



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101796066 A

(43) 申请公布日 2010.08.04

(21) 申请号 200880104909.4

(22) 申请日 2008.06.27

(30) 优先权数据

0713187.3 2007.07.06 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/002222 2008.06.27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/007676 EN 2009.01.15

(71) 申请人 剑桥企业有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 克里斯托弗·罗宾·勒韦

阿比德·侯赛因

迈克尔·路易斯·米马克

乔纳森·迈克尔·黑格

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C07K 5/06 (2006.01)

C07C 309/51 (2006.01)

C07B 61/00 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/04 (2006.01)

C40B 50/14 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书 12 页 说明书 57 页 附图 12 页

(54) 发明名称

生物分子结合配体

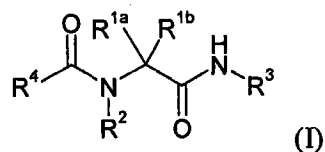
(57) 摘要

本发明提供生物分子结合配体,生物分子结合配体的集合,以及它们在纯化生物混合物中以及在鉴定具有对物质的亲和力的配体中的用途。所述配体是式 (III) 的化合物或式 (IV) 的化合物:其中对于 (I) 的化合物, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢,和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,或,任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环;和对于式 (II) 的化合物, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,并且 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,或,任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两

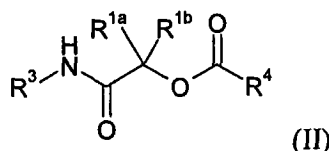
个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环。



1. 一种化合物的集合,其中所述集合的每一个成员独立地是根据式 (I) 或式 (II) 的化合物:



或



其中所述集合包含仅式 (I) 的化合物,仅式 (II) 的化合物,或式 (I) 和式 (II) 的化合物的混合物,并且

对于式 (I) 的化合物

R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢,和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$,其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

或,任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环;和

对于式 (II) 的化合物

R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,并且 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

或,任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环。

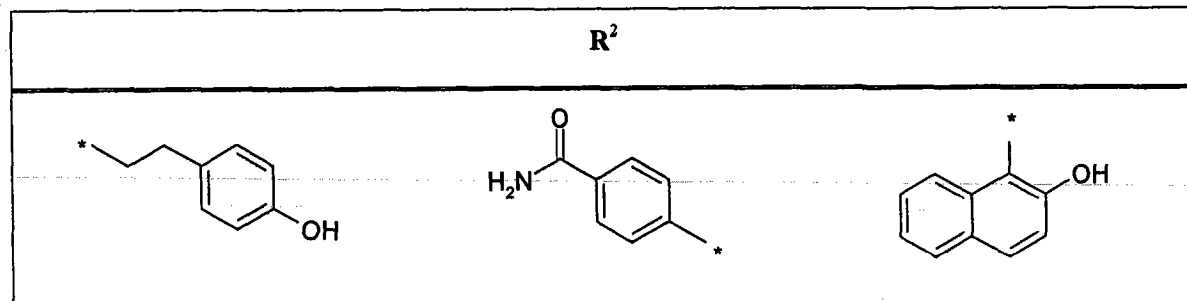
2. 根据权利要求 1 所述的集合,其中 R^{1a} 是包含连接到载体的连接体的取代基。

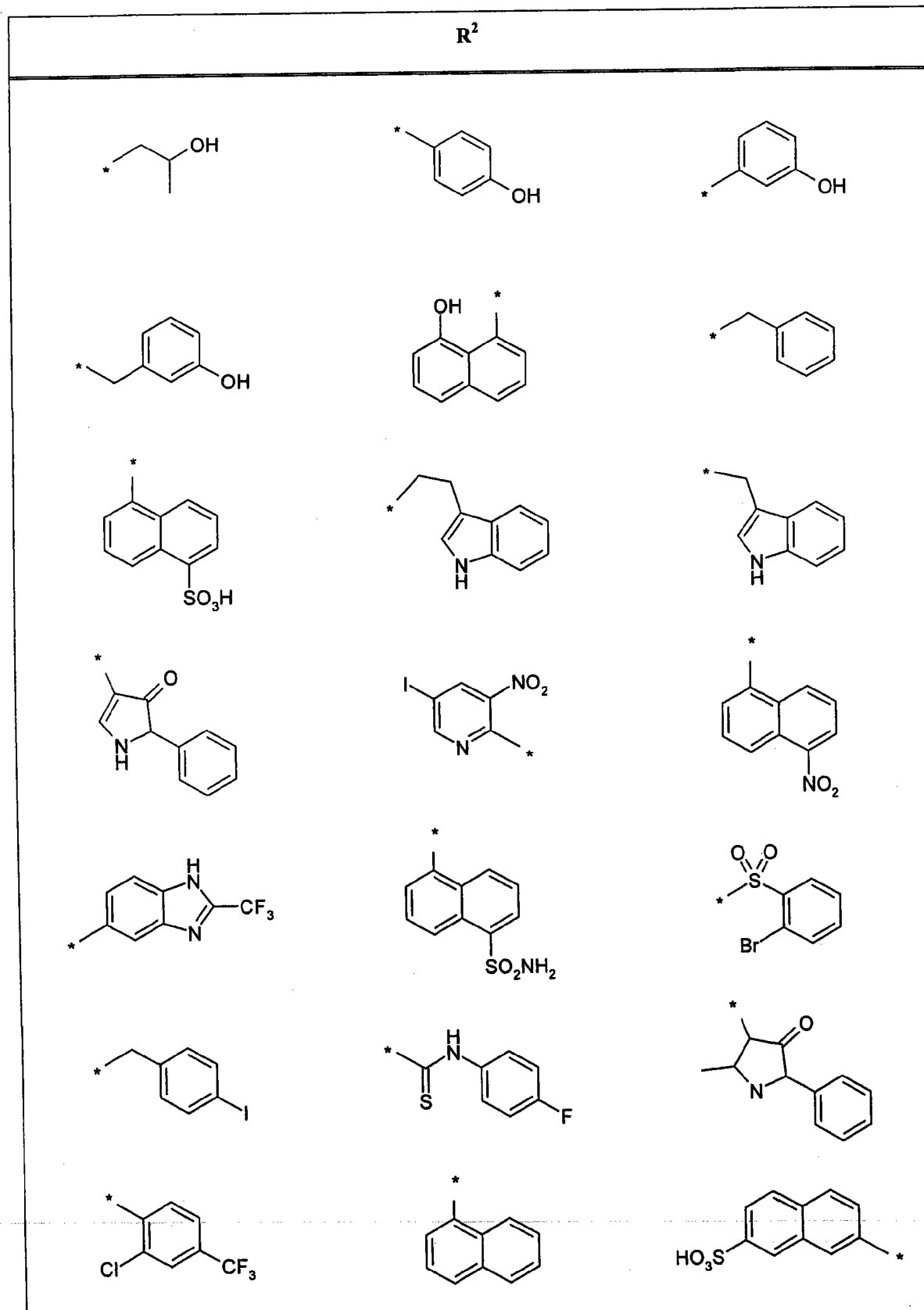
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的集合,其中 R^{1b} 是氢。

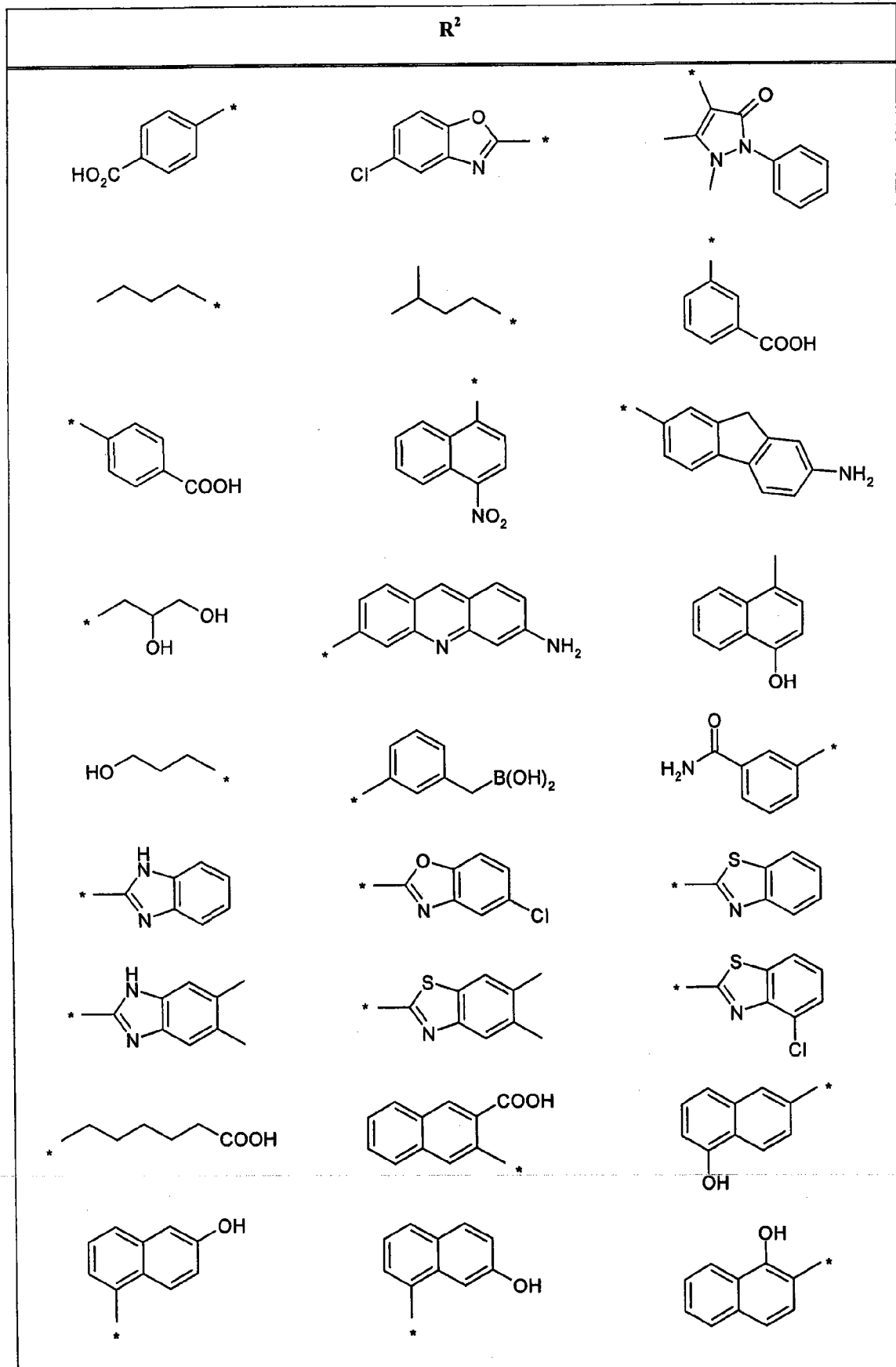
4. 根据前述权利要求中任一项所述的集合,其中所述任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基可以被独立地选自以下组成的组的一个或多个取代基取代:缩醛基,烷基,芳基,半缩醛基,烷氧基,缩酮基,半缩酮基,杂环基,氧代基,硫酮,亚氨基,甲酰基,卤素,羟基,硫代羧基,巯基羧基,亚氨酸,异羟肟酸,硫羧基,醚,硝基,氰基,醚,硝基,亚硝基,叠氮基,氰酰基,异氰酰基,氰硫基,异氰硫基,氰基,酰基,羧基,酯,酰氨基,氨基,胍基,四唑基,亚氨基,脒,酰氨基,脒基,酰氧基,硫醇,二硫化物,硫醚,亚砷,磺酰基,硫代酰氨基,亚磺酰氧基,硫酸酯,亚磺酰氨基,磺酸酯,磺氨基,膦基,二氧膦基,氧膦基,膦酸,膦酸酯,磷酸酯,磷酸,亚磷酸,亚磷酸胺,氨基磷酸酯,甲硅烷基,氧基甲硅烷基,甲硅烷氧基,氧基甲硅烷氧基和磺酰氨基。

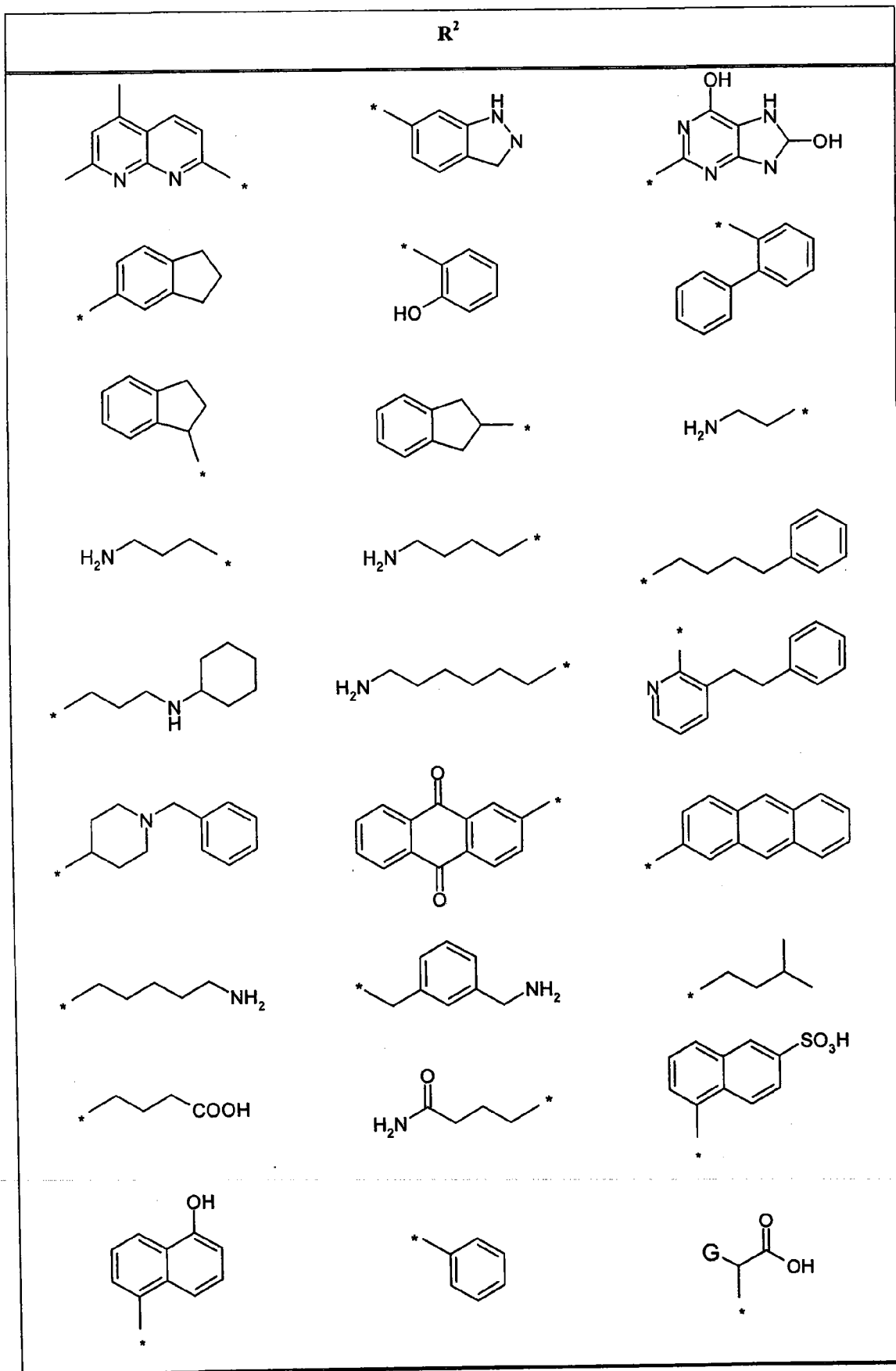
5. 根据权利要求 1 所述的集合,其中所述的任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基可以被独立地选自以下组成的组的一个或多个取代基取代:羟基,烷基,芳基,杂环基,卤素,硝基,磺酸,亚磺酰氨基,氧代,硫酮基,羧基,氨基,硼酸,酰氨基,和硫代酰氨基。

6. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的集合,其中 R^2 选自以下取代基列表:



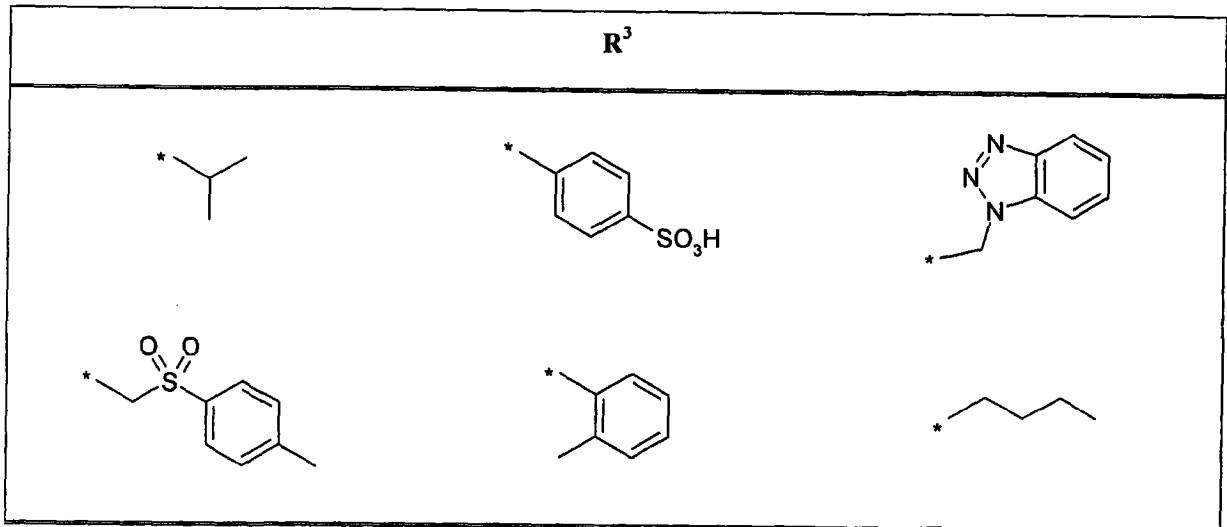






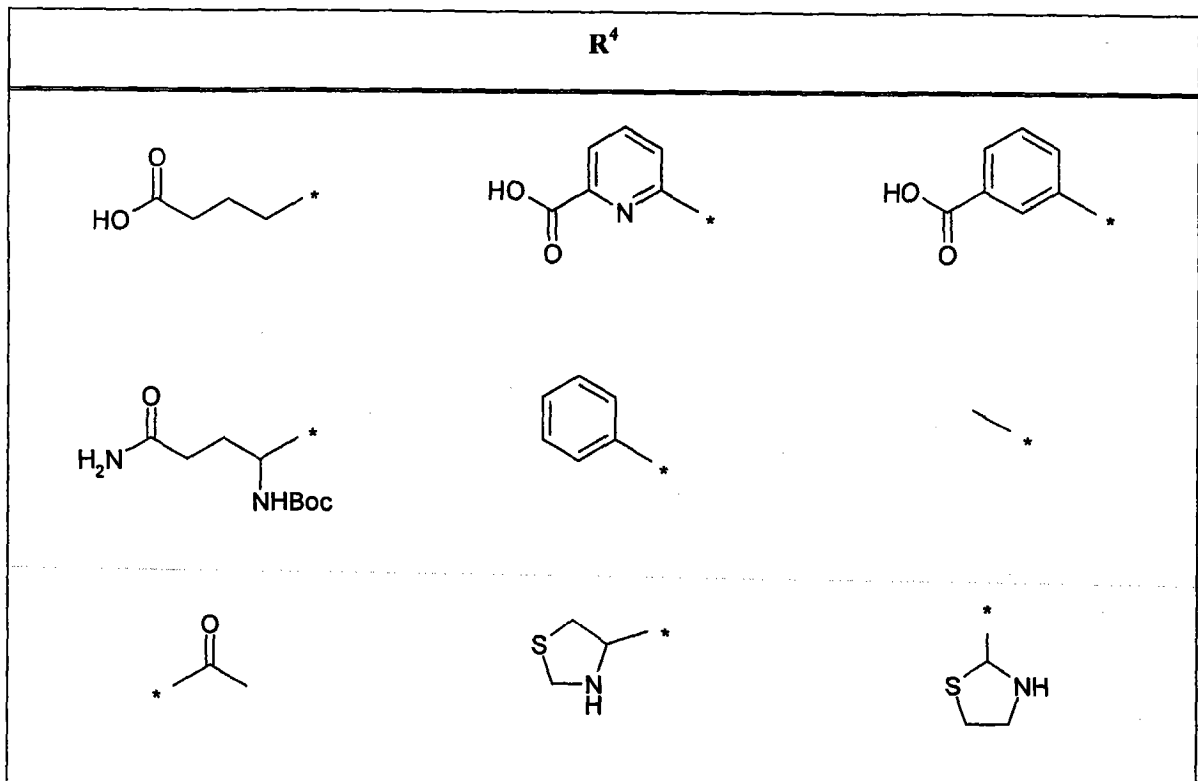
其中星号‘*’表示连接点，并且G表示氨基酸侧链。

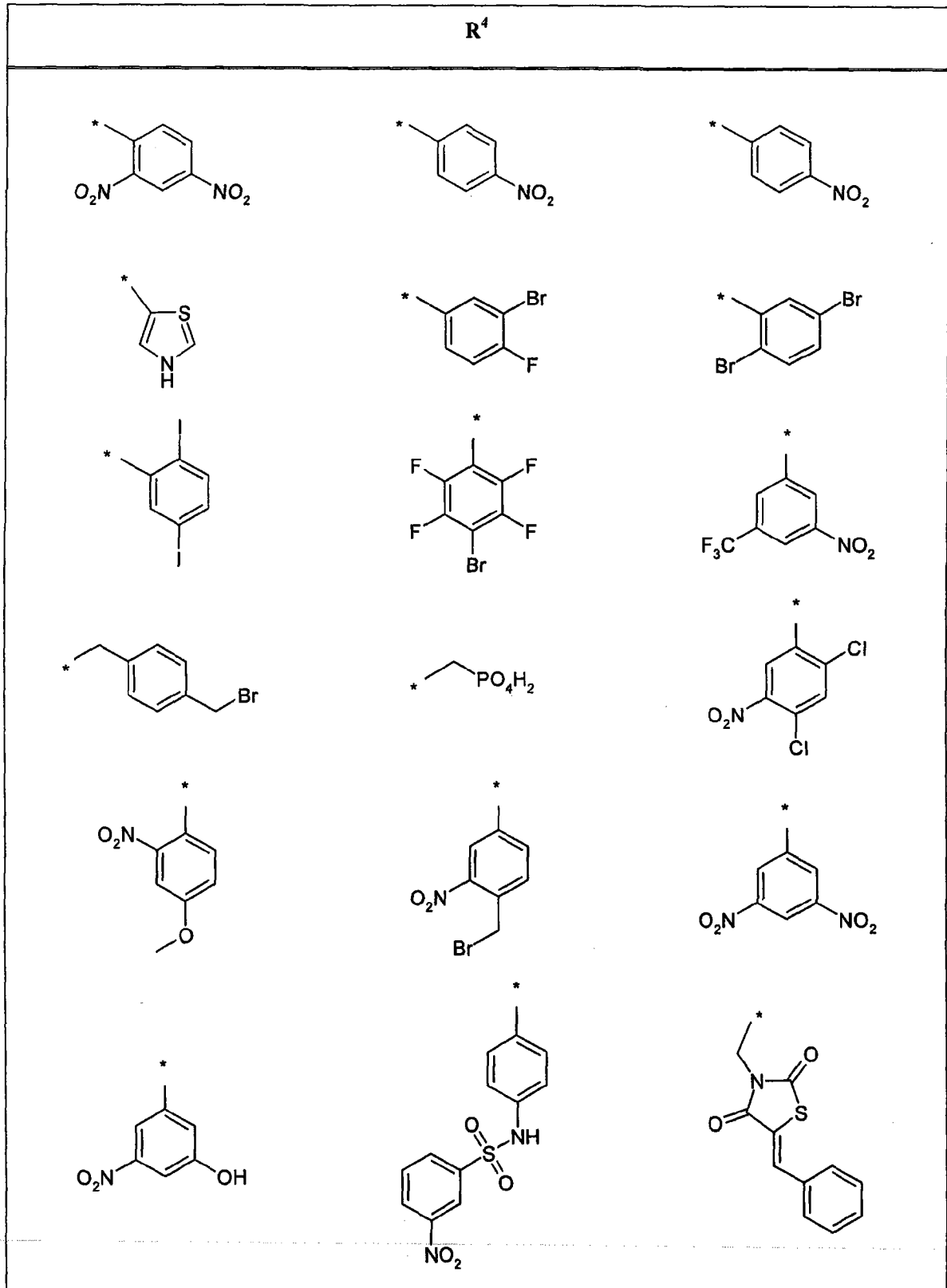
7. 根据权利要求1至3和6中任一项所述的集合，其中R³选自在下表中给出列表：

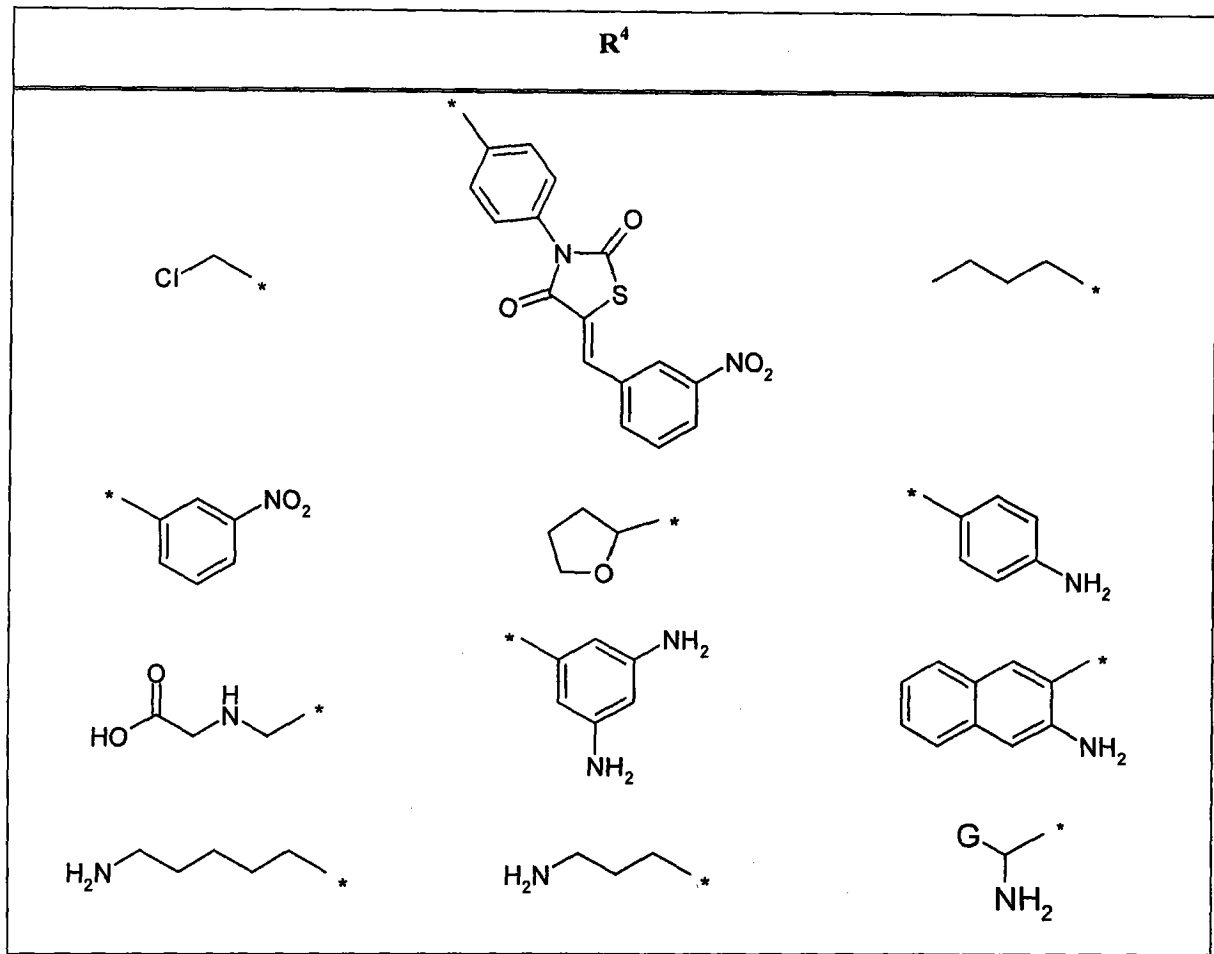


其中星号 ‘*’ 表示连接点。

8. 根据权利要求 1 至 3,6 和 7 中任一项所述的集合,其中 R^4 选自在下表中给出列表:







其中星号‘*’表示连接点，并且G表示氨基酸侧链。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的集合，其中所述式(I)的化合物的 R^{1a} ， R^{1b} ， R^2 ， R^3 和 R^4 中的其它基团或所述式(II)的化合物的 R^{1a} ， R^{1b} ， R^3 和 R^4 中的其它基团选自下组：任选取代的 C_{1-20} 烷基，任选取代的 C_{3-20} 杂环基和任选取代的 C_{5-20} 芳基。

