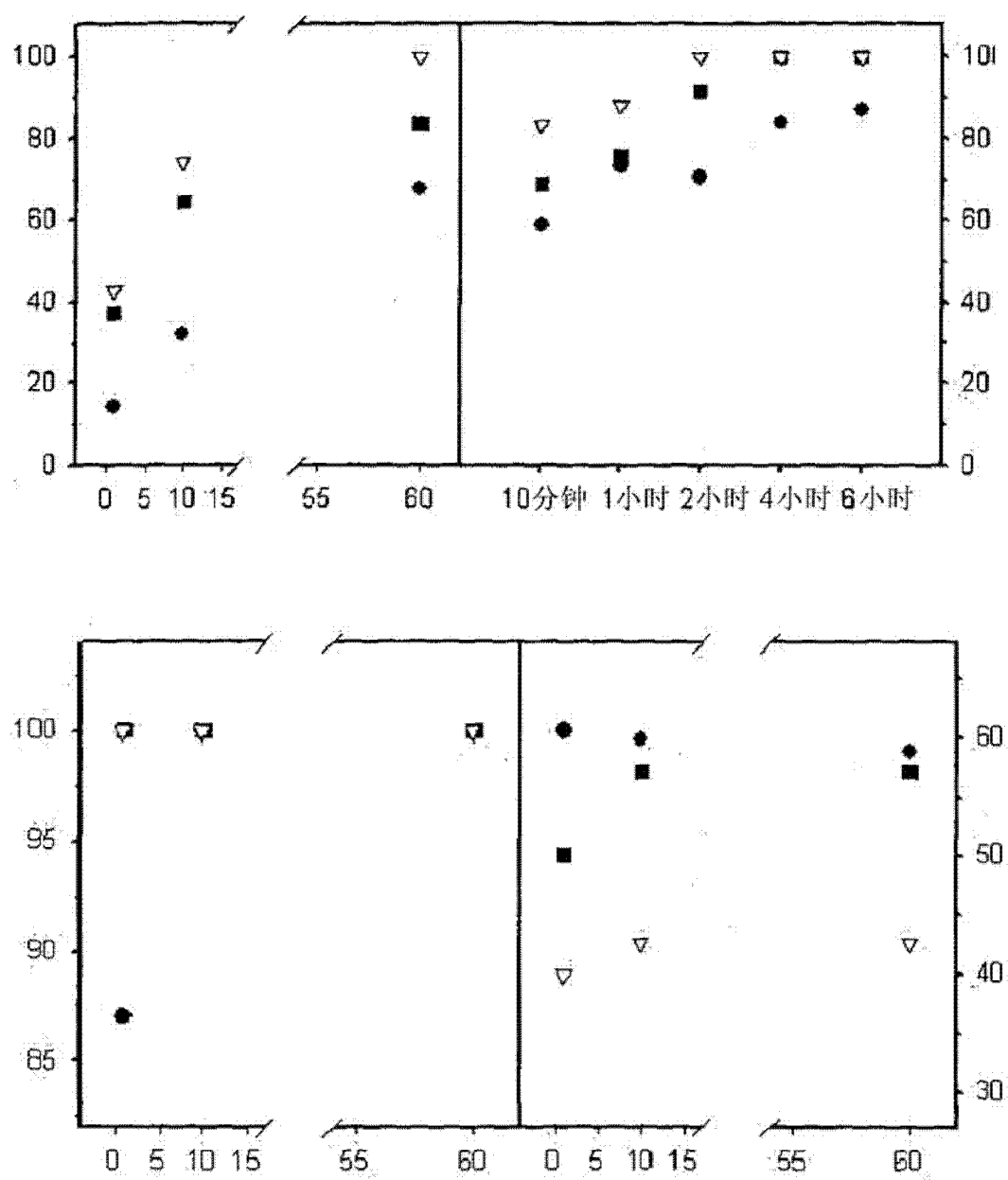


图 3

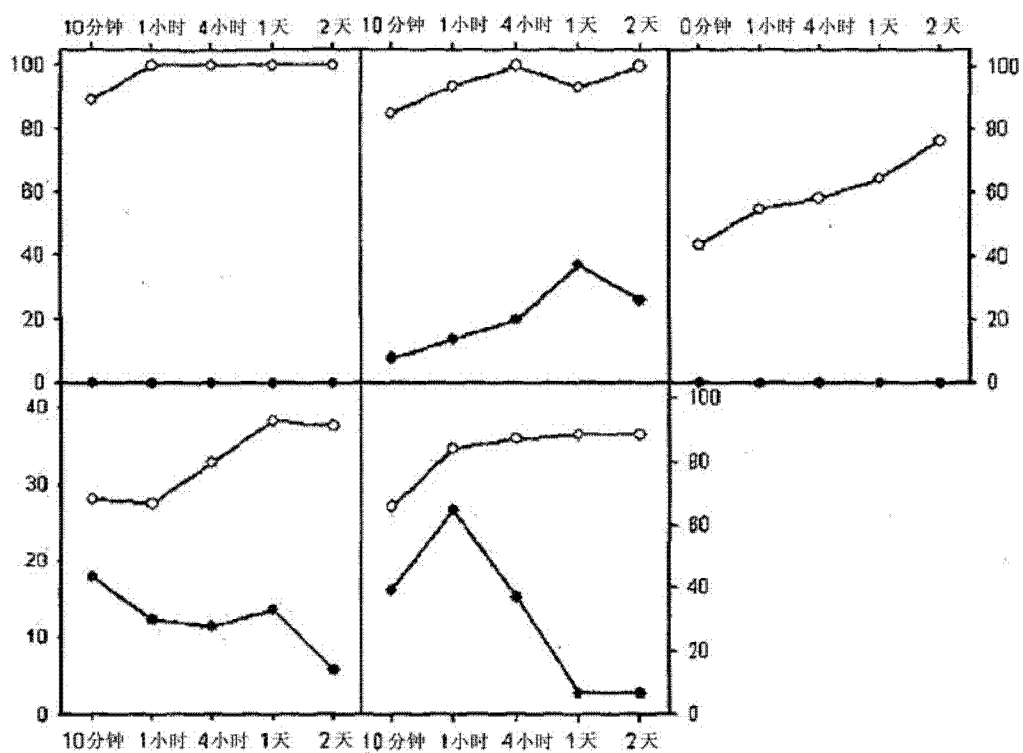


图 4

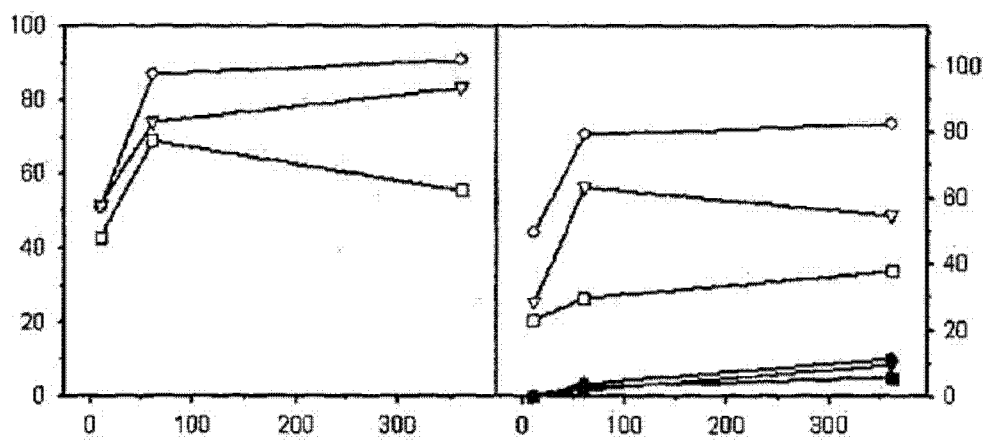


图 5

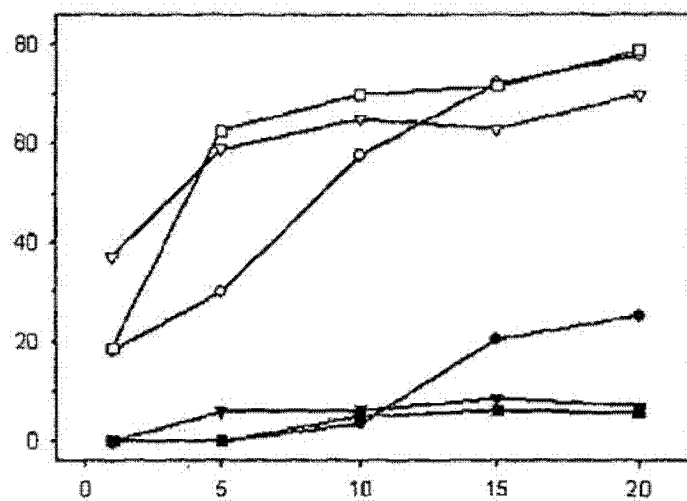


图 6

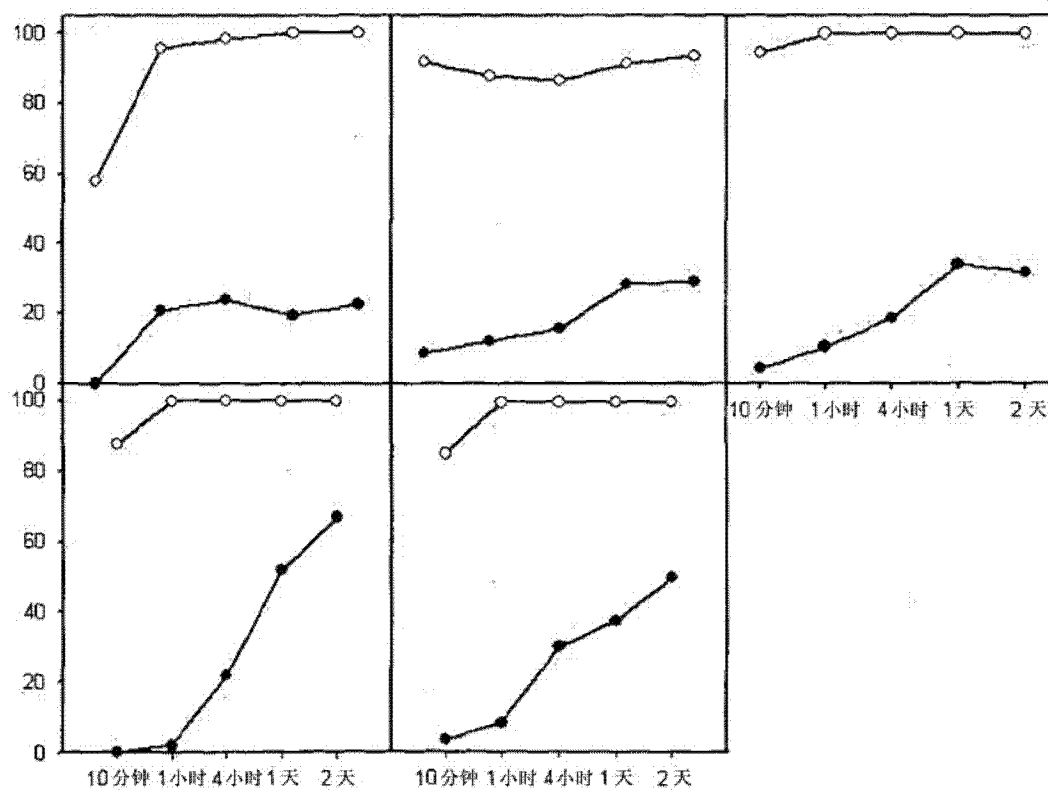


图 7

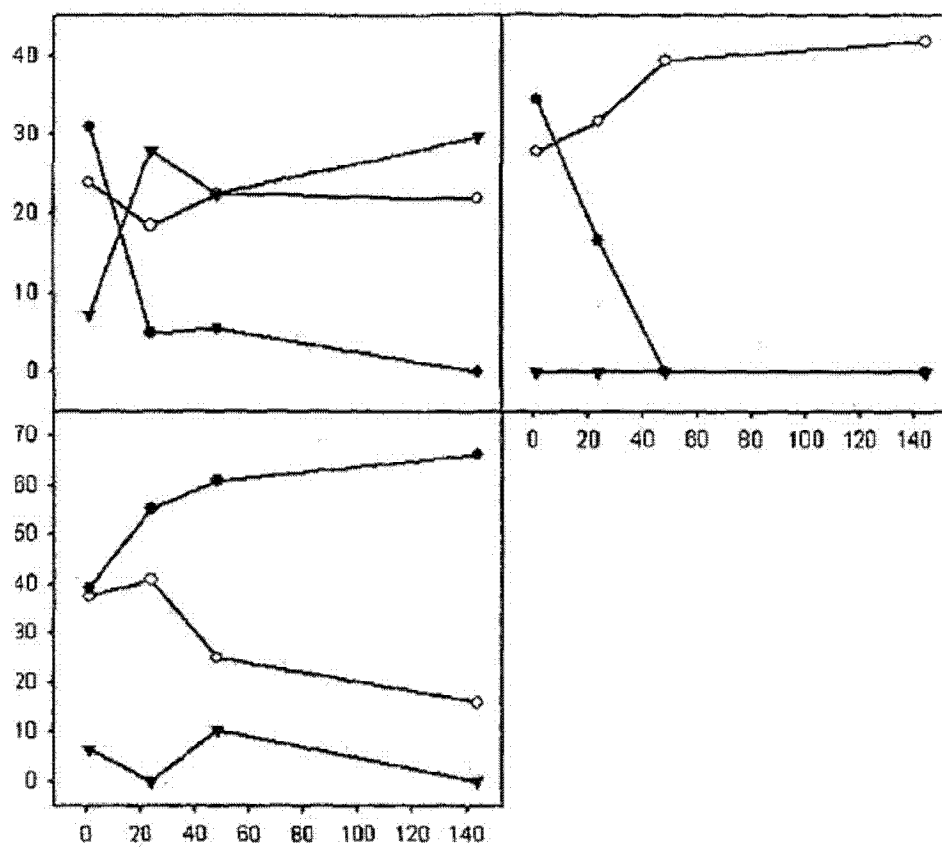


图 8

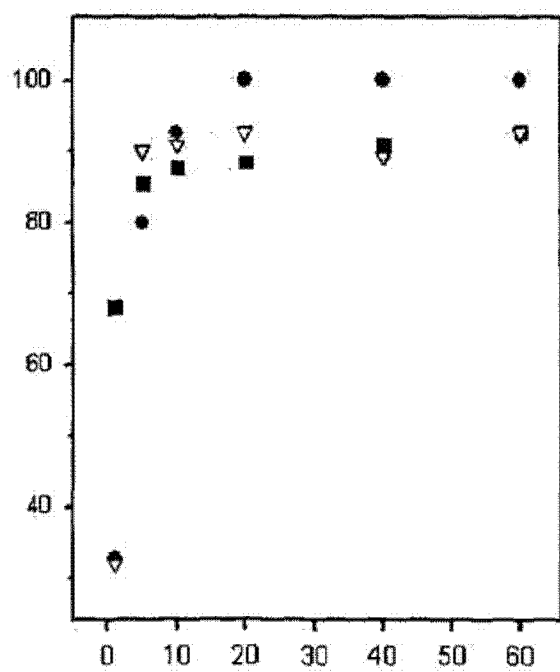