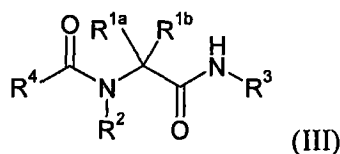
10. 根据权利要求1所述的集合，其中所述式(I)的化合物的 R^{1a} ， R^{1b} ， R^2 ， R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个或所述式(II)的化合物的 R^{1a} ， R^{1b} ， R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起形成任选取代的 C_{5-20} 杂环基。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的集合，其中所述化合物具有分析标记。

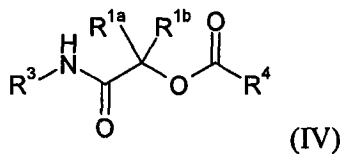
12. 根据前述权利要求中任一项所述的集合，其中所述载体包括玻璃，金，聚苯乙烯，多糖，聚丙烯酰胺或聚(烷氧化物)。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的集合，所述集合具有至少10个成员。

14. 一种式(III)的化合物或式(IV)的化合物：



或



其中对于 (III) 的化合物, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的式 (I) 的化合物所定义,

和对于式 (IV) 的化合物, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 如权利要求 1 至 12 中任一项所述的式 (II) 的化合物所定义。

15. 一种用于从混合物中分离物质的分离设备, 其中所述装置包括根据权利要求 14 所述的式 (III) 的化合物或式 (IV) 的化合物。

16. 根据权利要求 15 所述的分离设备, 其为层析柱形式。

17. 一种用于鉴定具有对物质的亲和力的固定配体的方法, 所述方法包括下列步骤:
得到根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的化合物的集合;
将所述集合中的每一个成员与包含物质的混合物接触; 和
分析所述集合, 以确定所述物质与每一个集合成员结合到什么程度。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述方法还包括将所述集合从所述混合物分离的步骤。

19. 一种用于产生具有对物质的亲和力的化合物的方法, 所述方法包括下列步骤:
得到根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的化合物的集合;
将所述集合中的每一个成员与包含物质的混合物接触;
分析所述集合, 以确定所述物质与每一个集合成员结合到什么程度;
鉴定具有对所述物质的亲和力的文库成员; 和
制备具有基于所述集合成员的结构化合物。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中具有基于所述集合成员的结构所述化合物是:

(i) 通过将被确定与所述物质结合的集合成员的连接体裂解而制备; 或

(ii) 通过下列方法制备, 所述方法包括下列步骤:

将组分 A, B, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

B 为 R^2-NH_2 ;

C 为 R^3-NC ;

D 为 R^4-COOH ; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)$

NR^6R^7 , 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的两个或更多个连接; 或

所述方法包括下列步骤:

将组分 A, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $\text{R}^{1a}\text{COR}^{1b}$;

C 为 $\text{R}^3\text{-NC}$;

D 为 $\text{R}^4\text{-COOH}$; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。

21. 一种用于从混合物分离物质的方法, 所述方法包括下列步骤:

将包含物质的混合物与根据权利要求 14 所述的化合物或根据权利要求 15 或权利要求 16 所述的分离设备接触; 和

将产生的缺失了物质的混合物与固定到所述化合物或装置的所述物质分离。

22. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述方法还包括用洗脱液处理固定到所述化合物或装置的所述物质的步骤。

23. 一种用于确定在分析样品中的物质存在的方法, 所述方法包括下列步骤:

将分析样品与根据权利要求 14 所述的化合物或根据权利要求 15 或权利要求 16 所述的分离设备接触; 和

分析所述化合物或装置, 以确定所述物质与所述化合物或装置结合到什么程度。

24. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述化合物或所述装置的化合物具有对物质的亲和力, 所述物质涉及具体疾病状态。

25. 根据权利要求 17 至 20 中任一项所述的方法或根据权利要求 21 至 24 中任一项所述的方法, 其中所述物质是核酸或肽。

26. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中肽是血液蛋白。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 其中所述血液蛋白是凝血蛋白。

28. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中所述凝血蛋白选自: 因子 VII 和因子 VIII, 以及它们的片段, 变体和衍生物。

29. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中肽是免疫球蛋白。

30. 根据权利要求 29 所述的方法, 其中所述免疫球蛋白是 IgG 或其片段, 变体和衍生物。

31. 一种用于制备根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的集合的方法, 所述方法包括下列步骤:

将 A, B, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $\text{R}^{1a}\text{COR}^{1b}$;

B 为 $\text{R}^2\text{-NH}_2$;

C 为 $\text{R}^3\text{-NC}$;

D 为 $\text{R}^4\text{-COOH}$; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团, 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接; 其中将所述步骤重复一次或多次, 并且对于每一次重复, 改变 A, B, C 或 D 中的一个或多个;

或所述方法包括下列步骤:

将组分 A, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

C 为 R^3-NC ;

D 为 R^4-COOH ; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接,

其中将所述步骤重复一次或多次, 并且对于每一次重复, 改变 A, C 或 D 中的一个或多个。

32. 一种用于制备根据权利要求 14 所述的化合物的方法, 所述方法包括下列步骤:

将组分 A, B, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

B 为 R^2-NH_2 ;

C 为 R^3-NC ;

D 为 R^4-COOH ; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接; 或

所述方法包括下列步骤:

将组分 A, C 和 D 一起接触, 其中

A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

C 为 R^3-NC ;

D 为 R^4-COOH ; 和

R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。

33. 可通过根据权利要求 31 所述的方法得到的根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的集合。

生物分子结合配体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请涉及在 2007 年 7 月 06 日提交的 GB 专利申请 0713187.3 ;所述 GB 专利申请的内容通过引用整个结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及生物分子结合配体和它们在生物混合物的纯化中的用途。本发明还涉及配体的集合和它们在鉴定具有对生物分子的亲和力的化合物中的用途。

[0004] 背景

[0005] 现代人类疾病研究可能最初从通过高通量技术进行的入门水平基因组研究开始,所述研究例如基因组或 cDNA 微阵列平行研究。这经常导致与监视的疾病状态强烈相关的突变基因产物或单个基因表达的改变模式的鉴定,并且允许快速产生大量候选基因列表。这些基于 DNA/RNA 的研究本身具有限制性,因为它们没有考虑蛋白可以表现出的发信号状态复杂的相互影响,所述发信号状态例如磷酸化和经由多个蛋白-蛋白相互作用的变更构象。因此,临床蛋白质组研究的主要目的通常是完全表征强烈涉及具体疾病状态的众多候选蛋白,所述蛋白是已经通过基因表达或直接蛋白图谱分析研究所鉴定的。

[0006] 此令人畏缩的挑战通常要求将许多单个蛋白纯化至同质性-一种耗时且昂贵的方法。科学家经常需要确定各种重要参数,例如 3D 晶体结构,翻译后修饰,与其它蛋白的复合体形成和特异抗体的制备以帮助组织定位研究。还重要的是纯化靶蛋白以开发体外试验体系,所述体外试验体系可以鉴定小分子效应物可以对用于药物递送目的的分离的分子起作用的生物活性的调节程度。

[0007] 这导致了需要进行研究的重要的免疫治疗蛋白的数量的普遍增加,但是也已经强烈影响了在相对短的时期内将新的生物治疗药物投放市场的开发成本。最终产品还应当具有固定水平的纯度,功效,效能,稳定性,以及明确规定的药物代谢动力学,药物动力学和免疫原性性质。因此,已经对现代纯化方法的开发提出了一系列繁重的限制,所述方法考虑导入速度,操作的简单性和经济成本回报。亲和层析仍是可以将特定分子靶识别的关键问题与用于大规模制备方法的适宜性统一起来的仅有的公认技术,并且因而提供了用于解决与规定‘完全表征的生物制品 (well-characterised biologic)’ 相关的提高的成本的‘理想’技术。在下游处理、纯化和完善 (polishing) 过程中导致了差不多 50-80% 的制造治疗产品的总成本,因而许多常规纯化方案现在被基于亲和层析的高选择性的和成熟的策略所代替 (Lowe, 2001)。与可以在随后的大规模工业化生产阶段中获得的最终节约相比,用于设计和测试新的亲和吸附剂的早期开发成本仍通常被认为是小的。

[0008] 常规亲和配体例如肽、寡核苷酸和抗体的使用 (即,免疫亲和纯化) 已经开始被第二代、完全合成的亲和吸附剂所取代,所述亲和吸附剂大部分源自小分子筛选程序,模拟研究和归因于高通量组合化学技术和计算机方法的出现的片段扫描原位方法。这还由关于许多新的靶蛋白的高质量晶体数据所产生的结构信息的快速增加所支持。生物配体还遭受许多限制,所述限制可以包括最初纯化成本,批间 (lot-to-lot) 变化性,不稳定性和高的大

规模生产成本。另一个重要的考虑方面是以下能力：多次有效地清洁和再使用亲和吸附剂，因而延长其寿命，同时保持高的活性，从而降低长期纯化成本。表现出大数量的高度特异的分子识别性质的亲和配体的不同小分子组合文库的开发仍是蛋白纯化科学家的一个重要目标，所述蛋白纯化科学家希望为了成本有效的经济回报而将最新的具有充分收率和纯度的纯化蛋白输送到工业中。

[0009] 单个蛋白的有效纯化可以快速促进以天然高亲和力识别此靶标的新的 mAb 的制备。目前，18 种治疗性人 mAb 已经上市，而超过 100 种 mAb 当前正进行最后的临床试验。迄今为止，5 种 Fab 分子已经被 FDA 批准用于人用，而单一人源化 Fab（雷珠单抗，rhFab）很可能在不远的将来被批准。

[0010] 在生物治疗药物开发中的这种出现的趋向及其对快速有效纯化的迫近需要已经促进了用于配体设计和合成的新的一般亲和支架（scaffold）的开发。任何亲和配体的支架必须包含下列双重能力：对于固态的，不溶的载体基质的固定以及复杂衍生化的能力，以获得特定组的分子相互作用和结合常数。这是用于鉴定和进一步优化层析吸附和脱附的分离方法所需的绝对要求。本申请人在本文中报道一种用于开发完全合成的亲和层析配体的新的支架化学，所述完全合成的亲和层析配体可以用于免疫药物靶标和其它重要生物分子的纯化。

[0011] 在亲和层析领域中，存在着对感兴趣的物质提供新的亲和配体的连续需求，以克服例如差的结合和差的选择性等的问题。用于制备用作亲和配体的化合物的健全方法也是期望的。

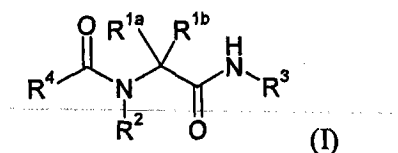
[0012] 在生物学和化学的许多领域中，存在着对提供用于鉴定能够用作对于感兴趣的物质例如核酸或肽的配体的化合物的新方法。对于鉴定新的配体分子，除别的以外，认为期望该方法：可实现自动化、高通量、可重复和可实现大规模。此外，还期望具有这样的方法，所述方法能够探索宽广且多种多样的化学结构空间，从而将鉴定具有对物质的高亲和力的配体的可能性最大化。

发明内容

[0013] 本发明涉及用作用于从混合物中纯化物质的亲和配体的化合物。本发明还涉及用于鉴定具有对物质的亲和力的配体的化合物以及化合物的集合的用途。

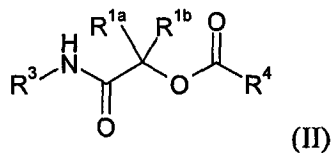
[0014] 因此，在本发明的第一方面中，提供一种化合物的集合，其中所述集合的每一个成员独立地是根据式 (I) 或式 (II) 的化合物：

[0015]



或

[0016]



[0017] 其中所述集合包含仅式 (I) 的化合物, 仅式 (II) 的化合物, 或式 (I) 和 (II) 的化合物的混合物, 并且

[0018] 对于式 (I) 的化合物

[0019] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

[0020] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

[0021] 或, 任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环; 和

[0022] 对于式 (II) 的化合物

[0023] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体 (linker) 的基团,

[0024] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 并且 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

[0025] 或, 任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环。

[0026] 在本发明的第二方面中, 提供根据本发明的第一方面的集合在鉴定具有对物质的亲和力的固定配体的方法中的用途。所述方法包括下列步骤:

[0027] 得到根据本发明的第一方面的化合物的集合;

[0028] 将所述集合中的每一个成员与包含物质的混合物接触; 和

[0029] 分析所述集合, 以确定所述物质与每一个集合成员结合到什么程度。

[0030] 优选地, 所述物质为核酸或肽。该方法可以包括将所述集合从混合物分离的另外步骤。

[0031] 在本发明的第三方面中, 提供根据本发明的第一方面的集合在用于产生具有对物质的亲和力的化合物的方法中的用途。所述方法包括下列步骤:

[0032] 得到根据本发明的第一方面的化合物的集合;

[0033] 将所述集合中的每一个成员与包含物质的混合物接触;

[0034] 分析所述集合, 以确定所述物质与每一个集合成员结合到什么程度;

[0035] 鉴定具有对所述物质的亲和力的文库 (library) 成员; 和

[0036] 制备具有基于所述集合成员的结构化合物。

[0037] 优选地, 所述物质为核酸或肽。该方法可以包括将所述集合从混合物分离的另外步骤。

[0038] 具有对物质的亲和力的化合物可以通过将被确定与所述物质结合的集合的连接体裂解而制备。备选地, 该化合物可以通过包括下列步骤的方法制备: 将组分 A, B, C 和 D 一起接触, 其中

[0039] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

[0040] B 为 R^2-NH_2 ;

[0041] C 为 R^3-NC ;

[0042] D 为 R^4-COOH ;和

[0043] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

[0044] 或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接; 或所述方法包括下列步骤: 将组分 A, C 和 D 一起接触, 其中

[0045] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

[0046] C 为 R^3-NC ;

[0047] D 为 R^4-COOH ;和

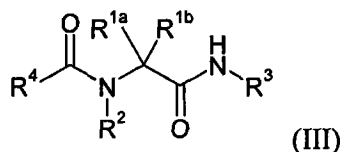
[0048] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

[0049] 或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。

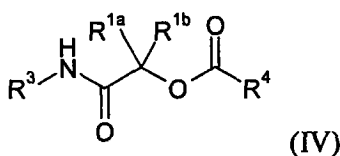
[0050] 在此后一种方法步骤中, 优选一种组分是所述连接体的结构或功能类似物。

[0051] 在本发明的第四方面中, 提供式 (III) 的化合物或式 (IV) 的化合物:

[0052]



或



[0053] 其中对于 (III) 的化合物

[0054] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

[0055] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

[0056] 或, 任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环; 和

[0057] 对于式 (IV) 的化合物

[0058] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体 (linker) 的基团,

[0059] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 并且 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

[0060] 或, 任选地, R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环。

[0061] 在本发明的第五方面中, 提供一种用于从混合物分离物质的分离设备, 其中所述装置包含根据本发明的第四方面的化合物。

[0062] 在本发明的第六方面中, 提供本发明的第四方面的化合物在用于从混合物分离物质的方法中的用途或本发明的第五方面的分离设备在用于从混合物分离物质的方法中的用途。所述方法包括下列步骤:

[0063] 将包含物质的混合物与根据本发明的第四方面的化合物或根据本发明的第五方面的分离设备接触; 和

[0064] 从固定到所述化合物或装置的物质分离产生的缺失了所述物质的混合物。

[0065] 在本发明的第七方面中, 提供本发明的第四方面的化合物在诊断方法中的用途或本发明的第五方面中的设备在诊断方法中的用途。所述方法包括下列步骤: 关于具有对涉及具体疾病状态的物质的亲和力的化合物, 筛选生物样品。所述方法包括下列步骤:

[0066] 将生物样品与根据本发明的第四方面的化合物或根据本发明的第五方面的分离装置接触; 和

[0067] 分析所述化合物或装置, 确定涉及具体疾病状态的物质与所述化合物或装置结合到什么程度。

[0068] 在本发明的第八方面中, 提供在用于确定在分析样品中的物质存在的分析方法中的本发明的第四方面的化合物的用途或本发明的第五方面的分离设备的用途。所述方法包括下列步骤: 关于具有对物质的亲和力的化合物, 筛选分析样品。所述方法包括下列步骤:

[0069] 将分析样品与根据本发明的第四方面的化合物或根据本发明的第五方面的分离设备接触; 和

[0070] 分析所述化合物或装置, 以确定所述物质与所述化合物或装置结合到什么程度。

[0071] 本发明还在第九方面中提供一种用于制备根据本发明的第一方面的集合的方法。所述方法包括下列步骤: 将组分 A, B, C 和 D 一起接触, 其中

[0072] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

[0073] B 为 R^2-NH_2 ;

[0074] C 为 R^3-NC ;

[0075] D 为 R^4-COOH ; 和

[0076] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

[0077] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基, 和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢, 和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$, 其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

[0078] 或, 任选地, 将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接; 其中将所述步骤重复一次或多次, 并且对于每一次重复, 改变 A, B, C 或 D 中的一个或多个;

[0079] 或所述方法包括下列步骤: 将组分 A, C 和 D 一起接触, 其中

- [0080] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;
- [0081] C 为 R^3-NC ;
- [0082] D 为 R^4-COOH ;和
- [0083] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,
- [0084] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,
- [0085] 或,任选地,将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接,
- [0086] 其中将所述步骤重复一次或多次,并且对于每一次重复,改变 A, C 或 D 中的一个或多个。
- [0087] 优选地,将所述步骤同时进行。优选将每一个步骤在分开的反应罐中进行。
- [0088] 本发明还在第十方面中提供一种用于制备根据本发明的第四方面的化合物的方法。所述方法包括下列步骤:将组分 A, B, C 和 D 一起接触,其中
- [0089] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;
- [0090] B 为 R^2-NH_2 ;
- [0091] C 为 R^3-NC ;
- [0092] D 为 R^4-COOH ;和
- [0093] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,
- [0094] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢,和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$,其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,
- [0095] 或,任选地,将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接;或所述方法包括下列步骤:将组分 A, C 和 D 一起接触,其中
- [0096] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;
- [0097] C 为 R^3-NC ;
- [0098] D 为 R^4-COOH ;和
- [0099] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,
- [0100] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,
- [0101] 或,任选地,将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。
- [0102] 在本发明的另一个方面中,提供一种可通过本发明的第九方面的方法得到的化合物的集合。
- [0103] 附图简述
- [0104] 图 1 显示关于化合物 5 的 (A) 1H NMR 和 (B) ^{13}C NMR 谱图。
- [0105] 图 2 显示关于原位 Ugi 支架形成的定性证据的配体的荧光图像。
- [0106] 图 3 显示其中基于非优化标准层析条件 (c. v. :200 μ l ;hIgG 负载 :500 μ g ml $^{-1}$ (1c. v.) ;配体密度 :24 μ mol g^{-1} 湿重凝胶) 关于 hIgG 结合 (μ g ml $^{-1}$) 筛选的 Ugi 反应制备的文库的试验的结果。标记 A1-8 和 C1-8 确定如在实验部分中详细描述用于 Ugi 反应中的胺和羧酸组分。

- [0107] 图 4 显示其中关于 hFab 结合筛选关于图 3 中所述的文库的试验的结果。
- [0108] 图 5 显示其中关于 hFc 结合筛选关于图 3 中所述的文库的试验的结果。
- [0109] 图 6 显示关于 hIgG 先导候选配体的结合和洗脱%的比较。应用非优化的结合 ((10mMNa₂HPO₄, 150mMNaCl, pH7.4)) 和洗脱 (0.1MNaHCO₃, 10% (v/v) 乙二醇, pH 10.0) 条件。洗脱%表示为结合蛋白的百分数 (配体密度: 17.5 μmol g⁻¹ 湿重凝胶)
- [0110] 图 7 显示在关于图 6 中所述的条件下的关于 hFab 先导配体的结合和洗脱%的比较。
- [0111] 图 8 显示在关于图 6 中所述的条件下的关于 hFc 先导配体的结合和洗脱%的比较。
- [0112] 图 9 显示与三嗪配体 34/43 相比较, 使用选择的配体化合物 4U, 8U 和 9U 装填的柱的因子 VIII 结合研究的结果。
- [0113] 图 10 显示与三嗪配体 34/43 相比较, 选择的配体化合物 4U, 8U 和 9U 的洗脱性质。
- [0114] 图 11 显示与三嗪配体 34/43 相比较, 选择的配体化合物 4U, 6U, 7U, 8U, 9U, 10U, 11U, 12U, 13U 和 14U 的因子 VIII 微量培养板试验结果。
- [0115] 图 12 显示关于选择的配体化合物 4U, 9U 和 14U 鉴定的不同结合模式。
- [0116] 图 13 显示关于选择的配体化合物 4U, 16U, 17U 和 14U 鉴定的不同结合模式。
- [0117] 图 14 显示来自选择的配体化合物 8U, 14U, 16U 和 17U 的因子 VIII 洗脱的结果。
- [0118] 发明详述
- [0119] 定义
- [0120] R^{1a}, R^{1b}, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ 和 R⁷
- [0121] C₁₋₂₀ 烷基: 如本文中所使用的术语“烷基”涉及通过从烃化合物的碳原子上去除氢原子而得到的单价部分, 所述烃化合物具有 1 至 20 个碳原子 (除非另外规定), 其可以是脂族的或脂环族的, 并且可以是饱和或不饱和的 (例如, 部分不饱和的, 完全不饱和的)。因而, 术语“烷基”包括以下讨论的子类烯基, 炔基, 环烷基, 环烯基, 环炔基等。
- [0122] 在烷基的情景中, 前缀 (例如 C₁₋₄, C₁₋₇, C₁₋₂₀, C₂₋₇, C₃₋₇, 等) 表示碳原子数或碳原子数的范围。例如, 术语“C₁₋₄ 烷基”, 如本文中所使用的, 涉及具有 1 至 4 个碳原子的烷基。烷基基团的实例包括 C₁₋₄ 烷基 (“低级烷基”), C₁₋₇ 烷基, 和 C₁₋₂₀ 烷基。注意, 第一前缀可以根据其它限制而变化; 例如, 对于不饱和烷基, 第一前缀必须至少是 2; 对于环烷基, 第一前缀必须至少是 3; 等。
- [0123] (未取代) 饱和烷基的实例包括但不限于甲基 (C₁), 乙基 (C₂), 丙基 (C₃), 丁基 (C₄), 戊基 (C₅), 己基 (C₆), 庚基 (C₇), 辛基 (C₈), 壬基 (C₉), 癸基 (C₁₀), 十一烷基 (C₁₁), 十二烷基 (C₁₂), 十三烷基 (C₁₃), 十四烷基 (C₁₄), 十五烷基 (C₁₅), 和二十烷基 (C₂₀)。
- [0124] (未取代) 饱和直链烷基的实例包括但不限于甲基 (C₁), 乙基 (C₂), 正丙基 (C₃), 正丁基 (C₄), 正戊基 (戊基) (C₅), 正己基 (C₆), 和正庚基 (C₇)。
- [0125] (未取代) 饱和支链烷基的实例包括但不限于异丙基 (C₃), 异丁基 (C₄), 仲丁基 (C₄), 叔丁基 (C₄), 异戊基 (C₅), 和新戊基 (C₅)。
- [0126] 烯基: 术语“烯基”, 如本文中所使用的, 涉及具有一个或多个碳-碳双键的烷基。烯基的实例包括 C₂₋₄ 烯基, C₂₋₇ 烯基, C₂₋₂₀ 烯基。
- [0127] (未取代) 不饱和烯基的实例包括但不限于乙烯基 (烯乙基, -CH = CH₂), 1-丙烯

基 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-丙烯基 (烯丙基, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 异丙烯基 (1-甲基乙烯基, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$), 丁烯基 (C_4), 戊烯基 (C_5), 和己烯基 (C_6)。

[0128] 炔基: 术语“炔基”, 如在本文中所使用的, 涉及具有一个或多个碳-碳三键的烷基。炔基的实例包括 C_{2-4} 炔基, C_{2-7} 炔基, C_{2-20} 炔基。

[0129] (未取代) 不饱和炔基的实例包括但不限于乙炔基 (炔乙基, $-\text{C}\equiv\text{CH}$) 和 2-丙炔基 (炔丙基, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$)。

[0130] 环烷基: 术语“环烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及也是环基的烷基; 即, 通过从碳环型化合物的碳环型环的脂环族环原子去除氢原子得到的单价部分, 其碳环型环可以是饱和的或不饱和的 (例如, 部分不饱和的, 完全不饱和的), 所述部分具有 3 至 20 个碳原子 (除非另外规定), 包括 3 至 20 个环原子。因而, 术语“环烷基”包括子类环烯基和环炔基。优选地, 每一个环具有 3 至 7 个环原子。环烷基的基团的实例包括 C_{3-20} 环烷基, C_{3-15} 环烷基, C_{3-10} 环烷基, C_{3-7} 环烷基。

[0131] 环烷基的实例包括但不限于衍生自下列各项的那些:

[0132] 饱和单环烃化合物:

[0133] 环丙烷 (C_3), 环丁烷 (C_4), 环戊烷 (C_5), 环己烷 (C_6), 环庚烷 (C_7), 甲基环丙烷 (C_4), 二甲基环丙烷 (C_5), 甲基环丁烷 (C_5), 二甲基环丁烷 (C_6), 甲基环戊烷 (C_6), 二甲基环戊烷 (C_7), 甲基环己烷 (C_7), 二甲基环己烷 (C_8), 薄荷烷 (C_{10});

[0134] 不饱和单环烃化合物:

[0135] 环丙烯 (C_3), 环丁烯 (C_4), 环戊烯 (C_5), 环己烯 (C_6), 甲基环丙烯 (C_4), 二甲基环丙烯 (C_5), 甲基环丁烯 (C_5), 二甲基环丁烯 (C_6), 甲基环戊烯 (C_6), 二甲基环戊烯 (C_7), 甲基环己烯 (C_7), 二甲基环己烯 (C_8);

[0136] 饱和多环烃化合物:

[0137] 侧柏烷 (C_{10}), 薏烷 (C_{10}), 蒎烷 (C_{10}), 茨烷 (C_{10}), 降薏烷 (C_7), 降蒎烷 (C_7), 降茨烷 (C_7), 金刚烷 (C_{10}), 萘烷 (十氢化萘) (C_{10});

[0138] 不饱和多环烃化合物:

[0139] 茨烯 (C_{10}), 苧烯 (C_{10}), 蒎烯 (C_{10});

[0140] 具有芳环的多环烃化合物:

[0141] 茛 (C_9), 茛满 (例如, 2,3-二氢-1H-茛) (C_9), 萘满 (1,2,3,4-四氢化萘) (C_{10}), 蒎 (C_{12}), 芴 (C_{13}), 非那烯 (phenalene) (C_{13}), 醋菲 (acephenanthrene) (C_{15}), 醋蒎 (C_{16}), 胆蒎 (C_{20})。

[0142] C_{3-20} 杂环基: 术语“杂环基”, 如在本文中所使用的, 涉及通过从杂环化合物的环原子去除氢原子得到的单价部分, 所述部分具有 3 至 20 个环原子 (除非另外规定), 其中 1 至 10 个是环杂原子。优选地, 每一个环具有 3 至 7 个环原子, 其中 1 至 4 个是环杂原子。

[0143] 在此上下文中, 前缀 (例如 C_{3-20} , C_{3-7} , C_{5-6} , 等) 表示环原子的数量或环原子的数量范围, 不论是碳原子或杂原子。例如, 术语“ C_{5-6} 杂环基”, 如在本文中所使用的, 涉及具有 5 或 6 个环原子的杂环基。杂环基的实例包括 C_{3-20} 杂环基, C_{5-20} 杂环基, C_{3-15} 杂环基, C_{5-15} 杂环基, C_{3-12} 杂环基, C_{5-12} 杂环基, C_{3-10} 杂环基, C_{5-10} 杂环基, C_{3-7} 杂环基, C_{5-7} 杂环基, 和 C_{5-6} 杂环基。

[0144] 单环杂环基的实例包括但不限于衍生自下列各项的那些:

[0145] N_1 : 氮丙啶 (C_3), 氮杂环丁烷 (C_4), 吡咯烷 (四氢吡咯) (C_5), 吡咯啉 (例如, 3-吡咯啉, 2,5-二氢吡咯) (C_5), 2H-吡咯或 3H-吡咯 (异吡咯 (isopyrrole), 异吡咯 (isoazole)) (C_5), 哌啶 (C_6), 二氢吡啶 (C_6), 四氢吡啶 (C_6), 氮杂萘 (C_7);

[0146] O_1 : 环氧乙烷 (C_3), 氧杂环丁烷 (C_4), 氧杂环戊烷 (四氢呋喃) (C_5), 氧杂环戊二烯 (二氢呋喃) (C_5), 噁烷 (四氢吡喃) (C_6), 二氢吡喃 (C_6), 吡喃 (C_6), 氧杂环戊三烯 (oxepin) (C_7);

[0147] S_1 : 硫杂环丙烷 (C_3), 硫杂环丁烷 (thietane) (C_4), 硫杂环戊烷 (thiolane) (四氢噻吩) (C_5), 硫杂环己烷 (thiane) (四氢硫代吡喃) (C_6), 硫杂环庚烷 (thiepane) (C_7);

[0148] O_2 : 二氧戊环 (C_5), 二噁烷 (C_6), 和二氧杂环庚烷 (dioxepane) (C_7);

[0149] O_3 : 三噁烷 (C_6);

[0150] N_2 : 咪唑烷 (C_5), 吡唑烷 (diazolidine) (C_5), 咪唑啉 (C_5), 吡唑啉 (二氢吡唑) (C_5), 哌嗪 (C_6);

[0151] N_1O_1 : 四氢噁唑 (C_5), 二氢噁唑 (C_5), 四氢异噁唑 (C_5), 二氢异噁唑 (C_5), 吗啉 (C_6), 四氢噁嗪 (C_6), 二氢噁嗪 (C_6), 噁嗪 (C_6);

[0152] N_1S_1 : 噻唑啉 (C_5), 噻唑烷 (C_5), 硫代吗啉 (C_6);

[0153] N_2O_1 : 噁二嗪 (C_6);

[0154] O_1S_1 : 氧硫杂环戊吡咯 (oxathiole) (C_5) 和氧硫杂环己烷 (噻噁烷) (C_6); 和,

[0155] $N_1O_1S_1$: 噁噻嗪 (oxathiazine) (C_6)。

[0156] 取代的 (非芳族) 单环杂环基的实例包括衍生自环状形式的糖类的那些, 例如, 呋喃糖 (C_5), 例如阿拉伯呋喃糖, 来苏呋喃糖, 呋喃核酸, 和木糖呋喃糖 (xylofuranse), 和吡喃糖 (C_6), 例如别吡喃糖 (allopuranose), 阿卓吡喃糖 (altropuranose), 吡喃型葡萄糖, 吡喃甘露糖, 古洛吡喃糖 (gulopyranose), 艾杜吡喃糖 (idopyranose), 吡喃半乳糖, 和塔罗吡喃糖。

[0157] 螺- C_{3-7} 环烷基或杂环基: 术语“螺- C_{3-7} 环烷基或杂环基”, 如在本文中所使用的, 是指通过两个环共有的单个原子连接到另一个环的 C_{3-7} 环烷基或 C_{3-7} 杂环基。

[0158] C_{5-20} 芳基: 术语“芳基”, 如在本文中所使用的, 涉及通过从芳族化合物的芳环原子去除氢原子所得到的单价部分, 所述化合物具有一个环, 或两个或更多个的环 (例如, 稠合的), 并且其中所述一个或多个环的至少一个为芳环。优选地, 每一个环具有 5 至 7 个环原子。优选地, 芳基为 C_{5-20} 芳基。

[0159] 所述环原子可以所有都是碳原子, 如在“碳芳基 (carbaryl)”中, 在该情况下, 所述基团可以便利地称为“ C_{5-20} 碳芳基”。

[0160] 不具有环杂原子的 C_{5-20} 芳基 (即 C_{5-20} 碳芳基) 的实例包括但不限于衍生自下列各项的那些: 苯 (即苯基) (C_6), 萘 (C_{10}), 蒽 (C_{14}), 菲 (C_{14}), 和芘 (C_{16})。

[0161] 备选地, 环原子可以包括一个或多个杂原子 (包括但不限于氧, 氮和硫), 如在“杂芳基”中。在此情况下, 该基团可便利地称为“ C_{5-20} 杂芳基”, 其中“ C_{5-20} ”表示环原子, 无论是碳原子或杂原子。优选地, 每一个环具有 5 至 7 个环原子, 其中 0 至 4 个是环杂原子。

[0162] C_{5-20} 杂芳基的实例包括但不限于衍生自下列各项的 C_5 杂芳基: 呋喃 (氧杂环戊二烯 (oxole)), 噻吩 (硫杂环戊二烯 (thiole)), 吡咯 (氮杂茂 (azole)), 咪唑 (1,3-二唑), 吡唑 (1,2-二唑), 三唑, 噁唑, 异噁唑, 噻唑, 异噻唑, 噁二唑, 四唑和噁三唑; 以及衍生自下

列各项的 C₆ 杂芳基：异噁嗪，吡啶（吡嗪），哒嗪（1,2-二嗪），嘧啶（1,3-二嗪；例如，胞嘧啶，胸腺嘧啶，尿嘧啶），吡嗪（1,4-二嗪）和三嗪。

[0163] 杂芳基可以经由碳或杂环原子结合。

[0164] 包含稠环的 C₅₋₂₀ 杂芳基的实例包括但不限于衍生自苯并呋喃，异苯并呋喃，苯并噻吩，吲哚，异吲哚的 C₉ 杂芳基；衍生自喹啉，异喹啉，苯并二嗪，吡啶并吡啶的 C₁₀ 杂芳基；衍生自吡啶和咕吨的 C₁₄ 杂芳基。

[0165] 以上烷基，杂环基和芳基，不论单独的或是另一个取代基的一部分，它们本身可以任选被选自它们本身和以下列出的另外的取代基中的一个或多个基团取代。

[0166] 氢：-H。注意的是，如果处于具体位置的取代基为氢，则可以便利地将该化合物或基团称为在此位置是“未取代的”。

[0167] 卤素：-F，-Cl，-Br，和 -I。

[0168] 羟基：-OH。

[0169] 醚：-OR，其中 R 是醚取代基，例如，C₁₋₇ 烷基（也称为 C₁₋₇ 烷氧基，以下讨论），C₃₋₂₀ 杂环基（也称为 C₃₋₂₀ 杂环基氧基），或 C₅₋₂₀ 芳基（也称为 C₅₋₂₀ 芳氧基），优选 C₁₋₇ 烷基。

[0170] 烷氧基：-OR，其中 R 为烷基，例如 C₁₋₇ 烷基。C₁₋₇ 烷氧基的实例包括但不限于 -OMe（甲氧基），-OEt（乙氧基），-O(nPr）（正丙氧基），-O(iPr）（异丙氧基），-O(nBu）（正丁氧基），-O(sBu）（仲丁氧基），-O(iBu）（异丁氧基），和 -O(tBu）（叔丁氧基）。

[0171] 缩醛基：-CH(OR¹)(OR²），其中 R¹ 和 R² 独立地是缩醛取代基，例如，C₁₋₇ 烷基，C₃₋₂₀ 杂环基，或 C₅₋₂₀ 芳基，优选 C₁₋₇ 烷基，或在“环状”缩醛基的情况下，R¹ 和 R²，通过其连接的两个氧原子及其连接的碳原子结合在一起形成具有 4 至 8 个环原子的杂环。缩醛基的实例包括但不限于 -CH(OMe)₂，-CH(OEt)₂，和 -CH(OMe)(OEt)。

[0172] 半缩醛基：-CH(OH)(OR¹），其中 R¹ 是半缩醛取代基，例如，C₁₋₇ 烷基，C₃₋₂₀ 杂环基，或 C₅₋₂₀ 芳基，优选 C₁₋₇ 烷基。半缩醛基的实例包括但不限于 -CH(OH)(OMe) 和 -CH(OH)(OEt)。

[0173] 缩酮基：-CR(OR¹)(OR²），其中 R¹ 和 R² 如关于缩醛所定义的，并且 R 为除氢以外的缩酮基取代基，例如，C₁₋₇ 烷基，C₃₋₂₀ 杂环基，或 C₅₋₂₀ 芳基，优选 C₁₋₇ 烷基。缩酮基基团的实例包括但不限于 -C(Me)(OMe)₂，-C(Me)(OEt)₂，-C(Me)(OMe)(OEt)，-C(Et)(OMe)₂，-C(Et)(OEt)₂，和 -C(Et)(OMe)(OEt)。

[0174] 半缩酮基：-CR(OH)(OR¹），其中 R¹ 如关于半缩醛所定义的，并且 R 为除氢以外的半缩酮基取代基，例如，C₁₋₇ 烷基，C₃₋₂₀ 杂环基，或 C₅₋₂₀ 芳基，优选 C₁₋₇ 烷基。半缩酮基的实例包括但不限于 -C(Me)(OH)(OMe)，-C(Et)(OH)(OMe)，-C(Me)(OH)(OEt)，和 -C(Et)(OH)(OEt)。

[0175] 氧基 (Oxo) (酮，-酮)：= O。

[0176] 硫酮 (Thione) (硫酮 (thioketone))：= S。

[0177] 亚氨基 (亚胺)：= NR，其中 R 是亚氨基取代基，例如，氢，C₁₋₇ 烷基，C₃₋₂₀ 杂环基，或 C₅₋₂₀ 芳基，优选氢或 C₁₋₇ 烷基。酯基的实例包括但不限于 = NH，= NMe，= NEt，和 = NPh。

[0178] 甲酰基 (甲醛 (carbaldehyde)，甲酰 (carboxaldehyde))：-C(=O)H。

[0179] 酰基 (酮基)：-C(=O)R，其中 R 为酰基取代基，例如，C₁₋₇ 烷基（也称为 C₁₋₇ 烷基酰基或 C₁₋₇ 烷酰基），C₃₋₂₀ 杂环基（也称为 C₃₋₂₀ 杂环酰基），或 C₅₋₂₀ 芳基（也称为 C₅₋₂₀ 芳酰基），优选 C₁₋₇ 烷基。酰基的实例包括但不限于 -C(=O)CH₃（乙酰基），-C(=O)CH₂CH₃（丙酰基），-C(=O)C(CH₃)₃（叔丁酰基），和 -C(=O)Ph（苯甲酰基，苯酮 (phenone)）。

[0180] 羧基(羧酸): $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 。

[0181] 硼酸: $-\text{B}(\text{OH})_2$ 。

[0182] 硼酸: $-\text{B}(\text{OR})_2$ 其中 R 为烷基或芳基。

[0183] 硫代羧基(硫代羧酸): $-\text{C}(=\text{S})\text{SH}$ 。

[0184] 巯基羧基(巯基羧酸): $-\text{C}(=\text{O})\text{SH}$ 。

[0185] 硫羧基(硫羧酸): $-\text{C}(=\text{S})\text{OH}$ 。

[0186] 亚氨酸: $-\text{C}(=\text{NH})\text{OH}$ 。

[0187] 异羟肟酸: $-\text{C}(=\text{NOH})\text{OH}$ 。

[0188] 酯(羧酸酯(carboxylate),羧酸酯(carboxylic acid ester),羟基羰基): $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$,其中 R 为酯取代基,例如 C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。酯基的实例包括但不限于 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, 和 $-\text{C}(=\text{O})\text{OPh}$ 。

[0189] 酰氧基(逆酯(reverse ester)): $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$,其中 R 为酰氧基取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。酰氧基的实例包括但不限于 $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (乙酰氧基), $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$, 和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$ 。

[0190] 氧基羧基氧基(Oxycarboxyloxy): $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$,其中 R 为酯取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。酯基的实例包括但不限于 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, 和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OPh}$ 。

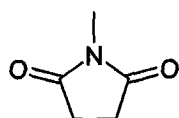
[0191] 氨基: $-\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是氨基取代基,例如,氢, C_{1-7} 烷基(也称为 C_{1-7} 烷基氨基或二- C_{1-7} 烷基氨基), C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 H 或 C_{1-7} 烷基,或在“环状”氨基的情况下, R^1 和 R^2 与其连接的氮原子一起形成具有 4 至 8 个环原子的杂环。氨基可以是伯胺($-\text{NH}_2$),仲胺($-\text{NHR}^1$),或叔胺($-\text{NHR}^1\text{R}^2$),并且阳离子形式可以是季铵($-\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$)。氨基的实例包括但不限于 $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 和 $-\text{NHPH}$ 。环状氨基的实例包括但不限于吡丙啶基(aziridino),氮杂环丁烷基(azetidino),吡咯烷子基,哌啶子基,哌嗪子基,吗啉代,和硫代吗啉代。

[0192] 酰氨基(amido)(甲酰氨基(carbamoyl),甲酰氨基(carbamyl),氨基羰基,甲酰胺): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是如关于氨基所定义的氨基取代基。酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, 和 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 以及其中 R^1 和 R^2 与它们连接的氮原子一起形成杂环结构的酰氨基,如在诸如哌啶基羰基,吗啉基羰基,硫代吗啉基羰基和哌嗪基羰基中。

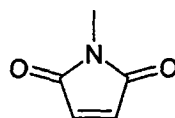
[0193] 硫代酰氨基(硫代甲酰氨基): $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是如关于氨基所定义的氨基取代基。酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, 和 $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0194] 酰氨基(Acylamido)(酰基氨基(acylamino)): $-\text{NR}^1\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$,其中 R^1 为酰基取代基,例如,氢, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选氢或 C_{1-7} 烷基,并且 R^2 为酰基取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选氢或 C_{1-7} 烷基。酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, 和 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{Ph}$ 。 R^1 和 R^2 可以一起形成环结构,如在诸如琥珀酰亚胺基,马来酰亚胺基,和邻苯二甲酰亚胺基中:

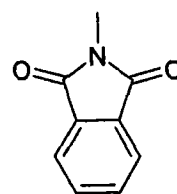
[0195]



琥珀酰亚胺基



马来酰亚胺基



邻苯二甲酰亚胺基

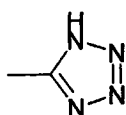
[0196] 氨基羰基氧基： $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$ ，其中 R^1 和 R^2 独立地是如关于氨基所定义的氨基取代基。氨基羰基氧基的实例包括但不限于 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}_2$ ， $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHMe}$ ， $-\text{OC}(=\text{O})\text{NMe}_2$ ，和 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NEt}_2$ 。

[0197] 脲基： $-\text{N}(\text{R}^1)\text{CONR}^2\text{R}^3$ ，其中 R^2 和 R^3 独立地是如关于氨基所定义的氨基取代基，并且 R^1 为脲基取代基，例如，氢， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选氢或 C_{1-7} 烷基。脲基的实例包括但不限于 $-\text{NHCONH}_2$ ， $-\text{NHCONHMe}$ ， $-\text{NHCONHEt}$ ， $-\text{NHCONMe}_2$ ， $-\text{NHCONEt}_2$ ， $-\text{NMeCONH}_2$ ， $-\text{NMeCONHMe}$ ， $-\text{NMeCONHEt}$ ， $-\text{NMeCONMe}_2$ ，和 $-\text{NMeCONEt}_2$ 。

[0198] 胍基： $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 。

[0199] 四唑基：一种具有 4 个氮原子和一个碳原子的 5 元芳环，

[0200]



[0201] 亚氨基： $=\text{NR}$ 其中 R 为亚氨基取代基，例如，例如，氢， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 H 或 C_{1-7} 烷基。亚氨基的实例包括但不限于 $=\text{NH}$ ， $=\text{NMe}$ ，和 $=\text{NEt}$ 。

[0202] 脒（脒基）： $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$ ，其中每一个 R 为脒取代基，例如，氢， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 H 或 C_{1-7} 烷基。脒基的实例包括但不限于 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ， $-\text{C}(=\text{NH})\text{NMe}_2$ ，和 $-\text{C}(=\text{NMe})\text{NMe}_2$ 。

[0203] 硝基： $-\text{NO}_2$ 。

[0204] 亚硝基： $-\text{NO}$ 。

[0205] 叠氮基： $-\text{N}_3$ 。

[0206] 氰基（腈 (nitrile)，腈 (carbonitrile)）： $-\text{CN}$ 。

[0207] 异氰基： $-\text{NC}$ 。

[0208] 氰酰基： $-\text{OCN}$ 。

[0209] 异氰酰基： $-\text{NCO}$ 。

[0210] 氰硫基 (Thiocyano) (氰硫基 (thiocyanato))： $-\text{SCN}$ 。

[0211] 异氰硫基 (Isothiocyano) (异氰硫基 (isothiocyanato))： $-\text{NCS}$ 。

[0212] 硫氢基（硫羟基，巯基）： $-\text{SH}$ 。

[0213] 硫醚 (thioether) (硫醚 (sulfide))： $-\text{SR}$ ，其中 R 为硫醚取代基，例如， C_{1-7} 烷基（也称为 C_{1-7} 烷硫基）， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。 C_{1-7} 烷硫基的实例包括但不限于 $-\text{SCH}_3$ 和 $-\text{SCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0214] 二硫化物： $-\text{SS}-\text{R}$ ，其中 R 为二硫化物取代基，例如， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基（在本文中也称为 C_{1-7} 烷基二硫化物）。 C_{1-7} 烷基二硫化物基团的实例包括但不限于 $-\text{SSCH}_3$ 和 $-\text{SSCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0215] 钨化物(亚磺酰基,亚磺): $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$,其中R为钨化物取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。钨化物基团的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})\text{CH}_3$ 和 $-\text{S}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。

[0216] 砷(磺酰基): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$,其中R为砷取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基,包括例如,氟化或全氟化 C_{1-7} 烷基。砷基的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ (甲磺酰基(methanesulfonyl),甲磺酰基(mesylyl)), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CF}_3$ (三氟甲磺酰基(triflylyl)), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (乙磺酰基(esylyl)), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_4\text{F}_9$ (九氟丁磺酰基(nonaflylyl)), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ (三氟乙磺酰基(tresylyl)), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (氨基乙磺酰基), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{Ph}$ (苯磺酰基(phenylsulfonyl),苯磺酰基(besylyl)),4-甲基苯磺酰基(甲苯磺酰基),4-氯苯磺酰基(closylyl),4-溴苯磺酰基(brosylyl),4-硝基苯基(nosylyl),2-萘磺酰基(napsylyl),和5-二甲基氨基-萘-1-基磺酸酯(1-二甲胺基萘-5-磺酰(dansylyl))。

[0217] 亚磺酸(亚磺基): $-\text{S}(=\text{O})\text{OH}$, $-\text{SO}_2\text{H}$ 。

[0218] 磺酸(磺基): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ 。

[0219] 亚磺酸酯(Sulfinat)(亚磺酸酯(sulfinic acid ester)): $-\text{S}(=\text{O})\text{OR}$;其中R为亚磺酸酯取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。亚磺酸酯的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})\text{OCH}_3$ (甲氧基亚磺酰基;亚磺酸甲酯)和 $-\text{S}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (乙氧基亚磺酰基;亚磺酸乙酯)。

[0220] 磺酸酯(Sulfonate)(磺酸酯(sulfonic acid 酯)): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}$,其中R为磺酸酯取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。磺酸酯基团的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OCH}_3$ (甲氧基磺酰基;磺酸甲酯)和 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (乙氧基磺酰基;磺酸乙酯)。

[0221] 亚磺酰氧基: $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}$,其中R为亚磺酰氧基取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。亚磺酰氧基的实例包括但不限于 $-\text{OS}(=\text{O})\text{CH}_3$ 和 $-\text{OS}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。

[0222] 磺酰氧基: $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{R}$,其中R为磺酰氧基取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。磺酰氧基的实例包括但不限于 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ (甲磺酰氧基(mesylylate)) 和 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (乙磺酰氧基(esylylate))。

[0223] 硫酸酯: $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$;其中R为硫酸酯取代基,例如, C_{1-7} 烷基, C_{3-20} 杂环基,或 C_{5-20} 芳基,优选 C_{1-7} 烷基。硫酸酯基的实例包括但不限于 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OCH}_3$ 和 $-\text{SO}(=\text{O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0224] 氨磺酰基(Sulfamyl)(氨磺酰基(sulfamoyl);亚磺酰酰胺(sulfinic acidamide);亚磺酰酰胺(sulfinamide)): $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地为关于氨基所定义的氨基取代基。氨磺酰基的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$,和 $-\text{S}(=\text{O})\text{NPh}$ 。

[0225] 亚磺酰氨基(sulfonamido)(亚磺酰氨基(sulfinamoyl);磺酰氨基;氨磺酰): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$,其中 R^1 和 R^2 独立地是关于氨基所定义的氨基取代基。亚磺酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$,和 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NPh}$ 。

[0226] 磺氨基: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$,其中 R^1 是关于氨基所定义的氨基取代基。磺氨基的实例包括但不限于 $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ 。

[0227] 磺酰氨基： $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ ，其中 R^1 是关于氨基所定义的氨基取代基，并且 R 为磺酰氨基取代基，例如， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。磺酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0228] 亚磺酰氨基： $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$ ，其中 R^1 是关于氨基所定义的氨基取代基，并且 R 为亚磺酰氨基取代基，例如， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基。亚磺酰氨基的实例包括但不限于 $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ 和 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0229] 膦基（膦）： $-\text{PR}_2$ ，其中 R 为膦基取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。膦基的实例包括但不限于 $-\text{PH}_2$ ， $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$ ，和 $-\text{P}(\text{Ph})_2$ 。

[0230] 二氧膦基： $-\text{P}(=\text{O})_2$ 。

[0231] 氧膦基（氧化膦）： $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$ ，其中 R 为氧膦基取代基，例如， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 C_{1-7} 烷基或 C_{5-20} 芳基。氧膦基的实例包括但不限于 $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$ ，和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$ 。

[0232] 膦酸（膦酰基）： $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0233] 膦酸酯（膦酸(phosphono)酯）： $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ ，其中 R 为膦酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。膦酸酯基团的实例包括但不限于 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ ， $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{P}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ ，和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0234] 磷酸（膦酰氧基）： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$ 。

[0235] 磷酸酯（膦酰氧基酯(phosphonoxy ester)）： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ ，其中 R 为磷酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基或 C_{5-20} 芳基。磷酸酯基团的实例包括但不限于 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ ，和 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$ 。

[0236] 亚磷酸： $-\text{OP}(\text{OH})_2$ 。

[0237] 亚磷酸酯： $-\text{OP}(\text{OR})_2$ ，其中 R 为亚磷酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。亚磷酸酯基团的实例包括但不限于 $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(\text{O-t-Bu})_2$ ，和 $-\text{OP}(\text{OPh})_2$ 。

[0238] 亚磷酰胺(Phosphoramidite)： $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ ，其中 R^1 和 R^2 为亚磷酰胺的取代基，例如， $-\text{H}$ ，（任选取代的） C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。亚磷酰胺基团的实例包括但不限于 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ ，和 $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

[0239] 氨基磷酸酯： $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$ ，其中 R^1 和 R^2 为氨基磷酸酯取代基，例如， $-\text{H}$ ，（任选取代的） C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。氨基磷酸酯基团的实例包括但不限于 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ ，和 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ 。

[0240] 甲硅烷基： $-\text{SiR}_3$ ，其中 R 为甲硅烷基取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。甲硅烷基的实例包括但不限于 $-\text{SiH}_3$ ， $-\text{SiH}_2(\text{CH}_3)$ ， $-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$ ， $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ， $-\text{Si}(\text{Et})_3$ ， $-\text{Si}(\text{iPr})_3$ ， $-\text{Si}(\text{tBu})(\text{CH}_3)_2$ ，和 $-\text{Si}(\text{tBu})_3$ 。

[0241] 氧基甲硅烷基： $-\text{Si}(\text{OR})_3$ ，其中 R 为氧基甲硅烷基取代基，例如， $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基， C_{3-20} 杂环基，或 C_{5-20} 芳基，优选 $-\text{H}$ ， C_{1-7} 烷基，或 C_{5-20} 芳基。氧基甲硅烷基的实例包括但不限

于 $-\text{Si}(\text{OH})_3$, $-\text{Si}(\text{OMe})_3$, $-\text{Si}(\text{OEt})_3$, 和 $-\text{Si}(\text{OtBu})_3$ 。

[0242] 甲硅烷氧基 (甲硅烷基醚) : $-\text{OSiR}_3$, 其中 SiR_3 为甲硅烷基, 如以上所讨论的。

[0243] 氧基甲硅烷氧基 : $-\text{OSi}(\text{OR})_3$, 其中 $\text{OSi}(\text{OR})_3$ 为氧基甲硅烷基, 如以上讨论的。

[0244] 在许多情况下, 取代基本身被取代。

[0245] 例如, C_{1-7} 烷基可以被例如下列各项取代 :

[0246] 羟基 (也称为羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基) ;

[0247] 卤素 (也称为卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基) ;

[0248] 氨基 (也称为氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基) ;

[0249] 羧基 (也称为羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基) ;

[0250] C_{1-7} 烷氧基 (也称为 C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基) ;

[0251] C_{5-20} 芳基 (也称为 C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基)。

[0252] 同样, C_{5-20} 芳基可以被例如下列各项取代 :

[0253] 羟基 (也称为羟基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基) ;

[0254] 卤素 (也称为卤素 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基) ;

[0255] 氨基 (也称为氨基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基, 例如, 如在苯胺中) ;

[0256] 羧基 (也称为羧基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基, 例如, 如在苯甲酸中) ;

[0257] C_{1-7} 烷基 (也称为 C_{1-7} 烷基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基, 例如, 如在甲苯中) ;

[0258] C_{1-7} 烷氧基 (也称为 C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基, 例如, 如在茴香醚中) ;

[0259] C_{5-20} 芳基 (也称为 C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基, 例如, 如在联苯中)。

[0260] 以下描述这种取代的取代基的这些和其它具体实例。

[0261] 羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被羟基代替的 C_{1-7} 烷基。这种基团的实例包括但不限于 $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 和 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 。

[0262] 卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被卤素原子 (例如 F, Cl, Br, I) 代替的 C_{1-7} 烷基。如果超过 1 个氢原子已经被卤素原子代替, 则卤素原子可以独立地是相同或不同的。每一个氢原子都可以被卤素原子代替, 在此情况下, 该基团可以便利地称为 C_{1-7} 全卤代烷基”。这种基团的实例包括但不限于 $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CBr}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$, 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 。

[0263] 氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被氨基代替的 C_{1-7} 烷基。这种基团的实例包括但不限于 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 。

[0264] 羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被羧基代替的 C_{1-7} 烷基。这种基团的实例包括但不限于 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0265] C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“ C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被 C_{1-7} 烷氧基代替的 C_{1-7} 烷基。这种基团的实例包括但不限于 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0266] C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 : 术语“ C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被 C_{5-20} 芳基代替的 C_{1-7} 烷基。这种基团的实例

包括但不限于苄基 (苯甲基, PhCH_2-), 二苯甲基 ($\text{Ph}_2\text{CH}-$), 三苯甲基 (三苯基甲基, $\text{Ph}_3\text{C}-$), 苯乙基 (苯基乙基, $\text{Ph}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 苯乙烯基 ($\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-$), 肉桂基 ($\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$)。

[0267] 羟基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基: 术语“羟基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被羟基取代的 C_{5-20} 芳基。这种基团的实例包括但不限于衍生自下列各项的那些: 苯酚, 萘酚, 焦儿茶酚, 间苯二酚, 对苯二酚, 连苯三酚, 间苯三酚。

[0268] 卤素 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基: 术语“卤素 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被卤素 (例如 F, Cl, Br, I) 基团取代的 C_{5-20} 芳基。这种基团的实例包括但不限于卤代苯基 (例如, 氟苯基, 氯苯基, 溴苯基或碘苯基, 无论是邻-, 间-, 或对-取代), 二卤代苯基, 三卤代苯基, 四卤代苯基, 和五卤代苯基。

[0269] C_{1-7} 烷基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基: 术语“ C_{1-7} 烷基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中至少一个氢原子 (例如, 1 个, 2 个, 3 个) 已经被 C_{1-7} 烷基取代的 C_{5-20} 芳基。这种基团的实例包括但不限于甲苯基 (来自甲苯), 二甲苯基 (来自二甲苯), 茛基 (来自茛), 和枯烯基 (或枯基, 来自枯烯), 和杜基 (duryl) (来自杜烯)。

[0270] 羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基。羟基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基的实例包括但不限于 $-\text{OCH}_2\text{OH}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 和 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。

[0271] 卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基。卤素 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基的实例包括但不限于 $-\text{OCF}_3$, $-\text{OCHF}_2$, $-\text{OCH}_2\text{F}$, $-\text{OCCl}_3$, $-\text{OCBr}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{OCH}_2\text{CHF}_2$, 和 $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 。

[0272] 羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基。羧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基的实例包括但不限于 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 和 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0273] C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为 C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基。 C_{1-7} 烷氧基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基的实例包括但不限于 $-\text{OCH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, 和 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 。

[0274] C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为 C_{5-20} 芳基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基。这种基团的实例包括但不限于苄氧基, 二苯甲氧基, 三苯甲氧基, 苯乙氧基, 苯乙烯氧基, 和 cimmamyloxy。

[0275] C_{1-7} 烷基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳氧基: $-\text{OR}$, 其中 R 为 C_{1-7} 烷基 $-\text{C}_{5-20}$ 芳基。这种基团的实例包括但不限于甲苯氧基, 二甲苯氧基, 茛氧基, 枯烯氧基, 和杜氧基 (duryloxy)。

[0276] 氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 - 氨基: 术语“氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 - 氨基”, 如在本文中所使用的, 涉及其中取代基 R^1 或 R^2 中的一个本身是氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基 ($-\text{C}_{1-7}$ 烷基 $-\text{NR}^3\text{R}^4$) 的氨基 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 。氨基 $-\text{C}_{1-7}$ 烷基氨基可以由例如式 $-\text{NR}^1-\text{C}_{1-7}$ 烷基 $-\text{NR}^3\text{R}^4$ 表示。这种基团的实例包括但不限于式 $-\text{NR}^1(\text{CH}_2)_n\text{NR}^1\text{R}^2$ 的基团, 其中 n 为 1 至 6 (例如, $-\text{NHCH}_2\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$), $-\text{NHCH}_2\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}(\text{Me})$, $-\text{NHCH}_2\text{NH}(\text{Et})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{Et})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{Et})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{Et})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}(\text{Et})$, 和 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}(\text{Et})$ 。