图 9

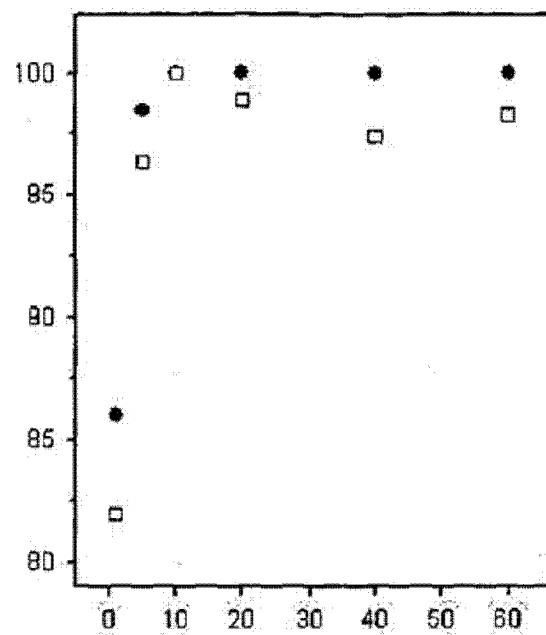


图 10

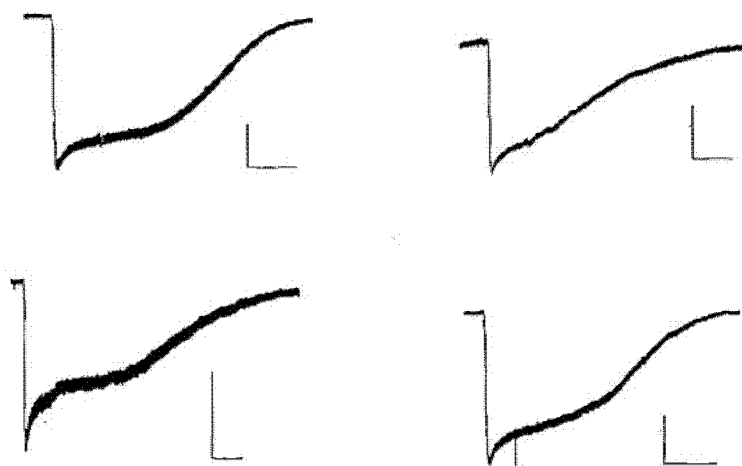


图 11

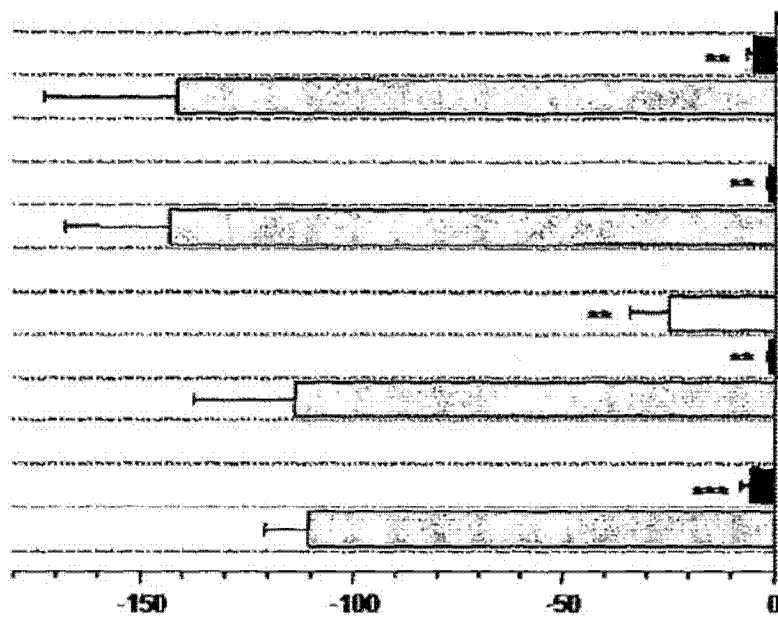


图 12

专利名称(译)	功能性分子的可逆的共价连接		
公开(公告)号	CN102597773A	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201080041653.4	申请日	2010-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	UCL商业有限公司		
申请(专利权)人(译)	UCL商业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	UCL商业有限公司		
[标]发明人	M史密斯 S凯迪克 J贝克		
发明人	M·史密斯 S·凯迪克 J·贝克		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/58		
CPC分类号	A61K49/0017 A61K47/48238 A61K47/48215 C07K14/655 A61K47/48107 A61K47/551 A61K47/60 A61K47/62 A61P1/04 A61P1/08 A61P3/06 A61P5/00 A61P7/02 A61P9/06 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/14 A61P13/00 A61P21/02 A61P23/02 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/22 A61P25/24 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07D207/416 C07D207/456 C07D209/52 Y02P20/55 A61K47/545 C07K14/435 G01N33/58		
优先权	2009013967 2009-08-10 GB 2009013965 2009-08-10 GB 2009014321 2009-08-14 GB		
其他公开文献	CN102597773B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种包含式(I)的结构体的化合物作为连接用试剂的应用，所述连接用试剂将包含式F1的第一功能性结构体的式R1-H的化合物连接至式F2的第二功能性结构体，其中X、X'、Y、R1、F1和F2如本文中所限定。本发明还提供相关的方法和产物。本发明可用于生成功能性的偶联化合物，特别是其中至少一个组成分子具有硫醇基的偶联物。