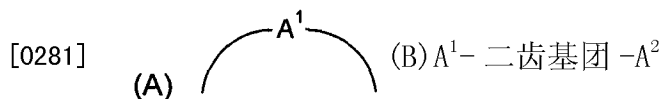
[0277] 二齿取代基和二齿试剂

[0278] 术语“二齿取代基”, 如在本文中所使用的, 涉及具有两个共价连接点的取代基, 并且其起两个其它部分之间的连接基团的作用。

[0279] 术语“二齿试剂”, 如在本文中所使用的, 涉及具有可以用作共价连接点的两个官能团的试剂。此二齿试剂可以用于产生具有二齿取代基的产物。

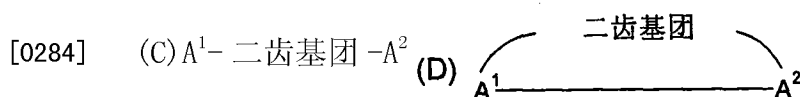
[0280] 在一些情况 (A) 中, 二齿取代基共价结合到单个原子 (A^1)。在一些情况 (B) 中, 二

齿取代基共价结合到两个不同的原子 (A^1 和 A^2), 并且因此起它们之间的连接基团的作用。



[0282] 二齿基团

[0283] 在 (B) 中, 在一些情况 (C) 中, 二齿取代基共价结合到两个不同的原子, 所述两个不同的原子本身不以其它方式共价连接 (直接地, 或经由中间基团)。在一些情况 (D) 中, 二齿取代基共价结合到两个不同的原子, 所述两个不同的原子本身已经共价连接 (直接地, 或经由中间基团); 在这样的情况中, 产生环状结构。在一些情况中, 二齿基团在母体基团中共价结合到邻近原子即相邻原子。



[0285] 在一些情况 (A 和 D) 中, 二齿基团与其连接的一个或多个原子 (以及任何中间原子, 如果存在的话) 一起形成另外的环状结构。以此方式, 二齿取代基可以产生可以是芳族的环状或多环 (例如, 稠合的, 桥接的, 螺的) 结构。

[0286] 二齿基团的实例包括但不限于 C_{1-7} 亚烷基, C_{3-20} 亚杂环基, 和 C_{5-20} 亚芳基, 以及它们的取代形式。

[0287] 载体

[0288] 本文中所述的载体可以是允许从含有物质的混合物中物理分离化合物的任何结构。载体可以是固体载体或可溶载体。

[0289] 固体载体可以是对其可以连接 (经常经由连接体) 的化合物或试剂不溶的、官能化的聚合物材料, 从而允许容易地将它们从过量试剂, 可溶反应副产物或溶剂中分离 (通过过滤, 离心等)。

[0290] 可溶载体可以是使得化合物在用于文库合成 (library synthesis) 的条件下可溶的附着物 (attachment), 但是在期望时, 通过一些简单的物理方法可以容易地将其从大多数的其它可溶组分分离。此方法被称为液相化学。可溶载体的实例包括线性聚合物例如聚 (乙二醇), 树状聚体 (dendrimer) 或选择地分配在富氟溶剂中的氟化物。

[0291] 载体可以采取任何物理形式。除了别的以外, 载体可以是粒子或珠子, 膜, 筛, 管, 圆柱体, 光纤。除了别的以外, 载体还可以是粒子或珠子, 膜, 筛, 管, 圆柱体上的衬层 (lining)。

[0292] 载体可以是磁性的, 或包含磁性材料。载体可以是铁磁的或顺磁的。

[0293] 载体可以是具有或没有外部涂层的粒子。该粒子可以具有聚合物材料的固体核或金属的核, 或两者的混合物。金属可以处于金属形式或处于盐形式。

[0294] 载体可以是聚合物, 例如聚 (苯乙烯) 或多糖, 或载体可以是树状聚体, 优选高代树状聚体 (high generation dendrimer)。

[0295] 载体可以是金属例如金, 或金属氧化物或其它金属盐。

[0296] 载体可以是玻璃, 典型地, 以纤维或载片的形式。

[0297] 载体可以是半导体材料, 典型地, 以晶片 (wafer) 的形式。

[0298] 载体可以是芯片 (chip) 或其它这种表面, 用于与分析装置例如 SPR (表面等离子

体共振 (surface plasmon resonance)) 装置一起使用。

[0299] 优选地,载体是相对惰性的。即,载体对物质应当优选具有很小的亲和力或没有亲和力。载体可以涂敷有将非特异结合最小化的材料。

[0300] 术语“载体”还可以表示具有刚性或半刚性表面的材料,所述刚性或半刚性表面含有或可以衍生化至含有可以用于将化合物共价连接到其表面上的反应性官能团。这种材料在本领域中是熟知的并且包括,例如,含有反应性 Si-OH 基团的二氧化硅载体,聚丙烯酰胺载体,聚苯乙烯载体,聚乙二醇载体等。载体可以是具有官能团的混合物的载体。例如,载体可以具有其上接枝有聚乙二醇的聚苯乙烯主链。这种载体作为 Tentagel™ 获得。这种载体可以采取小珠子,针/冠 (pins/crowns),层状表面,小球,片的形式。还可以使用其它常规形式。

[0301] 将理解的是,载体可以具有连接体可以连接的官能部位。

[0302] 载体的精确‘负载量 (loading)’,每单位质量的可用官能部位的数量将取决于载体的确切性质。负载量可以由该载体的商业供应者提供。负载量还可以由现有技术中已知的方法例如元素分析,¹H 和 ¹³C NMR 中的任何一种在实验上测量。负载量还可以从由对载体增加化合物或从载体除去化合物得出的质量差别计算来确定。这可以伴随有光谱测量,例如基于所谓的‘Fmoc 计数 (count)’的那些。

[0303] 为了便利,在本文中绘制载体的情况下,显示载体连接到仅一个连接体。然而,载体上的官能团的实际数量将比这高得多。商购的树脂载体例如氨甲基化的聚苯乙烯在任何地方都可以具有 0.25-0.75mmolg⁻¹ 的氨基官能团。载体例如 Sepharose 载体 C1-6B (一种基于琼脂糖的载体) 可以具有约 24 μmolg⁻¹ 的负载量。

[0304] 连接体

[0305] 本发明的化合物可以通过连接体连接到载体上。连接体可以是直接键 (direct bond) 或基团例如任选取代的 C₁₋₂₀ 烷基或任选取代的 C₅₋₂₀ 芳基。可以提供连接体用于帮助分析或用于提供将允许化合物从载体上裂解的官能团。连接体还可以提供能够与感兴趣的物质相互作用的结构或官能单元。

[0306] 连接体可以是能够从固体载体释放化合物的可裂解连接体。备选地,连接体可以是不可裂解的连接体。连接体可以是柔性连接体。

[0307] 当将连接体裂解以从载体释放化合物时,可以作为被释放的化合物的一部分包括连接体结构的一部分。备选地,化合物可以在不包括连接体分子的任何部分的情况下被释放。可以释放化合物,从而在化合物上留下官能团‘残根 (stub)’例如羧酸基,或在化合物上留下氢。能够实现后者的连接体称为无痕迹连接体。

[0308] 除了别的以外,可以用于本发明的化合物的连接体有基于 Wang, HMPB, HMPA, 齐白酰胺 (Sieber amide), Rink 酰胺 (Rink amide), FMPB, DHP, 氯代三苯甲基,胍基苯甲酰,氨磺酰基丁酰 (sulfamylbutyryl), 脲, 和 MBHA 的连接体。这样的连接体可以广泛地获自商业来源。参见,例如, Nova 生物化学目录 (Novabiochem Catalog) 2006/2007。

[0309] 备选地,连接体可以是非商业连接体。

[0310] 还可以的是,连接基团是提供在固体载体上的简单官能团,例如胺,并且在此情况下,连接基团可能不容易裂解。此类型的连接基团在集合的合成中是有用的,所述集合将进行其中不需要裂解的珠上筛选 (on-beadscreening) (参见以下)。这样的树脂可以商购自

大量的公司,包括NovaBiochem,高级化学技术(Advanced ChemTech)和Rapp Polymere。这些树脂包括氨基-Tentagel,和氨基甲基化聚苯乙烯树脂。

[0311] 连接体可以在多种条件下裂解,并且为了在本发明中使用而选择的连接体可以

[0312] 连接体另外可以在载体和连接体官能团之间包括间隔基(spacer)。可以包括间隔基以避免吸附和脱附方法过程中的空间位阻。典型地,间隔基是短的,柔性的烷基。

[0313] 包括其它形式

[0314] 包括在以上内容中的是这些取代基的众所周知的离子,盐,溶剂合物和受保护形式。例如,对于式(I),(II),(III)或(IV)的化合物中的取代基羧酸(-COOH)的引用还包括阴离子(羧酸酯)形式(-COO⁻),其盐或溶剂合物,以及常规受保护形式。类似地,对于式(I),(II),(III)或(IV)的化合物中的取代基氨基的引用包括氨基的质子化形式(-NH⁺HR¹R²),盐或溶剂合物,例如盐酸盐,以及氨基的常规受保护形式。类似地,对于式(I),(II),(III)或(IV)的化合物中的取代基羟基的引用还包括羟基的阴离子形式(-O⁻),其盐或溶剂合物,以及常规受保护形式。

[0315] 异构体

[0316] 某些化合物可以以一种或多种具体的几何,光学,对映异构,非对映异构,差向异构,立体异构,互变异构,构象或端基异构形式存在,包括但不限于顺-和反-形式;E-和Z形式;c-,t-,和r-形式;内-和外-形式;R-,S-,和内消旋-形式;D-和L-形式;d-和l-形式;(+)和(-)形式;酮-,烯醇-,和烯醇化物-形式;顺(syn)-和反(anti)-形式;顺错-和反错-形式; α -和 β -形式;轴向和平伏形式;船-,椅-,扭转-,信封-,和半椅-形式;和它们的组合,以下总称为“异构体”(或“异构形式”)。

[0317] 如果化合物处于结晶形式,则它可以以许多不同的多晶型形式存在。

[0318] 注意的是,除以下关于互变异构形式所讨论的以外,特别排除在如在本文中所使用的术语“异构体”以外的是结构(或构造)异构体(即,区别在于原子之间的连接而非仅由原子在空间的位置区别的异构体)。例如,对于甲氧基-OCH₃的引用不应当理解为是对它的结构异构体羟甲基-CH₂OH的引用。类似地,对于邻氯苯基的引用不应当理解为是对它的结构异构体间氯苯基的引用。然而,对于结构种类的引用可以完全包括落入该种类之内的结构异构体形式(例如,C₁₋₇烷基包括正丙基和异丙基;丁基包括正-,异-,仲-和叔-丁基;甲氧基苯基包括邻-,间-和对-甲氧基苯基)。

[0319] 以上排除的内容不涉及互变异构形式,例如,酮-,烯醇-,和烯醇化物-形式,如例如在下列互变异构对中:酮/烯醇,亚胺/烯胺,酰胺/亚氨基醇,脘/脘,亚硝基/肟,硫酮/烯硫醇(enethiol),N-亚硝基/羟基偶氮,和硝基/异硝基。

[0320] 注意的是,特别包括在术语“异构体”中的是具有一个或多个同位素取代的化合物。例如,H可以是任何的同位素形式,包括¹H,²H(D),和³H(T);C可以是任何的同位素形式,包括¹²C,¹³C,和¹⁴C;O可以是任何的同位素形式,包括¹⁶O和¹⁸O;等。

[0321] 除非另外规定,对于具体化合物的引用包括所有这种异构形式,包括它的(全部地或部分地)外消旋物以及其它的混合物。用于这种异构形式的制备(例如不对称合成)和分离(例如分步结晶和层析手段)的方法在现有技术中是已知的,或通过以已知的方式更改本文中教导的方法或已知方法而容易得到。

[0322] 除非另外规定,对于具体化合物的参考还包括其离子,盐,溶剂合物和受保护形

式,例如,如在以下讨论的,以及它的不同多晶型形式。

[0323] 盐和离子

[0324] 例如,如果化合物是阴离子的或具有可以是阴离子的官能团(例如 $-\text{COOH}$ 可以是 $-\text{COO}^-$),则可以与适当的阳离子形成盐。适当的无机阳离子的实例包括但不限于碱金属离子例如 Na^+ 和 K^+ ,碱土金属阳离子例如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,和其它阳离子例如 Al^{3+} 。适当的无机阳离子的实例包括但不限于铵离子(即, NH_4^+)和取代的铵离子(例如, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+)。一些适当的取代的铵离子的实例是衍生自下列各项的那些:乙胺,二乙胺,二环己胺,三乙胺,丁胺,乙二胺,乙醇胺,二乙醇胺,哌嗪,苜胺,苯基苜胺,胆碱,葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸例如赖氨酸和精氨酸。普通季铵离子的实例是 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 。

[0325] 如果化合物是阳离子的或具有可以是阳离子的官能团(例如, $-\text{NH}_2$ 可以是 $-\text{NH}_3^+$),则可以与适当的阴离子形成盐。适当的无机阴离子的实例包括但不限于衍生自下列无机酸的那些:盐酸,氢溴酸,氢碘酸,硫酸,亚硫酸,硝酸,亚硝酸,磷酸和亚磷酸。适当的有机阴离子的实例包括但不限于衍生自下列有机酸的那些:乙酸,丙酸,琥珀酸,甘醇酸(glycolic),硬脂酸,棕榈酸,乳酸,苹果酸,扑酸,酒石酸,柠檬酸,葡萄糖酸,抗坏血酸,马来酸,羟基马来酸,苯基乙酸,谷氨酸,天冬氨酸,安息香酸,肉桂酸,丙酮酸,水杨酸,磺胺酸,2-乙酰氧基(acetyoxy)苯甲酸,富马酸,甲苯磺酸,甲磺酸,乙磺酸,乙烷二磺酸,草酸,羟乙磺酸,戊酸和葡糖酸。适当的聚合物阴离子的实例包括但不限于衍生自下列聚合物酸的那些:丹宁酸,羧甲基纤维素。

[0326] 受保护的形式

[0327] 可以便利或期望的是制备,纯化和/或操作以在化学上受保护形式的活性化合物。术语“在化学上受保护形式”,如在本文中所使用的,涉及其中一个或多个反应性官能团被保护免于不期望的化学反应,即以受保护或保护基团(也称为被掩蔽或掩蔽基团或被封阻或封阻基团)的形式的化合物。通过保护反应性官能团,可以进行涉及其它未保护反应性官能团的反应,而不影响受保护的基团;通常在随后的步骤中除去保护基团,而不显著影响分子的剩余部分。参见,例如,“保护基团无机合成(Protective Groups inorganic Synthesis)”(T. Green 和 P. Wuts;第三版;John Wiley&Sons,1999)。

[0328] 例如,可以将羟基作为醚($-\text{OR}$)或酯($-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$)保护,例如,作为:叔丁基醚;苜基,二苜甲基(二苜基甲基),或三苜甲基(三苜基甲基)醚;三甲基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷基醚;或乙酰基醚($-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{OAc}$)。

[0329] 例如,可以将醛或酮基分别作为乙缩醛或缩酮保护,其中通过与例如伯醇反应将羰基($>\text{C}=\text{O}$)转化成二醚($>\text{C}(\text{OR})_2$)。通过在酸存在下使用大大过量的水水解容易再生成醛或酮基。

[0330] 例如,可以将胺基作为例如酰胺或氨基甲酸酯保护,例如作为:甲基酰胺($-\text{NHCO}-\text{CH}_3$);苜氧基酰胺($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Cbz}$);作为叔丁氧基酰胺($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{NH}-\text{Boc}$);2-二苜基-2-丙氧基酰胺($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Bpoc}$),作为9-苜基甲氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Fmoc}$),作为6-硝基苜氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Nvoc}$),作为2-三甲基甲硅烷基乙氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Teoc}$),作为2,2,2-三氯乙氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Troc}$),作为烯丙氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Alloc}$),作为2(-苜基磺酰基)乙氧基酰胺($-\text{NH}-\text{Psec}$);或在适当的情况下,作为N-氧化物($>\text{NO}\cdot$)。

[0331] 例如,可以将羧基作为酯保护,例如作为: C_{1-7} 烷基酯(例如甲酯;叔丁酯); C_{1-7} 卤代烷基酯(例如 C_{1-7} 三卤代烷基酯);三 C_{1-7} 烷基甲硅烷基- C_{1-7} 烷基酯;或 C_{5-20} 芳基- C_{1-7} 烷基酯(例如苄基酯;硝基苄基酯);或作为酰胺,例如,作为甲基酰胺。

[0332] 例如,可以将硫羟基作为硫醚(-SR)保护,例如,作为:苄基硫醚;乙酰氨基甲基醚(-S-CH₂NHC(=O)CH₃)。

[0333] 在对衍生自氨基酸的基团进行引用的情况下,在适当的情况下,可以保护氨基-,羧基-或侧链官能团。对于氨基,保护基团可以选自由Fmoc, Boc, Ac, Bn 和 Z(或Cbz)组成的基团。侧链还可以根据需要保护。对于侧链,根据需要,侧链保护基团可以选自以下组成的组:Pmc, Pbf, OtBu, Trt, Acn, Mmt, tBu, Boc, ivDde, 2-ClTrt, tButhio, Npys, Mts, NO₂, Tos, OBzl, OcHx, Acn, pMeBzl, pMeOBz, OcHx, Bom, Dnp, 2-Cl-Z, Bzl, For, 和 2-Br-Z。可以将羧基作为酯例如甲基酯保护。

[0334] 优选

[0335] 以下描述本发明的第四方面的优选化合物。对本发明的第四方面的式(III)和(IV)化合物的优选也可以适用于根据本发明的第一方面的集合的每一种化合物式(I)和(II)。

[0336] 仅关于式(III)和(I)的化合物进行对R²的引用。

[0337] 该优选还独立地适用于用于在本发明的第三,第九和第十方面的方法中使用的组分。

[0338] 下列优选可以根据需要以任何组合的形式组合。

[0339] 载体

[0340] 优选地,载体包括玻璃,金,聚苯乙烯,多糖,聚丙烯酰胺或聚(烷氧化物)。载体可以是多糖,更优选地,琼脂糖。

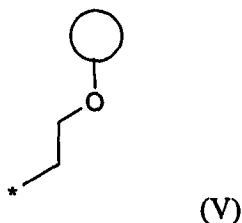
[0341] 连接体

[0342] 连接体另外可以在连接体和连接点之间包括间隔基。间隔基可以是任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基。间隔基可以是任选取代的 C_{1-6} 烷基。

[0343] 连接体本身是可以从具有亲和力片段的载体除去的分析连接体。这种连接体在现有技术中是熟知的。

[0344] 优选地,连接体与载体一起由式(V)表示:

[0345]



[0346] 其中星号“*”是连接点,并且圆圈表示载体。

[0347] 在R^{1a}和R^{1b}之一是包含连接到载体的连接体的基团的情况下,则连接体优选是衍生自醛-官能化连接体的连接体。除了别的以外,连接体与载体一起可以衍生自甲酰基聚苯乙烯,tentagel 缩醛树脂,3-甲酰基吡啶基)乙酰氨基甲基聚苯乙烯或 Garner 醛官能化

的氨基-甲基化聚苯乙烯。

[0348] 在 R^{1a} 和 R^{1b} 之一是包含连接到载体的连接体的基团的情况下, 优选连接体由式 (V) 表示。

[0349] 在 R^2 是包含连接到载体的连接体的基团的情况下, 则连接体优选是衍生自胺-官能化连接体的连接体。除了别的以外, 连接体与载体一起可以衍生自氨基-甲基化的聚苯乙烯, 3-氨基-苯氧基甲基聚苯乙烯, 氨基甲基 NovaGel (TM), Tentagel (TM) 氨基乙基, 氨基 PEGA, [G 1,3]-氨基树状聚体聚苯乙烯, MBHA, 氨基-(4-甲氧基苯基) 甲基聚苯乙烯, Rink 酰胺树脂, 羟胺 Wang 树脂和氨磺酰树脂。

[0350] 在 R^4 是包含连接到载体的连接体的基团的情况下, 则连接体优选是衍生自羧基-官能化连接体的连接体。除了别的以外, 连接体与载体一起可以衍生自羧基聚苯乙烯和 Tentagel (TM) 羧基树脂。

[0351] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 和 R^7

[0352] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 和 R^7 可以任选被取代或任选根据需要被进一步取代。

[0353] 烷基可以是 C_{1-10} 烷基, 优选 C_{1-6} 烷基。

[0354] 芳基可以是 C_{5-20} 芳基, 优选 C_{5-7} 芳基。备选地, 芳基可以是 C_{10-20} 芳基。

[0355] 杂环基可以是 C_{5-20} 杂环基, 优选 C_{5-7} 杂环基。备选地, 杂环基可以 C_{10-20} 杂环基。

[0356] 在 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或多个与它们结合的原子一起形成环的情况下, 该环优选为 C_{5-20} 杂环基。 C_{5-20} 杂环基可以具有 C_{5-20} 芳基取代基。

[0357] 优选地, R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个与它们结合的原子一起形成环。在所述其它基团中的两个选自 R^2 , R^3 , R^4 和 R^{1a} 或 R^{1b} 的情况下, 所述两个一起可以称为二齿取代基。

[0358] 在取代基 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 不包含连接到载体的连接体的情况下, 取代基为任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基。优选地, 烷基或芳基被取代。

[0359] 任选取代的 C_{1-20} 烷基, 任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基可以含有允许对化合物进行定位和/或鉴定的分析标记。分析标记可以是例如通过光谱方法在分析时提供特征信号的基团。在一个实施方案中, 标记是荧光标记。另外地或备选地, 标记可以由一种或多种同位素, 包括放射性同位素提供。例如通过提供独特的同位素谱图, 该标记可以帮助通过质谱法检测和鉴定从载体裂解的产物。标记还可以帮助通过 NMR 的分析, 在此情况下, 标记中的同位素可以增加在 NMR 光谱中观察到的信号的强度。用于标记的同位素实例包括但不限于 2H (D) 和 ^{13}C 。这种分析允许了在不需从载体除去片段的情况下研究化合物。

[0360] 标记可以包括具有特征 IR 拉伸频率的官能团。标记可以包括这样的官能团, 所述官能团能够与试剂反应, 所述反应的产物能够指示存在相应的化合物。反应产物可以是允许通过眼睛鉴定的着色产物。

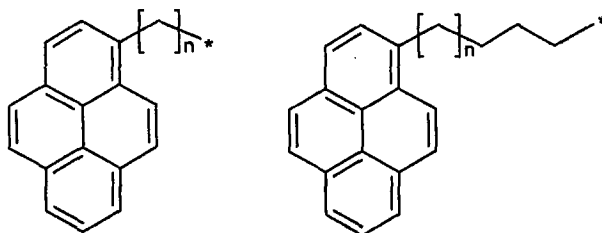
[0361] 标记可以是荧光的或发光的, 或着色的, 使得连接到标记的载体将对于眼睛是可视的。这种标记还允许在不需从载体除去片段的情况下研究化合物。

[0362] 在化合物包含可裂解连接体的情况下, 可以将该连接体裂解以释放分析用片段。以上关于连接体描述了裂解策略。备选地, 标记本身可以从树脂裂解。

[0363] 其它标记对于本领域技术人员而言将是已知的。

[0364] 芳基可以是荧光的。芳基可以是芘。优选地，芘选自下组：

[0365]



[0366] 其中 n 为 0 或 1, 并且星号表示连接点。

[0367] 取代的 C_{1-20} 烷基, 取代的 C_{3-20} 杂环基或取代的 C_{5-20} 芳基可以被独立地选自以下组成的组的一个或多个取代基取代: 缩醛基, 半缩醛基, 烷氧基, 缩酮基, 半缩酮基, 氧代, 硫酮, 亚氨基, 甲酰基, 卤素, 羟基, 硫代羧基, 巯基羧基, 亚氨酸, 异羟肟酸, 硫羧基, 醚, 硝基, 氰基, 醚, 硝基, 亚硝基, 叠氮基, 氰酰基, 异氰酰基, 氰硫基, 异氰硫基, 氰基, 酰基, 羧基, 酯, 酰氨基, 氨基, 胍基, 四唑基, 亚氨基, 脒, 酰氨基, 脲基, 酰氧基, 硫醇, 二硫化物, 硫醚, 亚砜, 磺酰基, 硫代酰氨基, 亚磺酰氧基, 硫酸酯, 亚磺酰氨基, 磺酸酯, 磺氨基, 膦基, 二氧膦基, 氧膦基, 膦酸, 膦酸酯, 磷酸酯, 磷酸, 亚磷酸, 亚磷酸胺, 氨基磷酸酯, 甲硅烷基, 氧基甲硅烷基, 甲硅烷氧基, 氧基甲硅烷氧基和磺酰氨基。另外, 烷基取代基本身可以被芳基或杂环基取代, 反之亦然。

[0368] 最优选地, 取代的 C_{1-20} 烷基, 取代的 C_{3-20} 杂环基或取代的 C_{5-20} 芳基被独立地选自以下组成的组的一个或多个取代基取代: 羟基, 卤素, 硝基, 磺酸, 亚磺酰氨基, 氧代, 硫酮基, 羧基, 氨基, 硼酸, 酰氨基, 硫代酰氨基。另外, 烷基取代基本身可以被芳基或杂环基取代, 反之亦然。

[0369] 优选的芳基或烷基取代基本身可以被选自优选取代基列表的一个或多个取代基取代。

[0370] R^{1a} 和 R^{1b}

[0371] 在 R^{1a} 和 R^{1b} 不是包含连接到载体的连接体的基团的情况下, 则 R^{1a} 和 R^{1b} 可以都是氢。

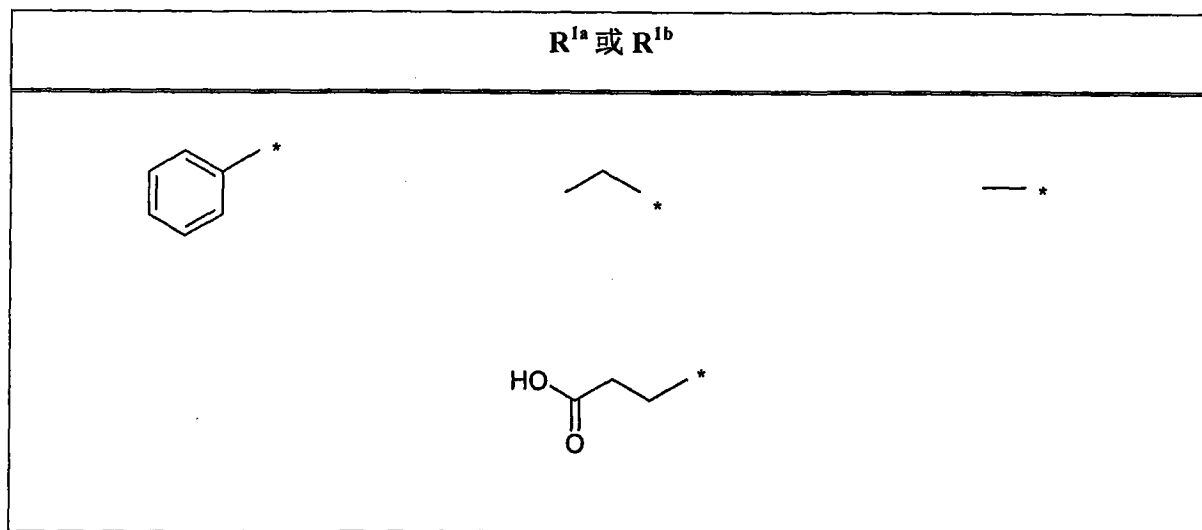
[0372] 优选地, R^{1a} 是包含连接到载体的连接体的取代基。

[0373] 在 R^{1b} 不是包含连接到载体的连接体的取代基的情况下, 则优选 R^{1b} 为氢。

[0374] 优选地, R^{1b} 为氢。

[0375] 在 R^{1a} 或 R^{1b} 的任一个不是包含连接到载体的连接体的取代基的情况下, 则 R^{1a} 或 R^{1b} 可以独立地选自在下表中给出的取代基列表:

[0376]

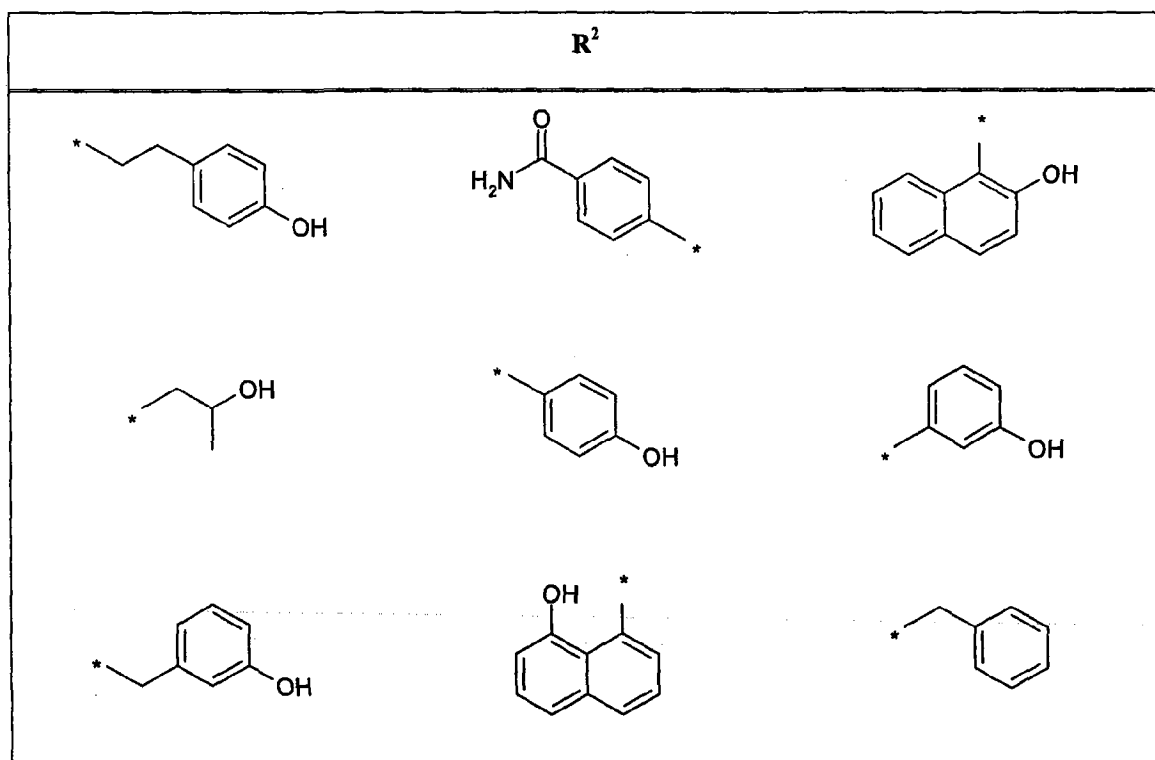


[0377] 其中星号 ‘*’ 表示连接点。

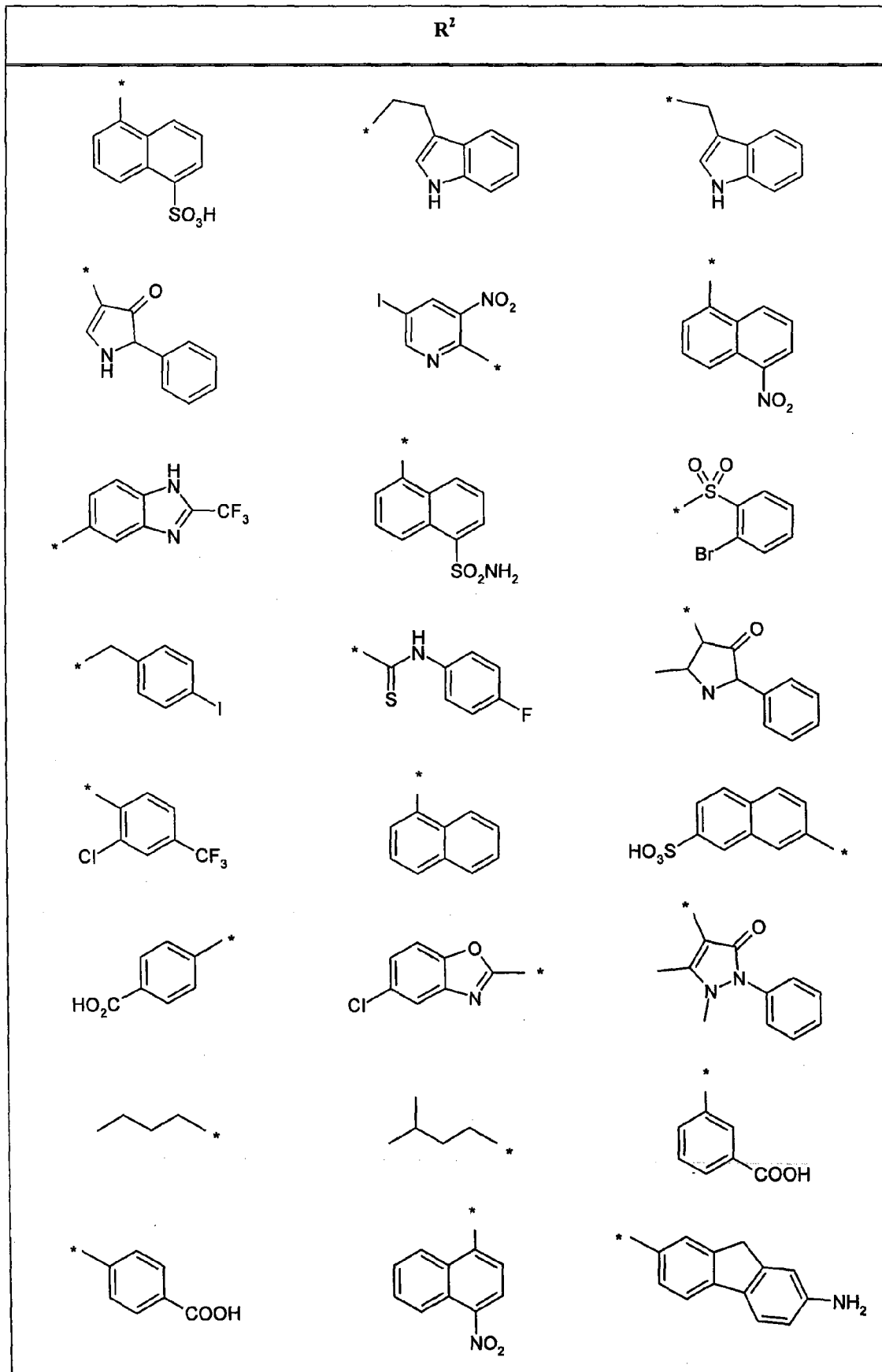
[0378] R²

[0379] 在 R² 不是包含连接到载体的连接体的基团的情况下, 则 R² 可以选自在下表中给出的取代基列表:

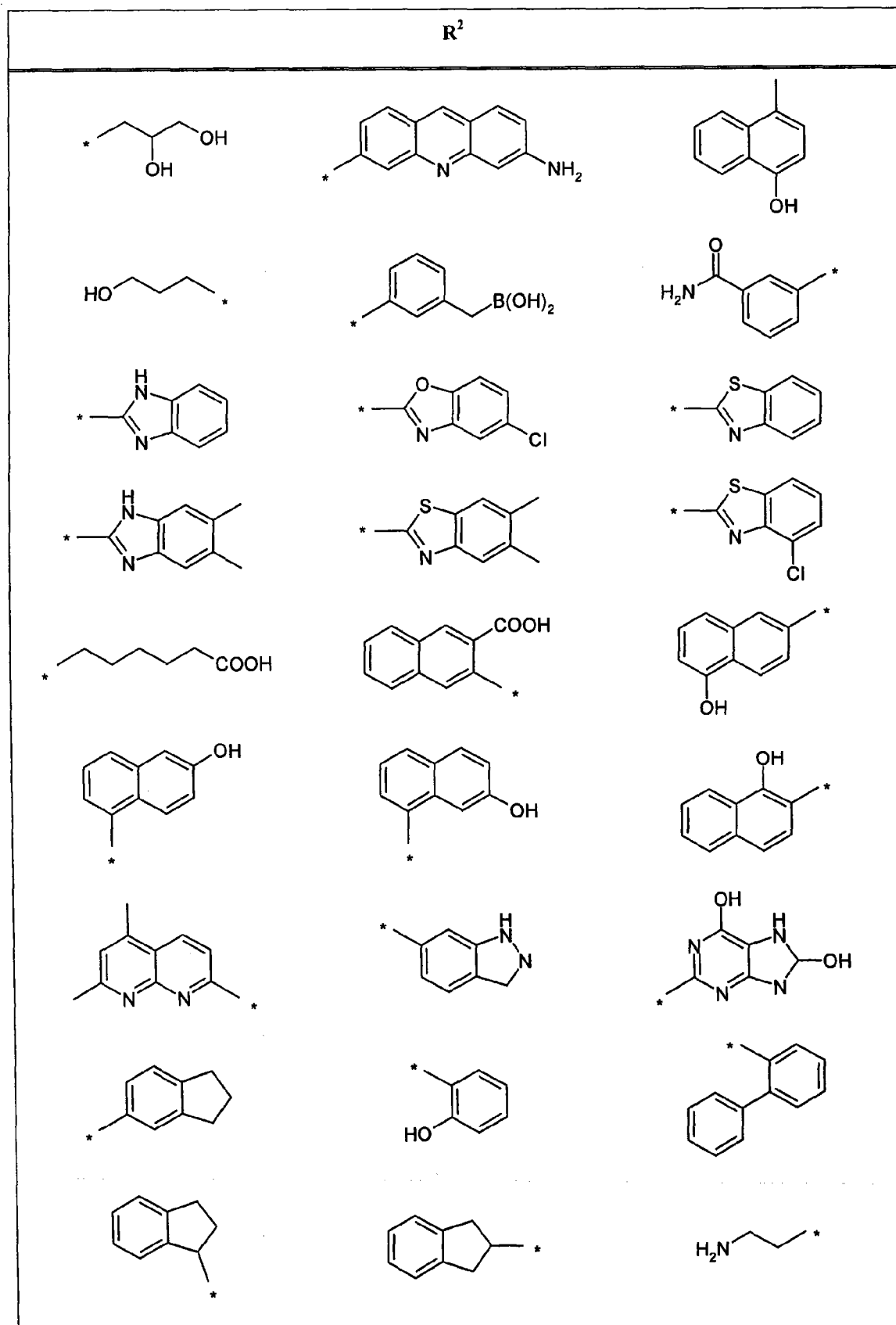
[0380]



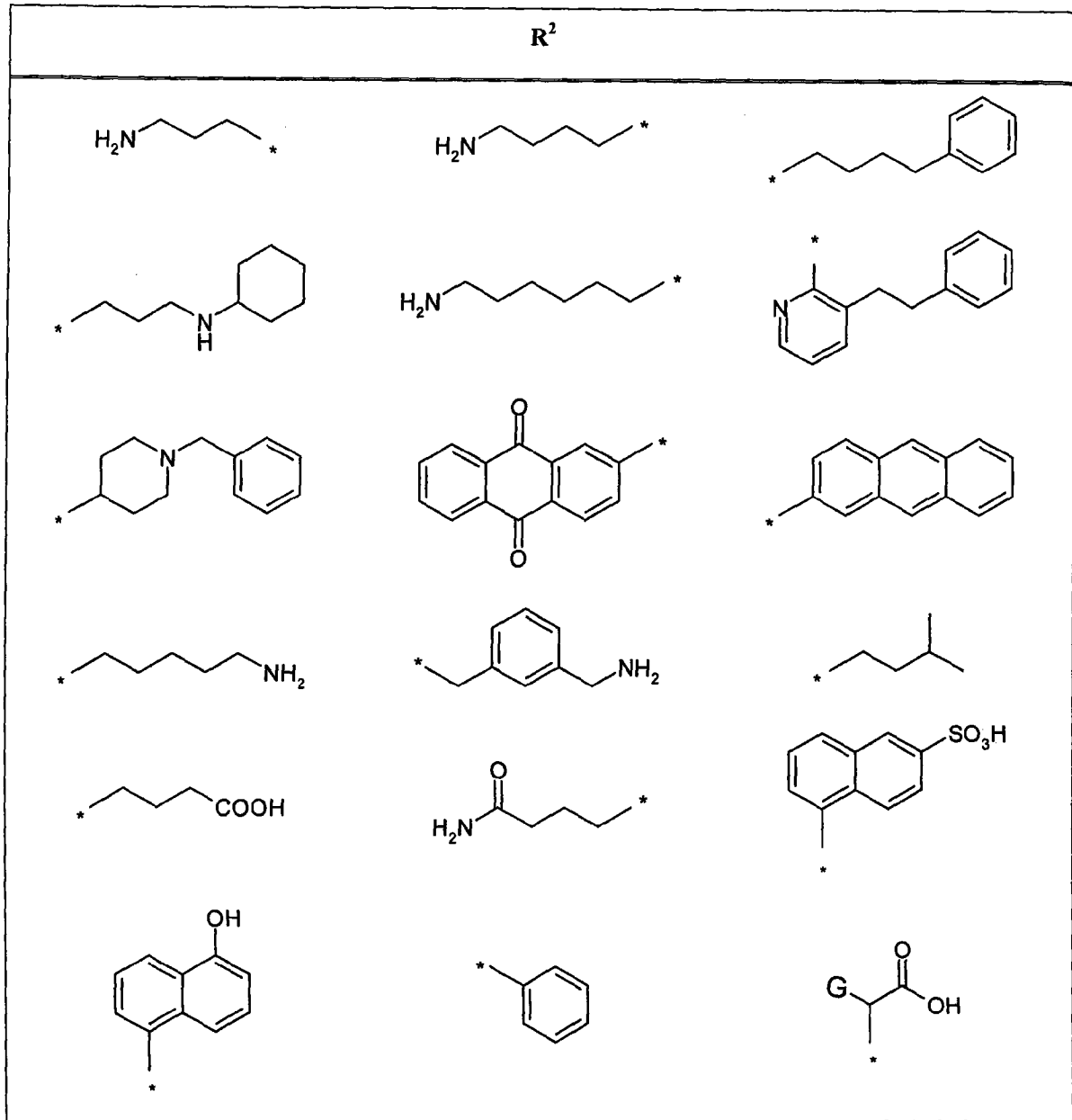
[0381]



[0382]



[0383]

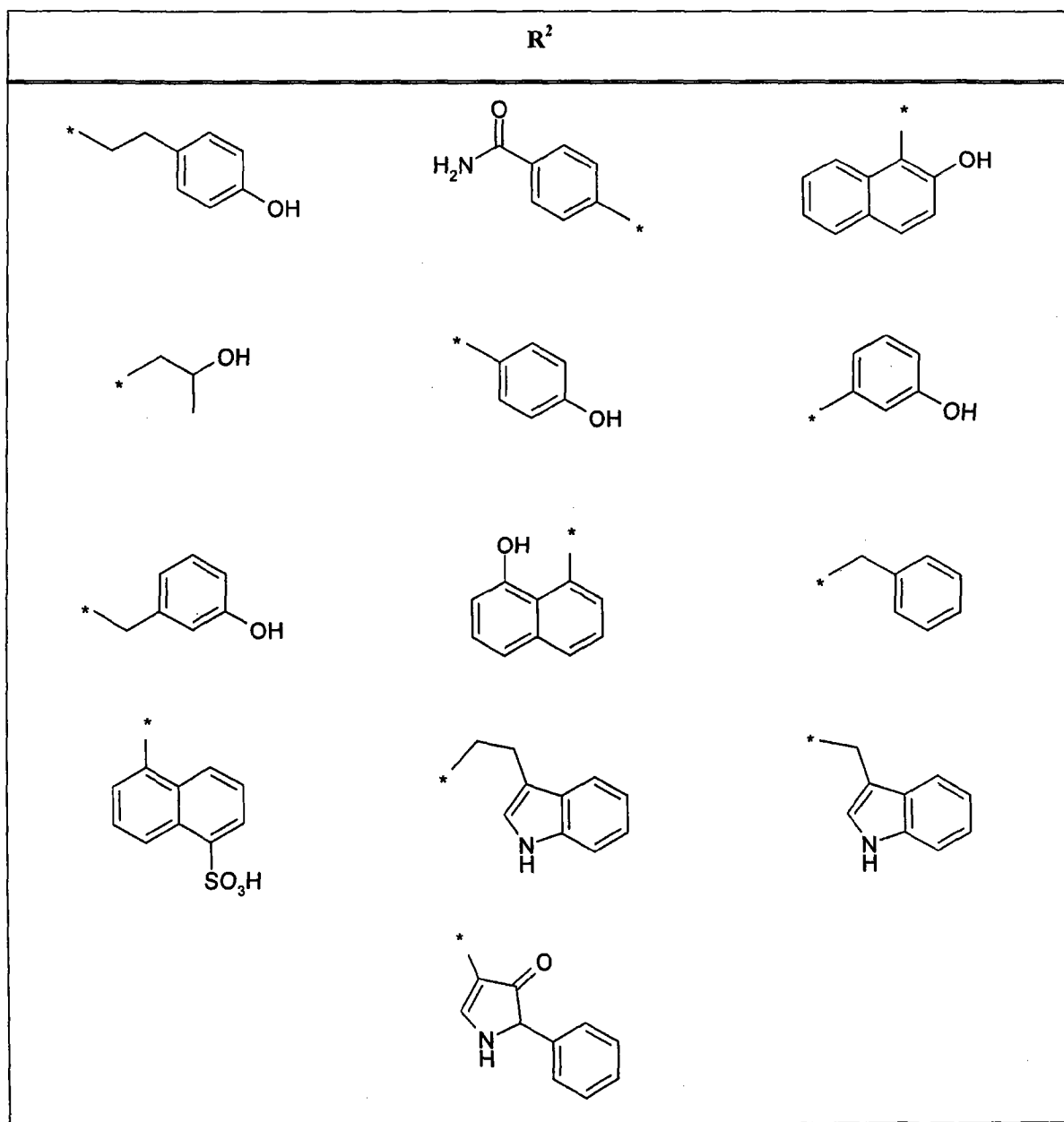


[0384] 其中星号 ‘*’ 表示连接点。

[0385] 在上表中, G 表示氨基酸侧链。例如, 关于甘氨酸, G 是 -H, 并且关于丙氨酸, G 是 $-\text{CH}_3$ 。G 可以任何天然或非天然氨基酸侧链。优选地, 侧链是丙氨酸, 精氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 半胱氨酸, 谷氨酸和谷氨酰胺, 甘氨酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 蛋氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸或缬氨酸的侧链。 R^2 氨基酸可以衍生自 L- 或 D- 氨基酸。

[0386] 在 R^2 不是包含连接到载体的基团的情况下, 则最优选取代基选自在下表中给出的列表:

[0387]

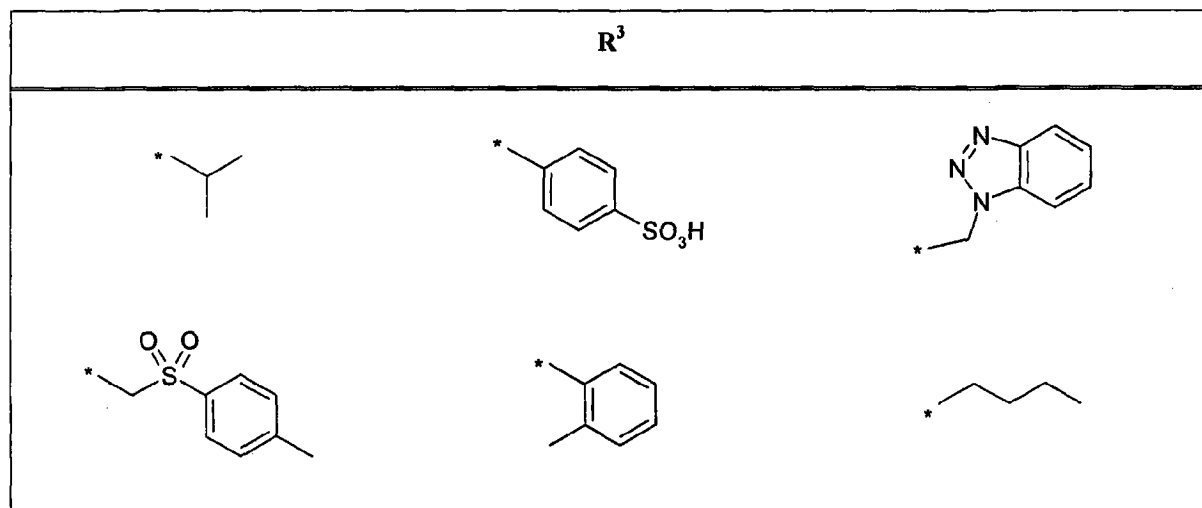


[0388] 其中星号 ‘*’ 表示连接点。

[0389] R^3

[0390] 在 R^3 不是包含连接到载体的基团的情况下, 则 R^3 可以选自在下表中给出的列表:

[0391]

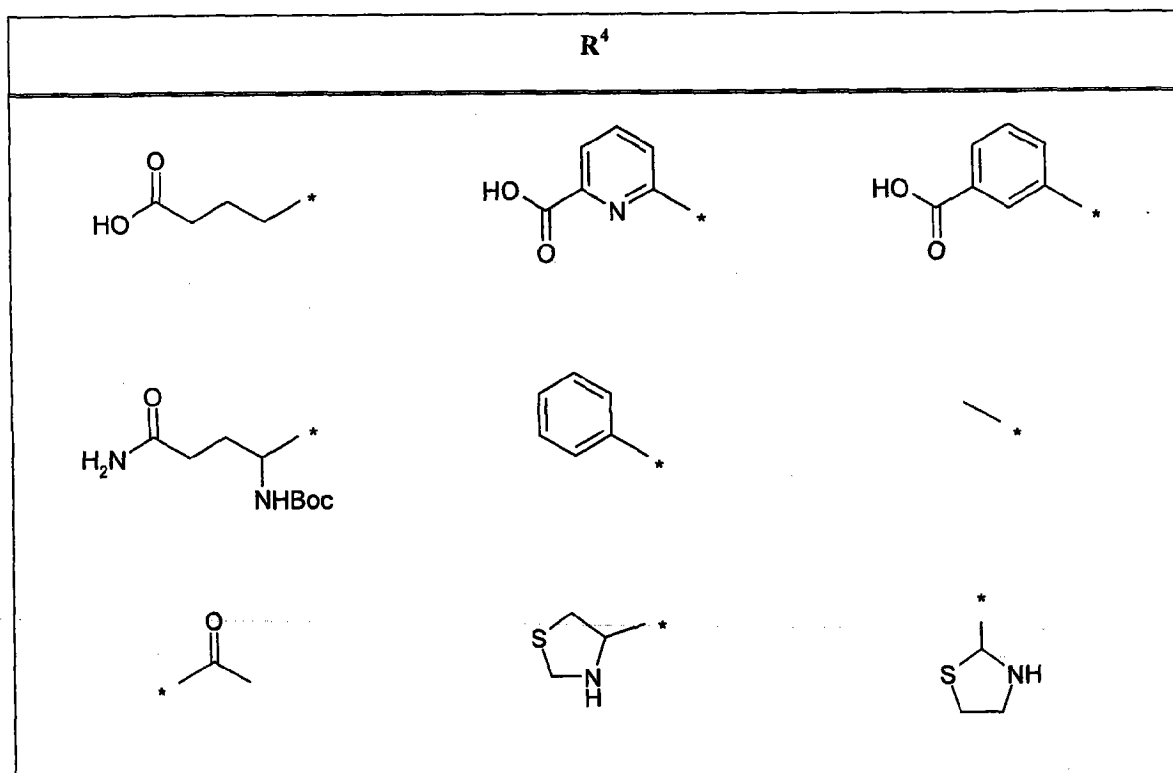


[0392] 其中星号 ‘*’ 表示连接点。

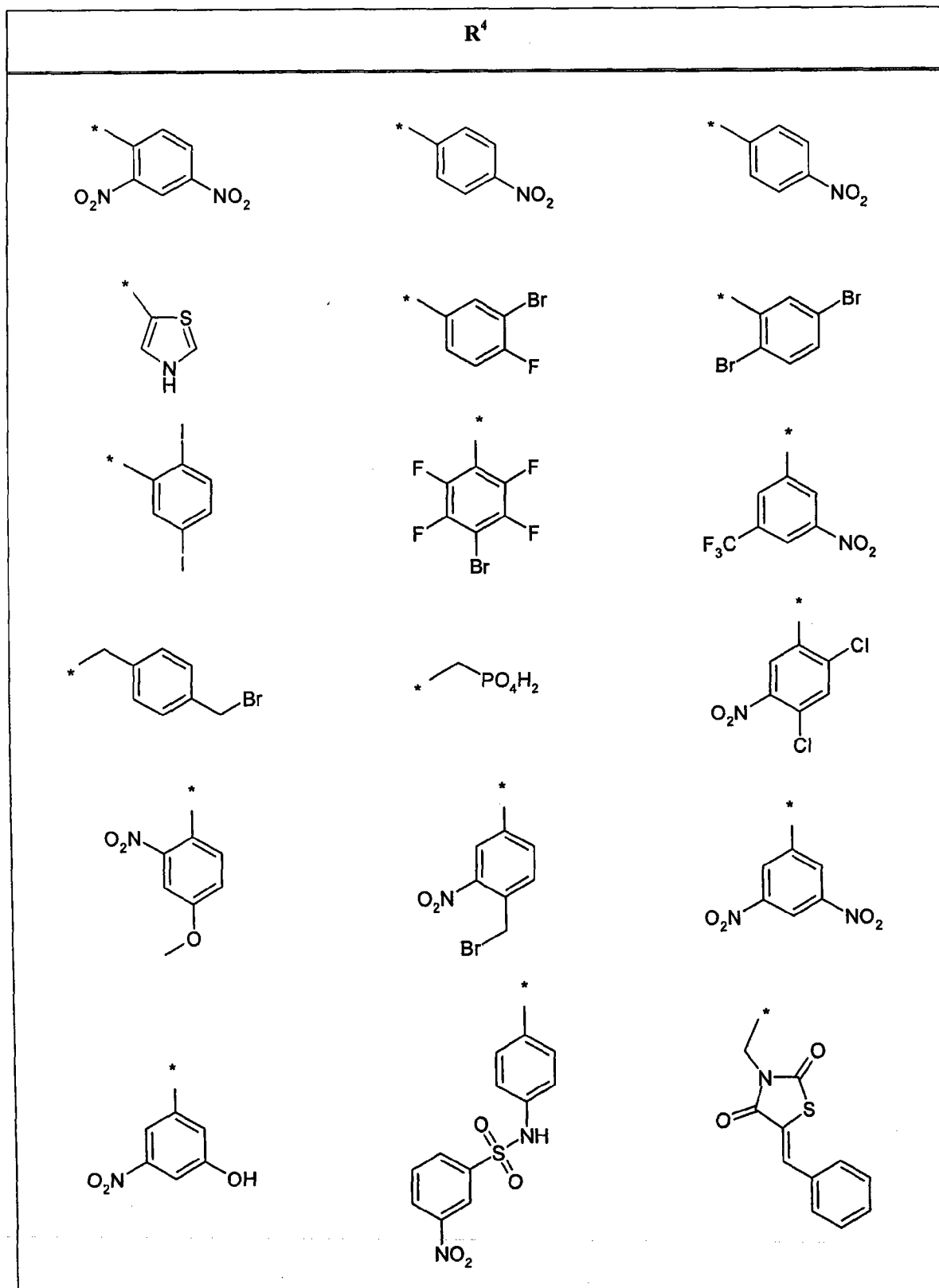
[0393] R^4

[0394] 在 R^4 不是包含连接到载体的基团的情况下, 则 R^4 可以选自在下表中给出的取代基列表:

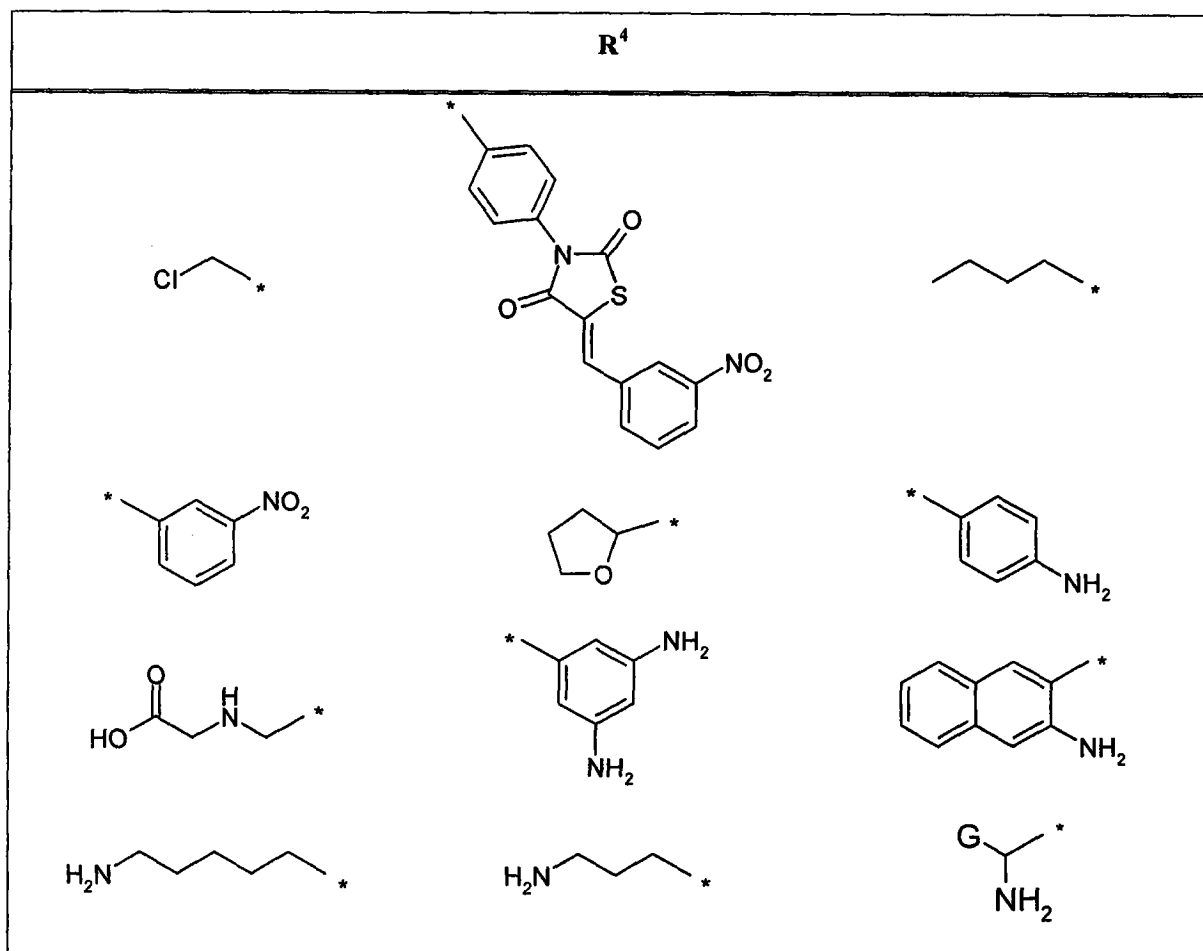
[0395]



[0396]



[0397]

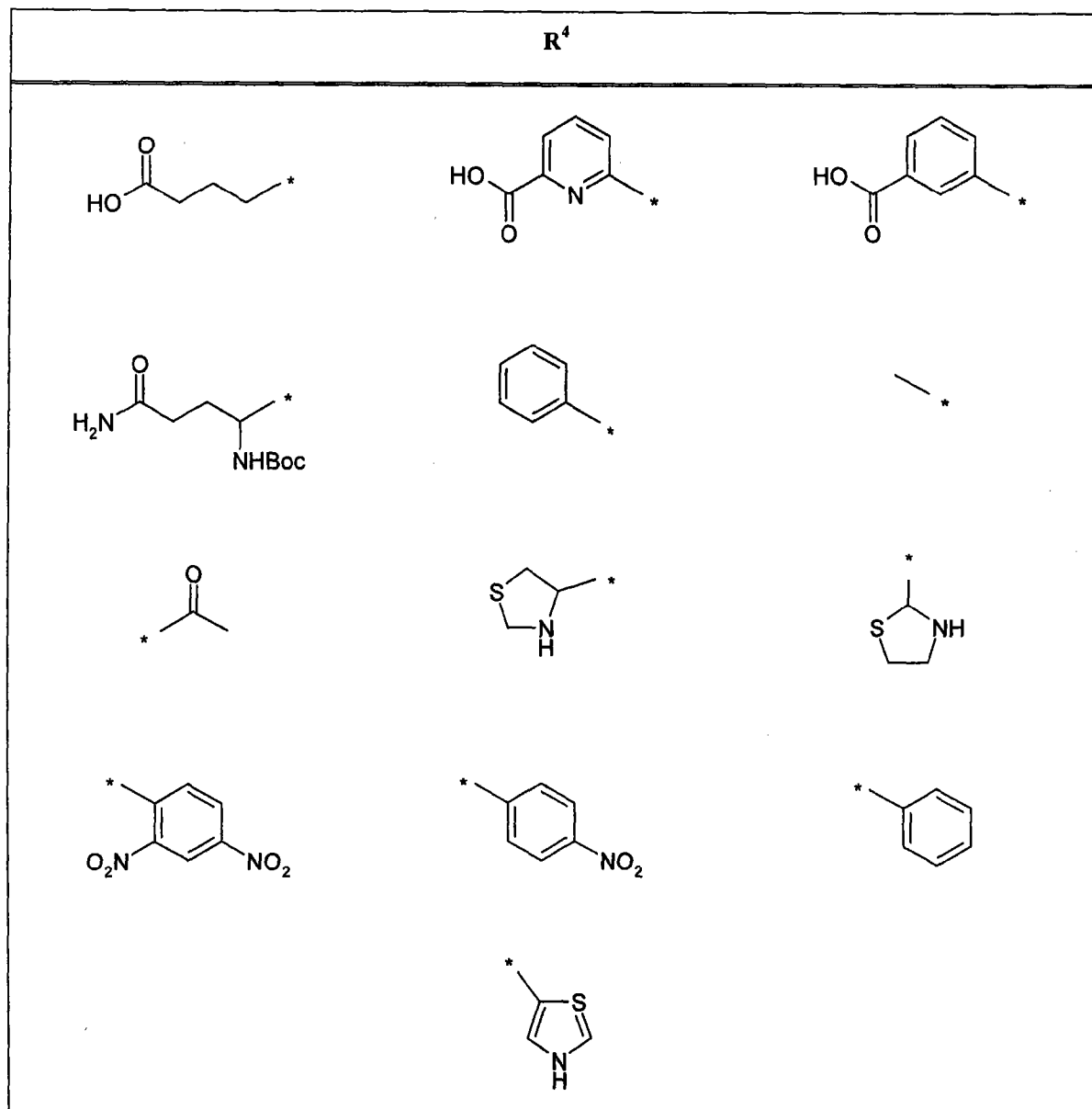


[0398] 其中星号 ‘*’ 表示连接点。

[0399] 在上表中, G 表示氨基酸侧链。例如, 关于甘氨酸, G 是 -H, 并且关于丙氨酸, G 是 -CH₃。G 可以是任何天然或非天然氨基酸的侧链。优选地, 侧链是丙氨酸, 精氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 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, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸或缬氨酸的侧链。

[0400] 在 R^4 不是包含连接到载体的基团的情况下, 则最优选的取代基可以选自在下表中列表:

[0401]



[0402] 其中星号‘*’表示连接点。

[0403] 集合

[0404] 本发明涉及化合物的文库或集合。该集合的每一个成员由式 (I) 或 (II) 的单个成员表示。化合物在文库中的差异可以反映在一个或多个取代基身份上不同的化合物的存在。文库中成员的数量取决于变体的数量,以及每一种变体的可能性的数量。例如,如果取代基 R^2 , R^3 和 R^4 改变,并且对于每种取代基具有 3 种可能性,则文库将具有 27 种化合物 ($3 \times 3 \times 3$)。文库可以包含超过 1,000, 5,000, 10,000, 100,000 或 1 百万种化合物,其可以如下所述布置。备选地,文库可以含有 96 种化合物或其倍数。

[0405] 式 (I) 和 (II) 的化合物的集合可以保持在分开体积的溶剂中,例如在管或孔中。备选地,集合可以作为分开粒子保持,在需要的情况下,或作为分开凝胶保持。化合物的集合优选结合在分开的位置,例如在分开的针/冠 (pins/crowns) 或珠子上。可以将化合物的集合提供在具有用于文库的合适尺寸的板上,或可以提供在许多标准尺寸的板上,例如 96 孔板上。如果文库成员数量大,则优选板上的每一个孔含有许多种来自文库的相关化合

物,例如 10 至 100 种化合物。关于化合物的此类型的分组的一种可能性是在仅已知取代基的亚型并且剩余部分是随机化的情况;此布置在迭代筛选方法 (iterative screening processes) (参见以下) 中是有用的。文库可以以熟知的其它形式存在。

[0406] 化合物的制备

[0407] 本发明的化合物典型使用多组分反应制备。用于本发明的最优选反应类型是基于 Ugi- 和 Passerini- 的反应。

[0408] 通常, Ugi 反应包括下列步骤:典型在一个反应容器中,将醛官能化的试剂,羧酸官能化的试剂,胺官能化的试剂和异腈官能化试剂接触。通常, Passerini 反应包括下列步骤:典型在一个反应容器中,将醛官能化的试剂,羧酸官能化的试剂和异腈官能化的试剂接触。

[0409] 与常规 ‘2- 组分’ 方法相比,多组分反应例如 Ugi 反应具有许多显著优点。首先,多组分反应允许了配体的较大多样性,其通过以下实现:结合三种或四种 (或以上) 反应物,所述反应物的每一种都可以系统地改变,以对最终配体结构产生种类繁多的微妙变化。快速化学取代方法的显然的容易性将其自身引向组合技术,从而极大地增加了可以在相对短的时期中容易地研究的 “化学空间 (chemical space)” - 换言之,可以在几个简单的步骤中产生非常大的数量的化合物。因此,可以通过播撒 ‘较宽的网 (wider net)’ 而探索化学假说,并且对基于有限组的高度多样的化合物的更传统的 ‘鸟枪 (shot-gun)’ 法提供可行的备选物。对适用于此具体多组分化学的可商购化合物的数量的短期调查揭示了此方法增加支架多样性和作为新的亲和吸附剂的应用的可能性 (表 1)。第二,多组分反应的 “一罐” 属性提供了时间,试剂成本和纯化技术的相当大的节约,从而使得可以更有效率地探查更大数量的化学假说。在单个的合成步骤中解决了试剂递送的敏捷或对化学多样性的要求。Ugi 反应是汇集成成的良好实例,其在不需要分离和鉴定任何化学中间体的情况下允许在不同组分之间发生多键形成,从而使得该程序对于组合文库合成是高度期望的。

	官能团	商购可获性
	伯胺/仲胺	R-NH ₂ 95, 398
[0410]	醛	R-CHO 10, 982
	异腈	R-NC 644
	羧酸	R-COOH 2,158

[0411] 表 1- 来自可获化学品目录 (Available Chemicals Directory) (ACD) 可商购 Ugi 反应组分的当前列表

[0412] 化学组分的可变反应性的困难问题对 Ugi 反应的最终化合物的收率施加的影响远不到显著:某些胺例如色胺和酪胺在结合到三嗪活化的琼脂糖时表现出高反应性 (未出版的工作, Hussain 2001), 趋于导致不期望的双取代反应产物。然而,在多组分反应或 Ugi 反应中,反应的机理使得胺反应性的问题较不重要,因为该反应要求四种组分中的每一种等摩尔量,以将反应进行完全。如果反应物是特别惰性的,则反应将不进行到任何显著的程度。因此,没有形成 ‘部分产物’ 或不期望的副产物。

[0413] 使用 Ugi 化学用于配体设计的另外的优点是支架模拟天然二肽键的可能性。与

Ugi 支架相比,天然二肽键中 O1-N-O2 之间的计算的原子间距离上的差别在所有 3 个原子之间小于 1.0 \AA ,表明该支架可能具有正确模拟天然二肽键的能力。而且,注意都从支架以及因此的层析基质表面突出的 R4(羧酸)和 R2(胺)部分的呈现。这两种官能团因此提供了用于靶相互作用的可利用连接部位。

[0414] Ugi 反应

[0415] 根据本发明的一个方面,提供一种用于制备根据式 (III) 的化合物的方法。该化合物可以使用多组分 Ugi 反应制备。根据本发明,该方法包括下列步骤:将组分 A,B,C 和 D 一起接触,其中

[0416] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

[0417] B 为 R^2-NH_2 ;

[0418] C 为 R^3-NC ;

[0419] D 为 R^4-COOH ;和

[0420] R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

[0421] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} , R^{1b} 和 R^2 另外选自氢,和 R^2 另外进一步选自 $-S(=O)R^5$ 和 $-C(=S)NR^6R^7$,其中 R^5 , R^6 和 R^7 独立地是任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,

[0422] 或,任选地,将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。

[0423] 在一个实施方案中,反应的化合物可以通过在一个反应容器中合并所有的试剂而制备。备选地,可以在加入其它组分即羧酸和异脒试剂(D和C,分别地)之前,将胺和醛/酮组分(分别地B和A)预反应,从而形成亚胺中间体。优选地,这些反应在一个罐中进行。

[0424] 在将 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 中的两个或更多个连接的情况下,可以将相应的试剂称为:二齿试剂,如在两个取代基连接时;或三齿试剂,如在三个取代基连接时。

[0425] 在 A, B, C 或 D 含有另外的官能团的情况下,此基团可以处于受保护形式。以上描述了保护基团实例。一旦已经形成支架产物,就可以将此保护基团除去。例如,试剂 B 可以具有羧酸基团。可以将此基团作为游离酸(COO^-)或作为酯($COOMe$)保护,所述酯在需要时可以水解成酸。试剂 D 可以具有氨基($-NH_2$)。可以将此基团用 Fmoc 保护($-NHFmoc$)。此保护基团随后可以用例如吡啶或 DBU 除去。

[0426] 氨基酸组分可以用作试剂 B 和 D。其中氨基-,羧基-或侧链-官能团根据需要受保护的氨基酸的适当受保护形式在现有技术中是熟知的并且容易从商业来源例如 Aldrich 和 Novabiochem 获得。

[0427] 在 A 为包含连接到载体的连接体的基团时,则除了别的以外, R^{1a} 或 R^{1b} 中的一个可以是甲酰基聚苯乙烯, tentagel 缩醛树脂, 3-甲酰基吡啶基)乙酰氨基甲基聚苯乙烯或 Garner 醛官能化的氨基-甲基化聚苯乙烯。

[0428] 对于 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 和 R^7 , 优选与关于以上式 (I) 和 (III) 的化合物给出的那些相同。

[0429] 对于配体和载体,优选与涉及上述关于化合物和集合的连接体和载体给出的那些相同。

[0430] 根据本发明的第三方面,提供一种用于制备被鉴定为具有对物质的亲和力的化合

物的方法。在一个实施方案中,所述步骤包括将组分 A, B, C 和 D 一起接触。这些组分中的一种可以是文库成员的连接体的结构或官能类似物。例如,在连接体包含芳基的情况下,该类似物可以包括芳基。

[0431] Passerini 反应

[0432] 根据本发明的一个方面,提供一种用于制备根据式 (IV) 的化合物的方法。该化合物可以使用多组分 Passerini 反应制备。根据本发明,该方法包括下列步骤:

[0433] 将组分 A, C 和 D 一起接触,其中

[0434] A 为 $R^{1a}COR^{1b}$;

[0435] C 为 R^3-NC ;

[0436] D 为 R^4-COOH ;和

[0437] R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的一个包含连接到载体的连接体的基团,

[0438] 并且 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团独立地选自任选取代的 C_{1-20} 烷基,任选取代的 C_{3-20} 杂环基或任选取代的 C_{5-20} 芳基,和 R^{1a} 和 R^{1b} 另外选自氢,

[0439] 或,任选地,将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的其它基团中的两个或更多个连接。

[0440] 在将 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 中的两个或更多个连接的情况下,可以将相应的试剂称为:二齿试剂,如在两个取代基连接时;或三齿试剂,如在三个取代基连接时。

[0441] 在 A, C 或 D 含有另外的官能团的情况下,此基团可以处于受保护形式。以上描述了保护基团实例。一旦已经形成支架产物,就可以将此保护基团除去。例如,试剂 D 可以具有氨基 ($-NH_2$)。可以将此基团用 Fmoc 保护 ($-NHFmoc$)。此保护基团随后可以用例如吡啶或 DBU 除去。

[0442] 对于 R^{1a} , R^{1b} , R^3 和 R^4 , 优选与关于以上式 (II) 和 (IV) 的化合物给出的那些相同。

[0443] 对于配体和载体,优选与涉及以上关于化合物和集合的连接体和载体给出的那些相同。

[0444] 集合的制备

[0445] 以上所述的用于制备式 (III) 和 (IV) 的化合物的方法适用于制备 (I) 和 (II) 的化合物的集合。使用例如使用组合化学领域中的普通技术可以平行制备集合的成员。使用本领域中公知的技术可以将这些步骤自动化。

[0446] 分析

[0447] 除了别的以外,式 (III) 和 (IV) 的化合物可以通过 IR, NMR(凝胶相和幻角自旋(MAS)技术)和元素分析进行分析。在连接体是可裂解连接体的情况下,可以将连接体裂解以从载体释放化合物。可以使用本领域中的普通技术例如 LC-MS, HPLC, NMR, 元素分析, IR, TLC 和重量分析对释放的化合物进行分析,以确定化合物的身份(同一性)和量,以及因而固体载体上的材料的身份和量。

[0448] 还可以通过上述技术分析集合的单独成员。可以自动化成员的分析。

[0449] 如以上关于连接体和基团 R^{1a} , R^{1b} , R^2 , R^3 和 R^4 所讨论的,这些中的任何一个都可以含有分析标记物,以帮助反应方法的鉴定和量化以及反应产物的鉴定和量化。

[0450] 化合物和集合的用途

[0451] 本文中所述的化合物和集合可以在纯化方法中使用。还可以将该化合物结合到分析或诊断装置中。

[0452] 该化合物可以用于鉴别针对物质的构象形式的配体。例如,该化合物可以用于鉴定针对在端粒-样 DNA 的片段上的 G-四重组结构的配体。优选地,相对于此物质的另一种构象形式,这种化合物将对于此物质的一种构象形式具有选择性。

[0453] 物质和配体之间的结合可以以众多方法中的任何一种检测。物质本身可以具有允许其被鉴定的标记。

[0454] 可以将集合中的化合物在空间上布置,例如布置在表面上或在孔板的孔之间。

[0455] 本发明还涉及一种筛选式 III 和 IV 的化合物以发现生物活性化合物的方法。该筛选可以是评估与核酸例如 DNA 或 RNA,或蛋白的结合相互作用,或评估化合物对蛋白-蛋白或核酸-蛋白,例如转录因子 DP-1 与 E2F-1,或雌激素响应元件 (estrogen response element) (ERE) 与人雌激素受体 (66kd 蛋白,其起激素活化的转录因子的作用,其序列在现有技术中公开并且通常是可获得的) 的相互作用的影响。该筛选可以通过下列方法进行:使靶大分子与以上所述的单独化合物或阵列或文库接触,和选择显示最强效果的这些化合物或具有化合物的混合物的孔。

[0456] 此效果可以简单地是处于研究的化合物对细胞的细胞毒性或该化合物对核酸的结合。在蛋白-蛋白或核酸-蛋白相互作用的情况下,此效果可以是研究的相互作用的破坏。

[0457] 本发明的另一个方面涉及式 III 和 IV 的化合物在诊断方法中的用途。结合到已知是医学病症的指示的 DNA 或蛋白的鉴定序列的式 III 和 IV 的化合物可以用于诊断方法。该方法可以包括:将例如适当处理的血液或组织提取物的样品通过例如在柱中的固定的式 III 和 IV 的化合物,和随后确定是否发生靶 DNA 与式 III 和 IV 的化合物的任何结合。这种确定可以通过下列方法进行:将已知与化合物 III 和 IV 结合的已知量的标记的靶 DNA 通过所述柱,和计算保持未结合的化合物 III 和 IV 的量。

[0458] 本发明的另一个方面涉及式 III 或 IV 的化合物在靶确认 (target validation) 中的用途。靶确认是用于确定序列功能的鉴定的 DNA 序列的破坏,并且式 III 或 IV 的化合物可以用于选择性地结合鉴定序列,因而使其功能即功能基因组破坏。式 (I) 和 (II) 的化合物的集合可以以类似的方式使用。

[0459] 本发明还允许了从混合物纯化污染物。化合物可能能够固定混合物中的污染物。因而从混合物除去污染物纯化了混合物。这种方法可以包括几种化合物的用途,所述几种化合物各自对不同的污染物具有亲和力。该方法可以包括在一个步骤中将混合物与几种化合物接触,从而同时除去多种污染物。这可以改进混合物纯化次数,因此提高生产量。

[0460] 化合物的文库可以从商业来源得到,或可以根据本文中所述的方法制备。

[0461] 定义

[0462] 物质

[0463] 本发明提供了从混合物中纯化物质以及用于鉴定物质的亲和配体的方法。

[0464] 该物质可以是期望从混合物分离的任何实体。该物质还可以是期望鉴定能够与其结合的化合物的任何实体。

[0465] 该物质可以是小的或大的有机分子 (分别 < 500 道尔顿和 ≥ 500 道尔顿), 大分子, 聚合物例如核酸或肽, 复合体实体例如细胞, 例如细菌, 或病毒。

[0466] 该物质可以是具有生物活性的化合物。该物质可以具有天然存在的分子的结构,

调节或生物化学功能。该物质可以是代谢物,药物,酶,信使等。

[0467] 优选地,该物质是核酸,肽,糖,或聚酮化合物或脂质,包括糖基化 (glycosilated) 形式。

[0468] 优选地,该物质可以是衍生自天然或人造来源的酶抑制剂,调节酶,激素结合蛋白,维生素结合蛋白,受体,凝集素和糖蛋白, RNA 和 DNA,细菌,病毒和噬菌体,支原体,细胞和基因工程蛋白产物 (例如 HIS- 标记缀合蛋白)。

[0469] 核酸和肽

[0470] 肽包括多肽例如寡肽,核糖体肽,非核糖体肽,肽及它们的翻译后修饰形式,以及这些的片段变体和衍生物。

[0471] 除了别的以外,肽可以是酶,抗体或受体。肽可以具有任何尺寸。肽可以是多肽。多肽典型包含 10 个或更多个的氨基酸残基。

[0472] 术语“抗体”以最宽泛的意义使用并且特别涵盖单一的单克隆抗体 (包括激动剂和拮抗剂抗体) 和具有多表位特异性的抗体组合物。本文中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白),在所述“嵌合”抗体 (免疫球蛋白) 中,重链和 / 或轻链的一部分与衍生自具体物种或属于具体抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或类似,同时所述链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或类似,以及这种抗体的片段,只要它们表现出期望的生物活性即可 (Cabilly 等,上文;Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81 :6851(1984))。

[0473] 肽可以是哺乳动物多肽,优选人多肽,或与人多肽具有高序列同一性的多肽 (例如 > 70%, > 80%, > 90%, > 95% 的同一性)。

[0474] 哺乳动物多肽的实例包括分子例如,诸如凝乳酶;生长激素,包括人生长激素或牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白;1- 抗胰蛋白酶;胰岛素 A- 链;胰岛素 B- 链;胰岛素原;血小板生成素;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子例如因子 VIIIc, 因子 IX, 组织因子和冯维勒布兰德 (von Willebrands) 因子;抗凝血因子例如蛋白 C;心房钠尿肽 (atrial natriuretic factor); 肺表面活性物质 (lung surfactant); 纤溶酶原激活物,例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物 (t-PA); 铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 - α 和 - β ; 对于一种或多种 ErbB2 域的抗体例如 2C4 (WO 01/00245; 杂交瘤 ATCCHB-12697), 其结合到 ErbB2 的细胞外域中的区域 (例如,在 ErbB2 的约残基 22 至约残基 584 的区域中的任何一种或多种残基); 脑啡肽酶; 穆勒抑制物质 (mullerian-inhibiting substance); 松弛素 A- 链; 松弛素 B- 链; 松弛素原; 小鼠促性腺激素相关的肽; 微生物蛋白,例如 β - 内酰胺酶; 脱氧核糖核酸酶; 抑制素; 激活蛋白; 血管内皮生长因子 (VEGF); 激素或生长因子的受体; 整联蛋白; 蛋白 A 或 D; 类风湿因子; 神经营养因子例如脑源神经营养因子 (BDNF), 神经营养蛋白 -3, -4, -5, 或 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 或 NT-6), 或神经生长因子例如 NGF; 心肌营养蛋白 (心过度生长因子) 例如心肌营养蛋白 -1 (CT-1); 血小板源生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子例如 aFGF 和 bFGF; 表皮生长因子 (EGF); 转化生长因子 (TGF) 例如 TGF- α 和 TGF- β , 包括 TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4, 或 TGF-5; 胰岛素 - 样生长因子 -I 和 -II (IGF-I 和 IGF-II); des (1-3)-IGF-I (脑 IGF-I); 胰岛素 - 样生长因子结合蛋白; CD 蛋白例如 CD-3, CD-4, CD-8, 和 CD-19; 红细胞生成素; 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨形态发生蛋白 (BMP); 干扰

素,例如干扰素 $-\alpha$, $-\beta$,和 $-\gamma$;血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA);集落刺激因子(CSF),例如,M-CSF,GM-CSF,和G-CSF;白细胞介素(IL),例如,IL-1至IL-10;抗-HER-2抗体;Apo2配体(Apo2L);超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原例如,诸如AIDS包膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;抗体;和以上列出的多肽中的任何一种的片段。

[0475] 用于本发明的优选物质是血液蛋白,特别是凝血蛋白,并且最特别地是因子VII和因子VIII,以及它们的片段,变体和衍生物。

[0476] 在备选的实施方案中,该物质可以是免疫球蛋白,优选IgG以及其片段,变体和衍生物。

[0477] 核酸包括DNA, RNA以及人造形式PNA, LNA, GNA和TNA。多核苷酸可以包括修饰碱基和/或修饰主链。核酸可以具有任何尺寸。

[0478] 核酸可以是有义或反义序列。

[0479] DNA可以是mtDNA, cDNA, 质粒, 黏粒, BAC, YAC, 或HAC。

[0480] RNA可以是mRNA, piRNA, tRNA, rRNA, ncRNA, sgRNA, shRNA, siRNA, snRNA, miRNA, snoRNA, 或LNA。

[0481] 混合物

[0482] 术语“混合物”可以表示可以含有感兴趣的物质的任何生物样品。混合物可以是生物流体的样品,例如全血或包括红细胞,白细胞,血小板,血清和血浆的全血成分,腹水,尿,玻璃体液,淋巴液,滑液,滤泡液,精液,羊水,乳液,唾液,痰液,眼泪,汗液,黏液,脑脊髓液,和可能含有感兴趣的分析物的身体的其它成分,以及组织培养基和组织提取物例如匀化组织,和细胞提取物。优选地,样品是来自任何动物的身体样品,但是优选地,来自哺乳动物,更优选地,来自人受试者。最优选地,这种生物样品来自临床患者。在本文中所述的优选生物样品是血清,血浆或尿,更优选地,血清,并且最优选地,来自临床患者的血清。

[0483] 混合物可以含有污染物。该污染物是与期望的物质不同的材料。污染物可以是期望的多肽的变体(例如期望的多肽的变体)或另一种多肽,核酸等。

[0484] 洗脱

[0485] 可以使用洗脱液将与化合物(其可以称为亲和配体)结合或关联的物质从该化合物除去。洗脱混合物意在破坏载体结合配体和物质之间的相互作用。可以选择洗脱混合物以破坏配体和物质之间的氢键相互作用,静电相互作用和疏水相互作用。

[0486] “洗脱缓冲液”可以用于将感兴趣的物质从化合物洗脱。洗脱缓冲液的电导率和/或pH使得从载体洗脱感兴趣的物质。

[0487] 洗脱液可以用作用于研究物质和化合物的离解参数的方法的一部分。在这种情况下,监视随着时间的过去物质从化合物的释放。

[0488] 用于从亲和配体分离物质的技术在现有技术中是熟知的。

[0489] 分析

[0490] 存在许多用于确定固定的配体是否与物质结合的方法。

[0491] 在化合物在空间上从其它化合物分离的情况下,可以将最初含有该物质的混合物除去,并且随后将化合物用洗脱混合物洗涤,从而除去物质。然后可以分析洗脱混合物,以确定是否存在该物质以及其存在的程度。

[0492] 然而,对于本发明的集合,在集合的单独成员的空间布置下,这种分析可能是不切实际的或不可能的。

[0493] 在一个实施方案中,可以对物质进行放射性标记。在洗涤集合以除去过量混合物以后,可以分析集合以确定辐射的位置和强度,从而指示物质已经结合的配体以及其结合的程度。

[0494] 在另一个实施方案中,可以对物质或配体进行标记。由标记产生的信号可能由于配体与物质的结合而被猝灭。测试物质的加入将导致产生高于背景的信号,所述测试物质与所述物质竞争并且从预先形成的结合复合物置换所述物质。以此方式,可以鉴别破坏物质配体相互作用的测试物质。

[0495] 备选地,使用 ELISA- 类型试验可以检测与配体结合的物质。

[0496] 化合物与物质,特别是肽的相互作用还可以使用 Bradford 蛋白试验确定。

[0497] 这些和其它的技术在现有技术中是熟知的。

[0498] 分离

[0499] 本发明提供一种用于从根据本发明的方面的混合物分离物质的方法。将混合物与本发明的化合物接触,从而将混合物中的物质固定到化合物。然后可以除去缺失了所述物质的混合物。

[0500] 该物质可以是污染物。备选地,该物质可以是感兴趣的分子。感兴趣的分子可以通过用洗脱液处理化合物而收集。

[0501] 在物质是污染物的情况下,该方法导致混合物的纯化。对于纯化一种或多种污染物的混合物,是指通过从组合物除去(完全地或部分地)至少一种物质而提高该组合物中的感兴趣的化合物的纯度的程度。“纯化步骤”可以是导致“均质”组合物的整个纯化方法的一部分,在本文中所使用的“均质”组合物是指这样的组合物:基于组合物的总重,包含约 70 重量%,优选至少约 80 重量%的感兴趣的化合物。

[0502] 分离设备

[0503] 可以将本文中所述的化合物结合到用于混合物纯化的设备中。该设备可以用于通过下列方法纯化混合物:固定污染物,或备选地固定期望的物质,所述期望的物质然后可以在随后的点从该设备释放。

[0504] 分离设备可以采取填充有合适的化合物的层析柱的形式。备选地,该设备可以包含过滤床,其中所述床包括合适的化合物。

[0505] 在设备中,化合物可以是离散的粒子,或它们可以结合到表面上或保持在多孔基质中。

[0506] 其它类型的包含亲和配体的设备对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0507] 实验

[0508] 材料

[0509] 除非另外声明,所有的化学品都是试剂级。酪胺,4-氨基苯甲酰胺,戊二酸,2,4-吡啶二羧酸,异酞酸,Boc-谷酰胺,乙酸,苄胺,乙醛,异丙基肼,异氰基环己烷,表氯醇,高碘酸钠,二元磷酸钠,乙二醇,氯化钠,1-苊甲胺和1-苊丁酸全部获自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich)(格林厄姆,UK)。1-氨基-2-萘酚,4-氨基苯酚,3-氨基苯酚,氨基-8-萘酚,苯甲酸和氢氧化钠得自 Acrosorganics, (Loughborough, UK)。4-羟基苄胺获

自 Chontech, Inc (Waterford, USA)。Boc-甘氨酸和 1-氨基-2-丙醇获自 Fluka (UK)。乙醇, 甲醇, 二氯甲烷和丙-2-醇全部获自 Fisher Chemicals, UK。交联琼脂糖 (Sepharose CL-6B) 购自 G. E. Healthcare (乌普萨拉, 瑞典)。人 IgG (纯度 $\geq 95\%$, 源自混合人血清) 获自 Sigma (Dorset, UK), 而 hFab 和 Fc (纯度 $\geq 95\%$, 源自人血浆) 购自 Calbiochem (诺丁汉, UK)。聚丙烯柱 (0.8x 6.0cm) 和玻璃料购自 Varian (牛津, UK)。96-孔标准微量板和用于蛋白浓度测定的 Coomassie Plus™ 蛋白试验试剂 (Bradford 试验) 分别购自 Corning 有限公司 (Fisher Scientific UK) 和 Pierce (UK)。

[0510] 使用仪器

[0511] 使用 Hybaid Maxi 14 杂交烘箱 (hybridisation oven) (Thermo Electron, UK) 进行配体合成。通过使用 Coomassie Plus™ 蛋白试验试剂, 使用来自 Dynex Technologies 的 Opsys MR 平板读数器测量样品在波长 (595nm) 下的吸收度来确定总蛋白浓度。分子图像使用来自 Molegro ApS-Bioinformatic Solutions (丹麦) 的 Molegro Virtual Docker 2007 软件 MVD v2.0.0 得到。¹H 和 ¹³C 核磁共振 (NMR) 光谱使用 Joel JNM Lambda LA400FT NMR 光谱计进行。在英国剑桥大学化学实验室 (Chemical Laboratory, University of Cambridge, UK) 中的处于电子冲击模式中的 AEI MS30 或 AEI MS50 质谱仪上记录质谱。使用 Olympus CX40 显微镜, Nikon EFD-3 滤光器 ($\lambda_{ex} = 330-380\text{nm}$), Nikon 100W 汞灯和 Kodak DC290 可变焦数字照相机进行荧光研究。

[0512] 方法

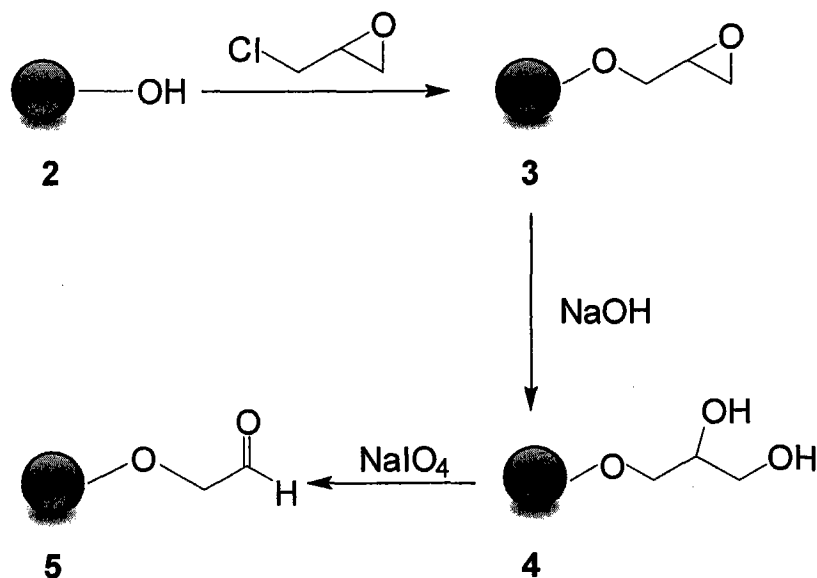
[0513] 对于 IgG 的亲亲和配体的鉴定

[0514] 制备化合物的集合以鉴定对于 IgG 的可能亲和配体。化合物的集合以支架为基础, 所述支架通过下列方法制备: 在 Ugi 多组分反应中, 将醛官能化的连接体即连接到载体的醛官能化的连接体与羧酸, 胺和异脒反应。然后将产物针对它们结合 IgG 的能力进行筛选。

[0515] 连接体和和载体制备

[0516] 基质载体 Sepharose CL-6B (树脂 2, 方案 1), 其作为 $95 \mu\text{M}$ 平均粒度的高度交联的多孔珠子提供, 具有遍布聚合物网络的初始末端羟基。通过添加配体间隔臂可以进一步修饰该珠子, 如以下方案中所示:

[0517]



[0518] 方案 1- 为了用于醛活化, 将 4C 间隔臂增加到 Sepharose 珠子 (注: 为了清楚, 仅显示一个官能团)

[0519] 最初将 Sepharose 珠子在 NaOH 的存在下用表氯醇处理以产生环氧-活化树脂 3。获得的活化度可以由在此步骤加入的 NaOH 的量精确控制。‘环氧化物活化试验’要求 3 与 Na₂S₂O₃ 温育, 然后用 0.1M HCl 滴定, 从而揭示珠子的环氧化物含量在以树脂计的 1 μmol g⁻¹ 之内。当用新制备的 5M NaOH 进一步处理 3 时, 环氧化物形式打开以产生二醇形式 4。然后使后者经受 0.1M NaIO₄, 从而导致二醇形式的裂解以留下最终的醛活化树脂 5。

[0520] 环氧化物活化和试验确定

[0521] 将 Sepharose 珠子的样品 (200g) (树脂 2, 方案 1) 倾倒入 2 级烧结玻璃漏斗中并且允许排干, 直至得到‘沉降凝胶’稠度 (‘settled gel’ consistency)。将该样品称重于烧杯中, 并且使用无菌去离子水 (200ml) 调成 50% 珠子 / 水 v/v 的浆液。然后将浆液倾倒入烧杯玻璃漏斗中并且用水 (5x 400ml) 彻底洗涤, 保证在施加真空之前充分搅拌树脂, 并且因而使得能够发生过滤。在不施加真空的情况下, 使得最后的洗涤物彻底在重力下排干 (10 分钟), 直至再次得到‘沉降凝胶’稠度。将洗涤的树脂在水 (100mL) 中调成浆液并且转移到 500mL 的 duran 瓶中。向浆液中加入 10M NaOH (8mL) 并且在室温搅拌 1 小时。然后将温度升高到 34°C, 并且向反应混合物中加入新的表氯醇 (14mL)。将反应混合物在温和搅拌下在 34°C 保持 3h 的时期。在此时期以后, 将 duran 瓶的内容物倾倒入 2 级烧结玻璃漏斗中并且用去离子水 (5x 400ml) 洗涤, 以得到环氧化物-活化的树脂 (在安全废物处置之前, 将剩余的表氯醇用于 NaOH 处理 24h)。一旦沉降, 就通过进行以上提及的环氧化物活化试验而测试树脂的环氧化物密度。得到 24.0 μmol/g (沉降凝胶) 的典型活化水平, 如通过用 1.3M Na₂S₂O₃ 滴定测量的。

[0522] 顺式-二醇活化

[0523] 将环氧化物活化树脂 (树脂 3, 方案 1) (60g) 用 5M NaOH (60mL) 处理, 并且在 34°C 轻轻搅拌过夜。此碱催化程序逐渐将环氧化物环水解, 导致顺式-二醇反应产物 4 的形成。

[0524] 醛活化

[0525] 然后将二醇活化树脂 4 (56g) 用 0.1M NaIO₄ (100ml) 处理并且在 30°C 保持搅拌 3h。此程序引起顺式-二醇的裂解, 从而留下末端官能化的醛基。已知暴露于空气的反应性醛

容易氧化,因此将树脂立即制备用于配体文库生成。

[0526] 化合物集合的制备

[0527] 为了同时产生大量的配体,本申请人采用了 Captiva™ 96-孔模块(由 Varian, UK 提供),其在每一个孔的底部含有 20 μm 聚丙烯玻璃料。此耐化学模块系统因而构成反应容器以及在最终反应结束时的随后贮存装置。

[0528] 对所述醛活化树脂的样品(树脂 5,方案 1)(36g)进行一系列递增甲醇浓度的洗涤,以 10%的增量在 10%甲醇开始并且以 100%甲醇结束。此步骤是需要的,因为如果直接将琼脂糖珠子放置在 100%甲醇中而不逐渐置换由树脂吸收的水,则该琼脂糖珠子可能遭受降解。然后将甲醇饱和树脂(36g)在 100%甲醇(36ml)中调成浆液,并且放置在轻轻摇动的摇动器上,以防止树脂沉降。将 1ml Gilson 吸移管尖头(pipette tip)从离末端 2mm 处切断,以允许容易地将 1ml 浆液等分部分转移到反应模块(8x 6)的 48 个孔中。在此阶段除去柔性的尾帽垫(end-cap mat),以允许溶剂完全排出并且因而允许树脂在模块中沉降。然后在模块底部的合适位置将尾帽垫牢固地放回原处。

[0529] 将固定浓度的第一预先选择胺组分(5x 摩尔过量,在甲醇中)和体积(0.25ml)向下加入到第一列六个孔(1,从 A 至 F)中。如以上提及的,将第二不同胺组分向下加入到第二列(2, A-F)中。重复此程序,直至已经将总计 8 种不同的胺加入到每列中(以下参见文库组分结构)。然后将顶帽垫(topcap-mat)牢固附着到模块并且允许在 200rpm 摇动 1h。该程序允许胺组分与所提供的树脂样品完全混合。

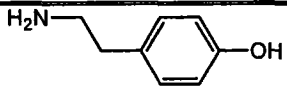
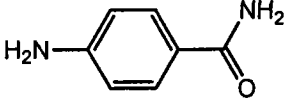
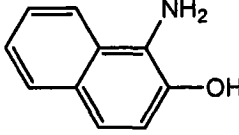
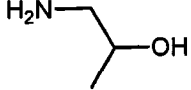
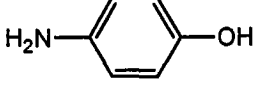
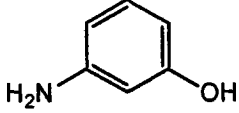
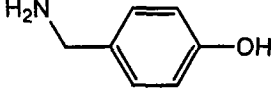
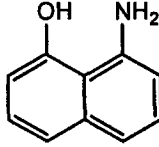
[0530] 类似地,将固定浓度的第一预先选择的羧酸组分(5x 摩尔过量,在甲醇中)和体积(0.25ml)加入第一行(A,从 1 至 8)。将第二不同羧酸组分向下加入第二行(B,1-8)。重复此程序,直至将总计 6 种不同羧酸加入 6 行中的每一个(以下参见文库组分结构)。最后将固定的等分部分(0.25ml)的异丙基脒组分(5x 摩尔过量,在甲醇中)吸移到 48 个孔的每一个中。因此,对于 2D 文献阵列的构造,仅 Ugi 反应中包含的 4 种可能组分中的两种变化。

[0531] 然后将上部帽垫牢固附着到反应模块的顶部。然后将整个模块放置到处于 50°C 的具有摇动平台(200rpm)的温育烘箱中历时 48h。在反应时期的最后,将下部和上部帽垫小心除去并且将孔排干 10 分钟。然后对孔进行彻底洗涤程序(参见以下)以从得到的树脂样品除去未反应的试剂。

[0532] 在反应以后,对衍生化的 Sepharose 珠子进行由一系列分开的洗涤步骤组成的彻底洗涤程序(参见以下),以保证在靶标筛选之前将所有的未反应化合物除去。所有的洗涤步骤组成 5ml 孔⁻¹。用以下洗涤:1) 100% MeOH;2) 50% DMF+50% MeOH(v/v);3) 50% DMF(v/v,在水中);4) 水;5) 0.1M HCl;6) 水;7) 0.2M NaOH,在 50% IPA 中;8) 2x 水和 9) 20% EtOH(v/v,在水中)。然后将洗涤的珠子储存在处于 4°C 的 20% EtOH(v/v,在无菌去离子水中)备用。

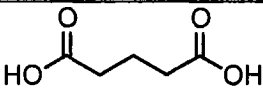
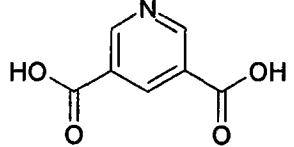
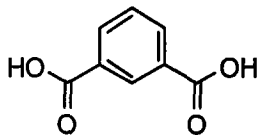
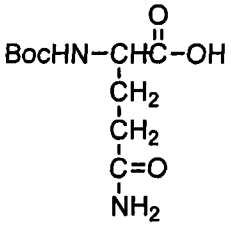
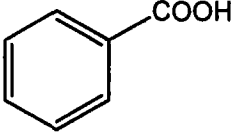
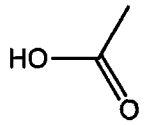
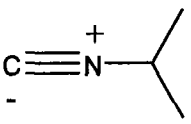
[0533] 为了改变异脒组分,可以如上所述制备相同的文库,不同之处在于在反应模块中的不同位置使用不同的异脒浓度。以此方式,可以用不同的异脒组分容易地产生许多不同的文库,从而有效地提供配体结构的 3D 阵列。

[0534] 文库组分

编号	结构	胺
A1		酪胺
A2		4-氨基苯甲酰胺
A3		1-氨基-2-萘酚
A4		1-氨基-2-丙醇
A5		4-氨基苯酚
A6		3-氨基苯酚
A7		4-羟基苄胺
A8		氨基-8-萘酚

[0535]

[0536] 上表显示 hIgG- 结合 Ugi 组合文库的胺组分结构

编号	结构	羧酸
C1		戊二酸*
C2		3,5-吡啶二羧酸*
C3		异酞酸*
[0537] C4		Boc-谷酰胺
C5		苯甲酸
C6		乙酸
I1		异丙基肼

[0538] 上表显示 hIgG- 结合 Ugi 组合文库的羧酸组分 (C1-C6) 和异脒组分 (I1) 的结构。(注:对于整个组合文库,异丙基肼保持保留)* 首先将二羧酸组分与等摩尔的 NaOH 温育 (10 分钟,室温),以保护可利用的 COOH 基团的一半,从而避免在 Sepharose 珠子上的邻近形成的支架结构之间的交联。反应后洗涤引起的有效脱保护揭示了最终配体结构中的羧酸基团。

[0539] 定性 Ugi 配体荧光研究

[0540] 使用如上所述的醛活化 Sepharose 珠子 CL-6B (26 $\mu\text{mol g}^{-1}$ 湿重凝胶) 产生配体 (2.5g 树脂规模)。对于胺基苧配体,将 1-苧甲胺, Boc-甘氨酸 (羧酸组分) 和异氰基环己烷 (异脒组分) (所有组分使用 325 μmol (即在 2.5g 规模为 5x 摩尔过量)) 溶解在甲醇 (5.0ml) 中,加入到树脂中,并且在方颈 Nalgene 瓶中在 50°C 轻轻摇动下温育 42h。使用胺组分 4-氨基苯酚 (A5) 和异脒组分异氰基环己烷,以同样的方式制备羧基苧配体 (B, D)。在温育以后,将珠子小心洗涤 (如上所述),并且将 5.0 μl 制备的 50% 浆液吸移到显微镜载玻片上,并且使用 Olympus CX40 显微镜, Nikon EFD-3 滤光器 ($\lambda_{\text{ex}} = 330-380\text{nm}$), Nikon

100W 汞灯和 Kodak DC290 可变焦数字照相机观察。

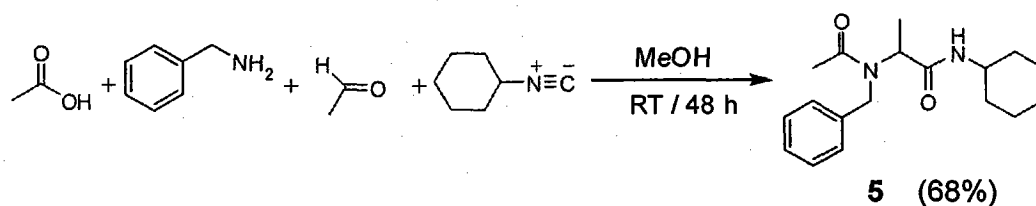
[0541] 层析筛选方案和总蛋白定量

[0542] 在装载 (1c. v, 500 μ g ml⁻¹ hIgG/hFab/hFc, 在平衡缓冲液中重组) 之前, 将产生的合成配体吸附剂 (0.4ml 配体 -50% 制备的浆液) 重力填充到 4.0ml (0.8x6cm) 聚苯乙烯柱 (200 μ l c. v.) 中, 其制备用于层析分析 (再生 (0.1MNaOH, 30% 异丙醇, 10c. v), 洗涤 (无菌去离子 H₂O, 10c. v.) 和平衡 (10mMNa₂HPO₄, 150mM NaCl, pH 7.4, 10c. v))。收集 1c. v. 级分 (10x F. T., 10x 洗脱), 并且使用标准 Bradford 试验方案 (Coomassie Plus 试验试剂, Pierce, UK) 对其分析, 以确定在每一个收集的柱级分中的总蛋白含量。该简单的靶筛选方法将随后在下列正文中称为标准层析条件。

[0543] 溶液相合成

[0544] Sepharose 珠子在严酷反应条件例如高温 (> 100°C), 非极性溶剂和强无机酸下容易损坏。因此, 认为温和反应条件对于文库合成以及大规模反应是理想的。为了评估 Ugi 反应的基本动力学, 发明人使用处于溶液相中的温和反应条件 (室温, 在甲醇中) 将乙酸, 苄胺, 乙醛和异氰基环己烷一起反应, 以保证可接受的产物形成。产物 5 以 68% 收率获得 (在从 20% 热乙醇重结晶以后)。Ugi 加合物 5 的身份进一步由下列确认: 如以下在图 1(A) 和 (B) 中分别所示的 ¹H 和 ¹³C NMR, 以及质谱 (熔点 119-120°C . m/z (EI) 303.41 (M+1, 100%)。测量值: M+1303.2074. C₁₈H₂₇N₂O₂ 要求 303.207253)。

[0545]



[0546] Ugi 支架形成的证据

[0547] 通过“珠上 (on bead)”荧光研究, 定性地获得了原位 Ugi 支架形成的证据 (图 2)。将含苄的胺组分 (图 2a) 和苄羧酸组分 (图 2b) 分别整合到 Ugi 支架 (图 2c 和 d, 分别地) 中, 并且随后使用荧光显微镜 (图 2e 和 f) 观察。胺基 1-苄甲胺进入到 Ugi 支架中的整合 (图 2 中所示的结构) 提供了与固定的醛活化树脂一起的亚胺形成的清楚证据, 即 Ugi 反应机理中的第一识别步骤。据认为用于在 Ugi 支架内形成完整复合物的四种组分中的最后一种是羧酸组分, 因此羧基 1-苄丁酸整合的证据也表明了其在基质载体上取代的 Ugi 配体的完全形成。彻底的洗涤也保证组分并非仅仅简单地吸附在亲水的 Sepharose 珠子的表面上, 并且将苄组分加入到醛活化基质载体中的对照实验也证明了这点 (数据未示出)。

[0548] 图 2- 用于原位 Ugi 支架形成的定性证据的荧光配体。a) 1-苄甲胺; b) 1-苄丁酸; c) 整合到 Ugi 支架: Boc-甘氨酸, 异脞: 异氰基环己烷中的 1-苄甲胺; d) 整合到 Ugi 支架胺: 4-氨基苯酚, 异脞: 异氰基环己烷中的 1-苄丁酸; e) 1-苄甲胺配体的荧光图像 (0.03 秒曝光, x10 放大倍数); f) 1-苄丁酸配体的荧光图像 (0.25 秒曝光, x10 放大倍数)。标尺 (~ 100 μ m)。使用 Olympus CX40 显微镜, Nikon EFD-3 滤光器 (λ_{ex} = 330-380nm), Nikon100W 汞灯和 Kodak DC290 可变焦数字照相机进行荧光研究。

[0549] 合理文库设计

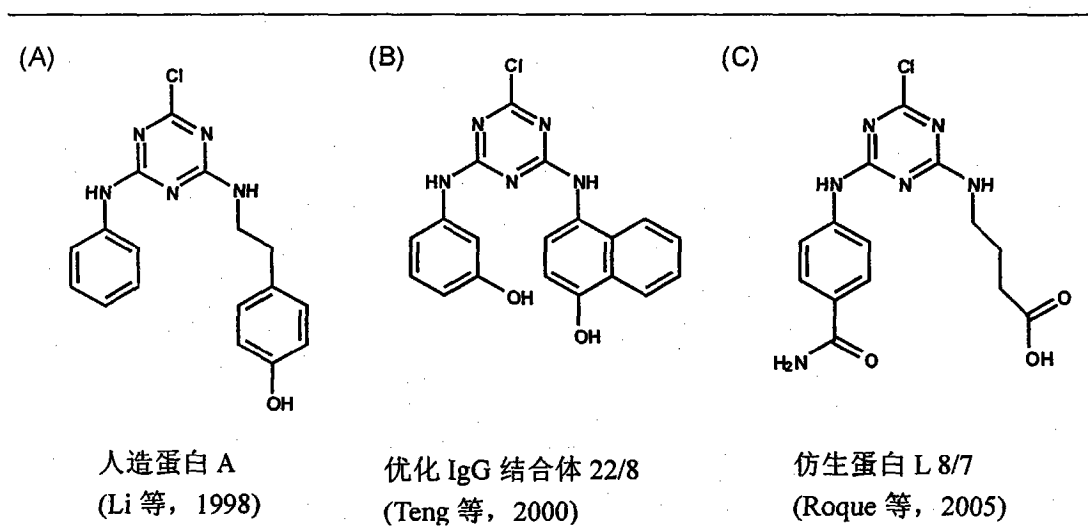
[0550] 文库组分的选择基于最初在英国剑桥大学生物技术研究所鉴定的之前所述的免疫球蛋白结合配体,以及从最近的科学文献得到的配体信息。

[0551] 从各种三嗪基组合文库已经出现了许多先导配体,其对于经由亲和层析的整体或部分片段的 IgG 纯化证明是成功的。人造蛋白 A (ApA) 配体 (Li 等,1998) 将来自人血浆的 hIgG 洗脱至 98% 的绝对纯度并且显示了 20.0mgIgG g⁻¹ 湿重凝胶的表观结合容量。据认为该配体模拟位于天然存在的蛋白 A (来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)) (SpA) 的片段 B 内的螺旋末端的连续 Phe132-Tyr133 二肽。已知该天然存在的蛋白的此具体区域主要通过疏水相互作用结合 IgG 的 CH2 和 CH3 域,因此 ApA 具有在常规 Fc 结合部位和备选的 Fab 结合部位结合 IgG 的能力 (Hillson 等,1993)。

[0552] 在该研究中,除特定 Fab 和 Fc 结合配体以外,已经鉴定显示出对于整个 hIgG 的结合的 Ugi 配体。用于模拟 ApA-样相互作用而选择的此组合文库的组分包括苯甲酸 (C5),酪胺 (A1),4-氨基苯酚 (A5),3-氨基苯酚 (A6) 和 4-羟基苄胺 (A7)。

[0553] 以下显示三嗪基免疫球蛋白特定配体。(A) 人造蛋白 A ;(B) 优化 IgG-结合配体 22/8 ;(C) PpL 仿生配体 8/7。注:使用的配体命名法是指组合三嗪文库组分。

[0554]



[0555] 通过许多年内对使用有关配体结构的故意偏倚的组合文库的逐渐最优化过程 (Teng 等,1999),ApA 配体在结构上进化成了邻近的三嗪配体 22/8 (Teng 等,2000)。取决于所使用的洗脱缓冲液的 pH 值,疏水配体 22/8 显示以 67-69% 的回收率和 97-99% 的纯度洗脱 hIgG,并且显示出 51.9mgIgG g⁻¹ 湿重凝胶的改进的结合容量,大大高于之前的 ApA 配体的结合容量。此外,配体 22/8 还显示了以与 ApA 和 SpA 的结合类似的方式对 Fab 和 Fc 片段的结合。

[0556] 引入到此文库中以模拟由配体 22/8 表现的相互作用的组分包括下列胺:酪胺 (A1),4-氨基苯酚 (A5),3-氨基苯酚 (A6) 和 4-羟基苄胺 (A7) 和萘酚衍生物 1-氨基-2-萘酚 (A3) 和氨基-8-萘酚 (A8)。据认为,尽管 SpA 与 Fab 片段相互作用,但是 SpA 与 IgG 接触所凭借的主要相互作用是通过 Fc 区域,因此当将选择用于模拟这种相互作用的上述组分结合到 Ugi 支架之中时,将期望其以类似的方式相互作用,并且潜在地产生 Fc-特定配

体。在用于产生 Fab- 特异性 Ugi 配体的进一步尝试中,许多分开的组分也被结合到此文库中,其类似于蛋白 L 模拟配体 8/7 的结构和功能性 (Roque 等,2005b)。蛋白 L (PpL) 是一种细菌表面蛋白 (来自 *Peptostreptococcus magnus*),其对 $\kappa 1$, $\kappa 3$ 和 $\kappa 4$ 亚组的轻链具有高亲和力,但是对 $\kappa 2$ 和 λ 亚组的轻链不具有高亲和力 (Nilson 等,1992;Enokizono 等,1997),因而与整个链或轻链相关的 IgG 片段 (即 Fab 和 scFv) 都相互作用。此具体配体的类似功能要素在本 Ugi 文库中由胺组分 4-氨基苯甲酰胺 (A4) 与羧酸组分戊二酸 (C1),2,4-吡啶二羧酸 (C2),异酞酸 (C3) 和 Boc-保护的谷氨酰胺 (C4) 一起反映。而且,从三嗪基文库模拟酪氨酸出现的 9 种推定的先导配体中的 7 种 (即含有的酪胺 (A1)) 进一步证明此组分包含在 Ugi 文库选择方法之中是正当的。关于模拟酪氨酸基团的另外的支持证据来自下列研究,所述研究描述了在将 PpL 残基 Tyr⁵¹ 和 Tyr⁵³ 分别化学修饰时,PpL 显示出对 IgG 的亲力的 140 倍降低 (Beckingham 等,2001)。顺便提及,选择的最终候选配体 (8/7) 由于由配体 8/7 显示的较高特异性水平而没有包括酪氨酸官能团。

[0557] 最近文献表明,存在在不同 PpL 域中保守并且在从 PpL 域 (链 $\beta 2$ 和 $\alpha 1$ 螺旋) 形成复合物时被大部分包埋的 7 个关键残基,其涉及 PpL 和 IgG 轻链之间的主要相互作用。这些残基在以下列出,随后是它们的斜体 Ugi 文库类似物:Gln³⁵:4-氨基苯甲酰胺 (A2) 和 Boc-谷氨酰胺 (C4);Thr³⁶:1-氨基-2-丙醇 (A4);Ala³⁷:乙酸 (C6);Glu³⁸:戊二酸 (C1),2,4-吡啶二羧酸 (C2) 和异酞酸 (C3),Phe³⁹:苯甲酸 (C5);Lys⁴⁰ 和 Tyr⁵³:酪胺 (A1),4-氨基苯酚 (A5),3-氨基苯酚 (A6) 和 4-羟基苄胺 (A7)。

[0558] Ugi 文库筛选和推定先导物选择

[0559] 在为了快速鉴定用于进一步开发和评价的先导候选物的尝试中,建立非优选标准层析筛选条件,以确定出现的文库候选物的功效。分别关于 hIgG, hFab 和 hFc 结合的配体吸附剂的数据显示在图 3,4 和 5 中,如通过标准 Bradford 试验 (Bradford 1976) 确定的。对数据的分析促进了对于整个 hIgG,和特定 hFab 和 hFc 片段结合配体的先导配体的选择。

[0560] 关于先导配体选择的主要标准是潜在的 hIgG 结合,所述 hIgG 结合是基于观察到的得到的总 hIgG 结合容量。候选配体 A7C5, A8C5 和 A8C6 显示了来自施用于每一列的最初 500 μ g ml⁻¹ 加载量的 100% hIgG 结合。关于 hIgG 先导物结构以及非优化吸附 / 脱附%, 参见图 6。令人感兴趣的是,推定的先导配体 A7C5 表现了 ApA 配体的邻近功能模拟,从而支持所使用的全文库选择方法。相反,在 Ugi 文库 (A1C5) 中呈现的直接 ApA 模拟的表现不像 A7C5 一样好 (43% hIgG 结合),这可能归因于由与更加刚性的 4-羟基苄胺组分 (A7) 相比,由酪胺组分 (A1) 贡献的另外的柔性,并且还可以有助于解释观察到的结合容量的 ~ 57% 损失。从 Ugi 文库的详细结合分析可知,除变化的 Fab 和 Fc 结合模式以外,含有氨基-8-萘酚组分 (A8) 的所有配体都显示 100% hIgG 结合。这表明,含有 A8 组分的配体可以表现出与三嗪配体 22/8 的结合性质类似的结合性质 (即对于整体, Fab 和 Fc 片段的免疫球蛋白结合)。

[0561] 氨基-萘酚组分 1-氨基-2-萘酚 (A3) 还显示出有希望的整个 hIgG 结合 (约 60-86% 的结合强烈依赖于羧酸组分),然后,关于羧酸 C1-C4,观察到对于 Fab 片段的完全特异性 (即 0% Fc 结合)。这可以解释观察到的与 A8 组分相比的对 A3 组分减小的 hIgG 结合。基于此观察,将 A3C1, A3C2, A3C3 和 A3C4 选为用于进一步优化研究的推定 Fab 先导物。关于 hFab 先导物结构和非优化吸附 / 脱附%, 参见图 7。

[0562] 提出的 hFc 先导候选配体 A2C2, A2C4 和 A2C5 (图 8) 的选择还提供了 Ugi 和三嗪支架在配体结合性质方面不同的一些证据。配体 A2C1 在取代官能团方面是与三嗪基仿生蛋白 L 8/7 直接等同,然而,当在 Ugi 支架上取代相同的官能团时,此配体似乎显示出对于 Fc 片段的完全特异性。本申请人还观察到,7 种完整 IgG 和 Fab- 特异性先导物中的 6 种包括两种密切相关的萘酚组分 (A3 或 A8) 中的一种,并且这些配体的大部分很好地响应于非优化洗脱条件 (0.1M NaHCO₃, 10% (v/v) 乙二醇, pH 10.0)。相反, A2 相关的 hFc 先导物都没有很好地响应于选择的洗脱条件,这有力地表明,这些配体对 hFc 的结合模式与在此研究中鉴定的完整 IgG 和特定 hFab 先导物的结合模式不同。这可能是由于在结合部位附近存在的暴露于溶剂的残基的属性,这又构成了在这些配体和它们各自的靶标之间可以发生的相互作用类型。使用作为软件包 HyperChem 7.5Professional (<http://www.hyper.com/index.htm>) 的一部分的计算方法比较两种随机选择的 hFab 和 hFc 片段 (分别地 PDB 编码 1AQK 和 1H3W) 的整体疏水性。基于暴露于溶剂的氨基酸残基的所述两种蛋白片段的 LogP 值 (hFab $\log_{10}P = -1573.3$; hFc $\log_{10}P = -510.4$) 表明, hFc 的疏水性比 hFab 片段的疏水性显著更强 (约 $Fc > Fab \ 3x$)。此类型的分析还有助于规定用于大规模纯化方法而选择的 Fab 和 Fc 先导配体所需的最终优化吸附和脱附条件。

[0563] 以上报道的结合容量是由单一批次的靶蛋白结合平均 ~ 30s 的柱停留时间以及非优化吸附 / 脱附条件确定的。此简单筛选程序的目的在于,确定关于每一种配体的相对结合容量值以简化先导物选择过程。进一步设想的是,还需要源自精确前沿分析 (frontal analysis) 的结合容量以确定在优化条件下的先导配体候选物 (1ml c. v 范围),从而揭示与当前可用的 IgG 结合配体的可比较值。这些配体典型表现出在 ~ 40mg ml⁻¹ 湿重凝胶范围内的结合容量。最近,关于完全和片段化的免疫球蛋白靶标,还从此文库出现了其它合适的潜在候选配体。最初先导物选择主要基于绝对结合容量,特异性和对于在筛选程序中施用的非优化吸附和脱附条件的响应。还设想的是,还将通过下列方面进一步优化和表征这些先导候选物以改进配体结合和洗脱性质:可变长度间隔臂 (C2-C8) 的引入,使用的层析条件的进一步优化,和可变异胍组分的利用。然而,在需要时还可以考虑其它候选配体,从而利用这种迭代方法用于配体设计。

[0564] 本文中显示的数据还揭示了在 Ugi 支架上取代的胺组分的特定家族,其提供对于 hFab (A3 和 A4) 和 hFc (A2 和 A7) 片段的特异性,因此不令人惊奇的是所有的鉴定 hFc 先导物均含有 A2 胺组分。另外, A8 胺组分产生了大量的用于结合完整 IgG 和片段化靶标两者的非特异性、相对高容量的吸附剂,从而证明其包括在两种完整 IgG 先导物中是正当的。相反,关于结合的羧酸组分所鉴定的趋向并非如此可以容易确认,这可以表明胺组分在确定配体 - 靶结合界面方面具有首要重要性。

[0565] 关于因子 VIII 的亲亲和配体的鉴定

[0566] 在进一步的研究中,制备化合物的集合以鉴定关于因子 VIII 的可能亲和配体。与以上关于 IgG 实验所述的类似的方式制备每一种化合物。因而,在 Ugi 多组分反应中将连接到载体的醛官能化的连接体与羧酸,胺和异脒反应。然后将产物关于它们结合因子 VIII 的能力进行筛选。相对于之前鉴定的配体,比较每一种化合物的结合能力。

[0567] 此计划研究了开发小分子亲和配体以改进全长重组因子 VIII 的大规模纯化的成本效益的可能性。此产品当前被用作治疗血友病 A 和相关的血液病症的被证实的临床生物

治疗分子。

[0568] 小分子配体优于现有 C7F7 单克隆抗体树脂方法（例如由 Bayer 所使用的）的优点在于，小分子配体在制备方面显著更廉价，并且可以承受用于多次柱运行（runs）的更苛刻的树脂再生条件，所述条件在目前对于 Bayer 抗体柱是不能使用的。

[0569] 基于将特定官能团结合到普通 Ugi 支架上而开发了一系列亲和配体，所述普通 Ugi 支架本身在分开的程序中通过在固相基质载体（SepharoseCL-6B）上建立的醛部分而取代。表示作为单一多组分反应的在 Sepharose 珠子上形成最终配体结构的基本化学要求使用 4 种分别的组分：醛（R¹），伯 / 仲胺（R²），异腈（R³）和羧酸（R⁴）。

[0570] 连接体和载体制备

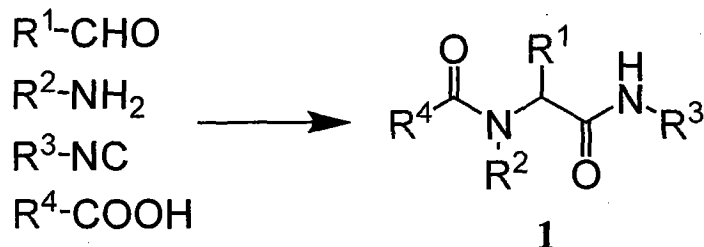
[0571] 使用的连接体和载体与以上关于 IgG 实验所述的那些相同。

[0572] 化合物集合的制备

[0573] 遵循以上关于 IgG 实验所述的 Ugi-基方案制备化合物的集合。

[0574] 制备的化合物具有以下给出的一般结构：

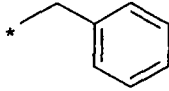
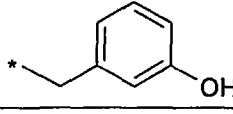
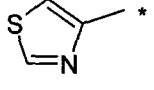
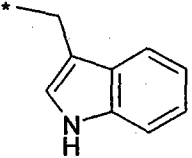

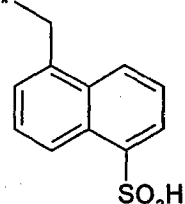
[0575]



[0576] 其中 R¹ 是连接体和载体，R² 是胺组分，R³ 是异腈组分，和 R⁴ 是羧酸组分。

[0577] 以下给出用于产生集合的羧酸，已经和胺组分的组合：

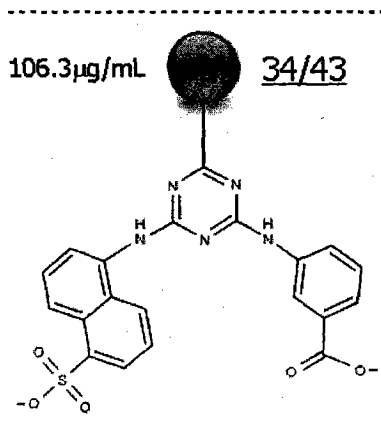
[0578]

名称	酸组分	胺组分	异腈组分	结合的因子 VIII ($\mu\text{g/mL}$)
U1				63.1
U2				71.9
U3				85.8
U4				98.9

[0579] 通过因子 VIII 微量培养板试验筛选每一种化合物 :U1 至 U4, 并且将结果在以上表中给出。这些结果显示, 增加的芳族杂环复杂性改进因子 VIII 结合。

[0580] 该结果不亚于三嗪配体 34/43 的结合容量 ($106.3 \mu\text{g/mL}$), 所述三嗪配体 34/43 由本发明人之前制备并且是关于因子 VIII 的已知配体。

[0581]



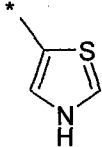
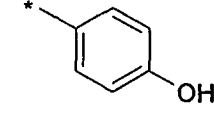
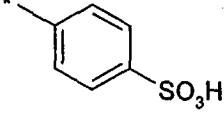
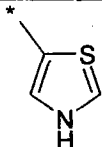
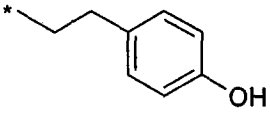
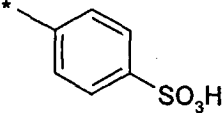
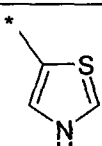
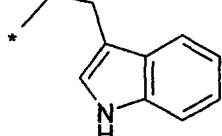
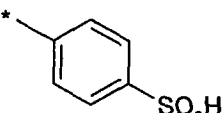
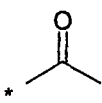
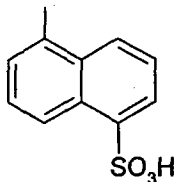

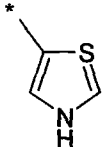
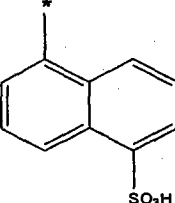
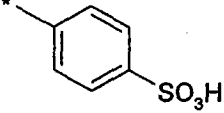
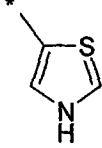
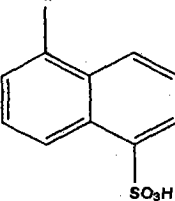

[0582] 最初因子 VIII 微量培养板试验的结果显示, 随着胺组分根据增加的结构和静电复杂性而改变, 还存在着观察到的因子 VIII 结合的增加, 这与关于三嗪基先导配体所看到的增加类似。这表明, 尽管两种支架 (三嗪和 Ugi) 在化学结构方面大大不同, 但是保留了单独官能团对因子 VIII 结合的影响, 从而允许先导物发现的类似过程发生。

[0583] 基于从最初集合得到的结果, 制备另外的配体并且关于因子 VIII 结合和洗脱性质对其进行筛选。这些研究已经通过下列方法进行: 使用简单微量滴定板试验 (树脂体积 $40 \mu\text{L}$ /孔) 确定近似的因子 VIII 结合亲和力, 随后使用重力流动填充树脂柱 (0.5mL 树脂体积) 进行更详细的研究。这些填充柱研究更精确并且允许进行简单的实验而确定绝对树脂亲和力, 其中将柱 (200mL , $100 \mu\text{g/mL}$) 逐渐饱和, 以及在对柱连续加入每一个因子 VIII 等分部分以后跟踪蛋白浓度。以此方式, 可以建立结合并且每一种配体的洗脱性质平行。

[0584] 用于研究选择的配体的洗脱性质的另一种类型的研究是: 通过单一因子 VIII 等分部分 (1.2mL $100 \mu\text{g/mL}$) 的重复加入 ($\times 10$) 而最初试图将 0.5mL 填充柱饱和, 随后可以经验确定蛋白浓度, 接着随后加入一系列洗涤和洗脱缓冲液等分部分 ($400 \mu\text{L}$)。因此, 可以在高初始因子 VIII 装载量的条件下跟踪配体的结合和洗脱性质。这些研究的特征导致这样的观察: 关于因子 VIII 洗脱, 选择的 Ugi 配体很好地响应于高浓度的单价和二价阳离子盐 (CaCl_2 , NaCl)。在此报告中表明的是, 这可以形成关于因子 VIII 的差别纯化 (differential purification) 方法的基础。通过正确鉴定结合、洗涤和洗脱条件还可以去除显著水平的背景宿主细胞蛋白结合。

[0585] 然后使用 Ugi 多组分反应制备另外的文库。酸, 胺和异脒组分与因子 VIII 微量培养板试验数据一起在下表中给出。醛组分再次是醛官能化的琼脂糖。

[0586]

名称	酸组分	胺组分	异脞组分	结合的因子 VIII ($\mu\text{g/mL}$)
5U				97.8
6U				66.1
7U				104.8
8U				110.1
9U				107.5
4U				109.6

[0587] 通过因子 VIII 微量培养板试验对 Ugi 配体 (4-9U) 和三嗪配体 34/43 进行最初筛选, 结果显示在胺 (R2) 位置中朝向双环芳族环的一般趋向对因子 VIII 结合具有正面影响。在异脞 (R3) 位置中的另外的磺胺酸部分的存在没有表现出强烈地影响因子 VIII 结合, 类似地, 在羧酸 (R1) 位置中的噻唑部分的存在没有提供强烈的另外的结合潜力。基于这些研究, 看得出最初的三嗪配体 34/43 仍拥有最强的因子 VIII 结合和洗脱特征。

[0588] 使用填充柱 (0.5mL 配体树脂) 的选自此系列 (4, 8, 9U+ 配体 34/43) 的配体的进一步研究确定, 4U, 8U, 9U 的因子 VIII 结合潜力显著低于三嗪配体 34/43 的因子 VIII 结合潜力, 然而, 使用类似洗脱条件: 0.5M CaCl_2 /50% 乙二醇 /20Tris. HCl pH 7.0, 洗脱性质看起来比得上该配体 (参见图 9 和 10)。

[0589] 关于选择的 Ugi 配体 4U, 8U 和 9U 的减小的因子 VIII 结合潜力促使本申请人设计并合成另外的配体和合适的对照配体, 以进一步研究此效果的属性。现在的 Ugi 配体组是 10-17U, 关于 VIII 结合和洗脱性质对其进行研究 (参见图 7)。本申请人最初通过因子 VIII 微量培养板试验筛选了许多的这些新配体和在此报告中提到的之前的实例。配体 U14 和

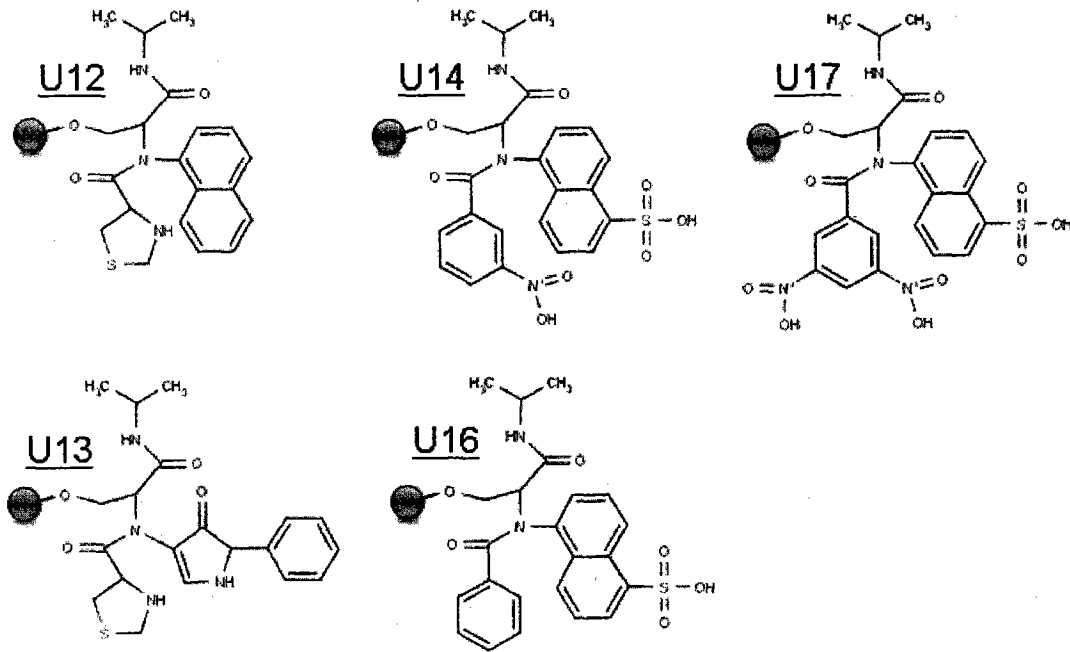
U17 含有硝基和二硝基苯部分,以考虑对于之前使用的苯甲酸的置换基团,并且试图考虑因子 VIII 对磷脂酰丝氨酸的潜在结合模式而重新定义配体结构。在这方面,清楚的是,本申请人还需要制备具有在羧酸 (R1) 位置取代的苯甲酸的另外的配体,以将该潜在的结合模式与迄今为止制备的配体进行比较。

[0590] 此研究的结果显示,三嗪配体 34/43 始终如一地产生最高的因子 VIII 结合潜力之一,然而注意的是,Ugi 配体 4U,7U,8U,9U 和 U14 产生类似高水平的因子 VIII 结合。还显然的是,配体 U10-U13 产生显著较低的因子 VIII 结合,如通过此简单试验判断的。由这些结果表明的是,甚至在官能萘部分的存在下 (Ugi 配体 -U12),Ugi 支架本身也对因子 VIII 结合没有特别强烈的影响。还显然的是,由来自珠子表面的 Ugi 支架提供的适当的间隔和萘磺酸酯部分的存在组合提供了强的因子 VIII 结合潜力,因为配体 U10 表现出减小的结合潜力 (参加图 11)。

[0591] 感觉微量培养板试验没有提供证实这些结果所需的精确性,因此,通过下列方法进行另外的因子 VIII 结合实验:将系列的因子 VIII 等分部分 (200 μ L 100 μ g/mL) 施加于 0.5mL 填充柱,以从包括三嗪配体 34/43 的所述组中选择 Ugi 配体 (参见图 12)。从此研究注意的是,Ugi 配体 14U 似乎显示出比三嗪配体 34/43 的因子 VIII 结合潜力更高的因子 VIII 结合潜力。还显示的是,Ugi 配体 4U 和 9U 显示出类似的减小的因子 VIII 结合潜力 (参见图 12)。在 4 种选择的 Ugi 配体 4U,14U,16U,17U 的分开的研究中也确认了此结果,这表明通过适当的配体设计可以鉴定不同的因子 VIII 结合模式 (参见图 13)。此结果有力地表明,在羧酸 (R1) 位置的苯芳环的存在有利地促进总的因子 VIII 结合潜力。清楚地,这需要通过适当地加入当前研究的不同官能团而进一步研究。同样,还值得注意的是,针对 C2 结构域的因子 VIII 的特定抑制剂的设计具有 4 种 6C-5C-5C-6C 芳环结构和另外的负电取代基 (CF_3 , NO_2 , = S, = O 和二氯代苯) 的一般方案 (Spiegel 等,2004)。

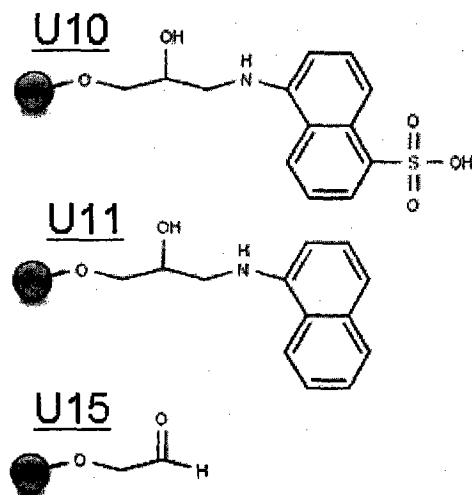
[0592] 关于选择的 Ugi 配体 (U8, U14, U16, U17) 结合因子 VIII 以及在 0.5mL 填充柱中洗脱因子 VIII 的能力,对其进行筛选 (参见图 14)。结果显示配体 8U 和 14U 性质类似,并且在最初的级分中以高的效率急剧洗脱。而配体 U16 和 U17 表现出在较宽的前部较低效率地洗脱。这表明,配体 U17 特别表现出具有与其它配体稍微不同的结合模式,这意味着二硝基苯基团强烈地影响结合或洗脱或所述两者。

[0593]



[0594] 还制备三种对照配体：

[0595]



[0596] 使用 Molegro 虚拟对接者 (virtual docker) 软件模拟 Ugi 配体与因子 VIII-C2 结构域

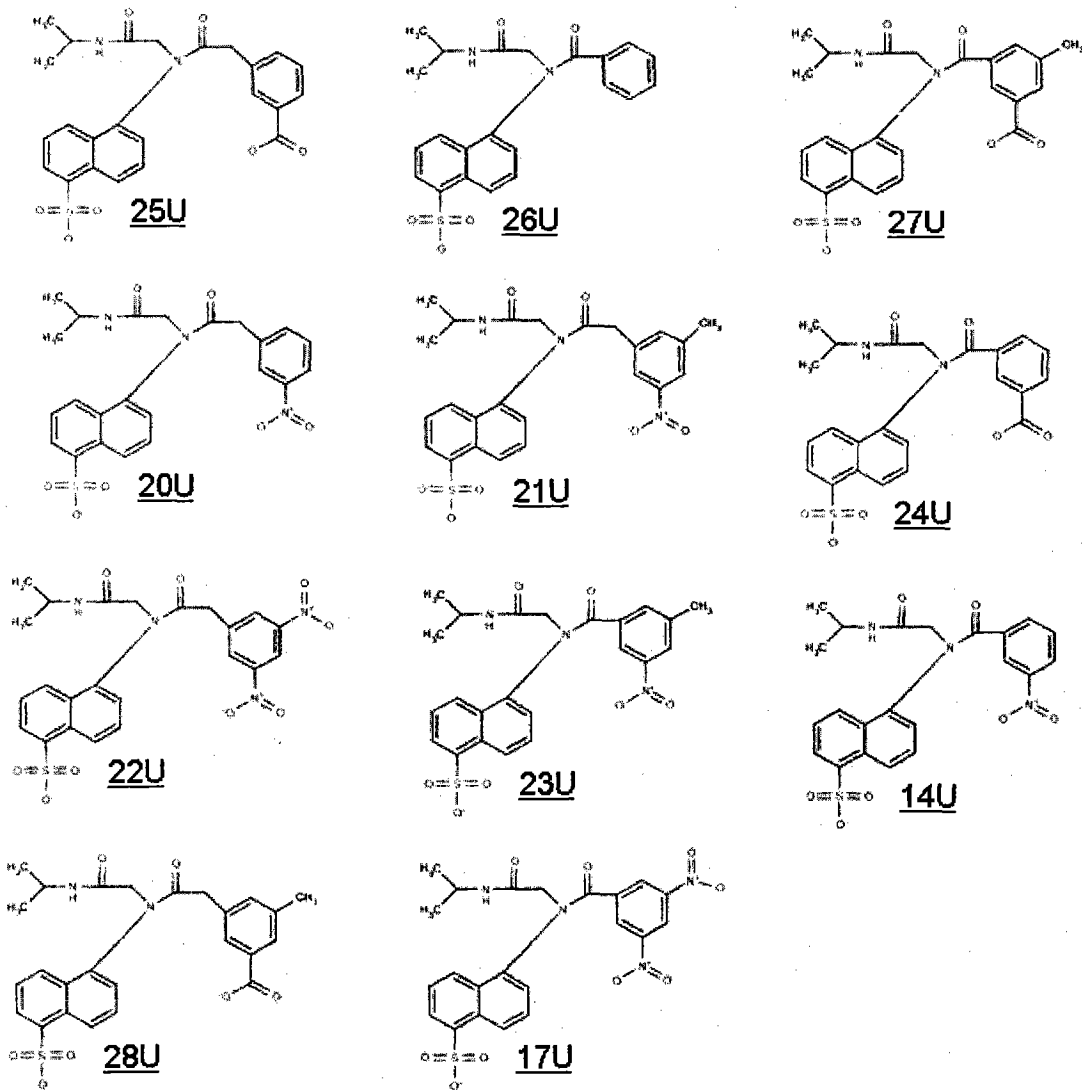
[0597] 最初使用一组训练 (training) 虚拟配体鉴别对因子 VIII-C2 结构域的两个离散区域的潜在结合模式 (参见图 12)。这两个表面空穴在尺寸上不同,半径从 10 至 17 埃 (参见图 13),并且在之前的研究中被鉴定为其中合适的配体可以有利地与 C2 结构域相互作用的潜在区域 (数据未示出)。将作为 Molegro 软件包 (SIM 生物系统, USA) 的一部分的自动对接 (docking) 软件 Moldock 用于评估配体结合,使用总计一组 50 种随机配体构象,4000 种分开的对接迭代以及平均超过 3 次的独立程序运行。该程序提供一组 5 种发现的最佳位姿 (对接模式) 模型,其结合有 Moldock 分值,亲和力和其它相关参数,例如 reRank 分值,

总静电能和总 H- 键能等。由此程序提供的定量数据作为附带的 excel 文件提供。

[0598] 结果显示,存在着一些证据证明在空穴 1 和 2 两者中的涉及 Ugi 配体 14U, 17U, 20U 和 21U 的改进的对接模式,所述证据与 MolDock 分值或亲和力参数相关。关于配体 14U 的建议的最佳对接模式显示为表面图(左下)和侧“棍棒(stick)”图(参见图 13)。最可能与此配体相互作用的残基显示如下:精氨酸 2220(蓝色 - 正电荷),谷氨酰胺 2316(莱姆绿 - 正 / 负电荷),苯丙氨酸 2196(红色 - 疏水),Asparagine 2224(淡绿色 - 正 / 负电荷),缬氨酸 2223(红紫色 - 非极性),组氨酸 2315(橙红色 - 正电荷)。类似地,关于配体 17U 显示了最佳对接模式,如上所述标记了最可能与此配体相互作用的残基(参见图 14)。这些研究的值得注意的特征是表面暴露的精氨酸残基与空穴 1 和空穴 2 两者中的磺酸酯部分或萘芳环结构的潜在相互作用。本申请人还在所述 excel 文件中包括了关于配体 4U 和 34/43(Bayer 编码 - 配体 3A) 的自动对接数据,其表明了与配体 4U 相比,空穴 1 对配体 34/43 的高结合潜力,这与迄今为止得到的实验数据紧密一致。配体 34/43 与空穴的对接模式特别好,其表明了对于单独指部(finger) 区域之间的 C2 结构域结构底部的高结合潜力。

[0599] 以下显示虚拟配体训练组:

[0600]



[0601] 值得注意的是,存在大量的表面暴露的精氨酸残基紧密接近因子 VIII C1/C2 结构域中的色氨酸残基,这将允许形成强的阳离子- π 相互作用。提示在所述萘磺酸酯部分和 C2 结构域之间的有利相互作用的一个特征可能包括这种相互作用。Friess 和 Zenobi 在 2001 年通过 MALDI 质谱法鉴定了在选择中的蛋白中的精氨酸残基和萘磺酸酯衍生物之间的确定相互作用。还已知的是,涉及蛋白-蛋白相互作用的热点富集于某些残基即色氨酸,酪氨酸和精氨酸中,据推测这些残基也参与形成特别强的相互作用 (Bogan 和 Thorn, 1998)。色氨酸和精氨酸残基在 C2 结构域的远端的独特布置可以与 VWF 蛋白和磷脂膜两者形成相互作用,其主要是通过由带正电荷的精氨酸残基产生的静电键以及由色氨酸残基产生的延伸的 π -云。本申请人当前在研究磺酸酯部分对于通过表面暴露精氨酸残基的蛋白结合的作用。在此方面中,因子 VIII-C2 结构域具有还与许多其它蛋白共有的两个磺酸酯结合部位。已知的是,蛋白中的磺酸酯和磷酸酯-结合部位在涉及的残基方面不同,然而,似乎主要涉及精氨酸残基。

[0602] 参考文献

[0603] 在说明书正文中参考下列文献。这些文献中的每一个都整个结合在此。

- [0604] Beckingham, J. A., Housden, N. G., Muir, M., Bottomley, S. P. 和 Gore, M. G. (2001)。" Studies on a single immunoglobulin-binding domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus*: the role of tyrosine-53 in the reaction with human IgG. " *Journal of Biochemistry* 353 :395-401.
- [0605] Bradford, M. M. (1976)。" A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. " *Anal. Biochem.* 72 :248-54.
- [0606] Enokizono, J., Wikstrom, M., Sjobring, U., Bjorck, L., Forsen, S., Arata, Y., Kato, K. 和 Shimada, I. (1997)。" NMR analysis of the interaction between protein L and Ig light chains. " *J. Mol. Biol.* 270(1) :8-13.
- [0607] Hillson, J., Karr, N., Oppliger, I., Mannik, M. 和 Sasso, E. (1993)。" The structural basis of germline-encoded VH3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A " *J. Exp. Med.* 178(1) :331-336.
- [0608] Holliger, P. 和 Hudson, P. J. (2005)。" Engineered antibody fragments and the rise of single domains. " *Nature Biotechnology* 23(9) :1126-36.
- [0609] Li, R. X., Dowd, V., Stewart, D. J., Burton, S. J. 和 Lowe, C. R. (1998)。" Design, synthesis, and application of a Protein A mimetic. " *Nature Biotechnology* 16(2) :190-195.
- [0610] Lowe, C. R. (2001)。" Combinatorial approaches to affinity chromatography. " *Current Opinion in Chemical Biology* 5(3) :248-256.
- [0611] Nilson, B. H. K., Solomon, A 和 Akerstrom, B. (1992)。" Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the k light chain variable domain. " *The Journal of Biological Chemistry* 267(4) :2234-2239.
- [0612] Roque, A. C. A., Lowe, C. R. 和 Taipa, A. M. (2005a)。" An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. " *Journal of Chromatography A* 1064 :157-167.
- [0613] Roque, A. C. A., Lowe, C. R. 和 Taipa, A. M. (2005b)。" Synthesis and screening of a rationally designed combinatorial library of affinity ligands mimicking protein L from *Peptostreptococcus magnus*. " *Journal of Molecular Recognition* 18(3) :213-224.
- [0614] Teng, S. F., Sproule, K., Husain, A. 和 Lowe, C. R. (2000)。" Affinity chromatography on immobilized " biomimetic " ligands synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand. " *Journal of Chromatography B* 740(1) :1-15.
- [0615] Teng, S. F., Sproule, K., Hussain, A. 和 Lowe, C. R. (1999)。" A strategy for the generation of biomimetic ligands for affinity chromatography. Combinatorial synthesis and biological evaluation of an IgG binding ligand. " *Journal of Molecular Recognition* 12(1) :67-75.
- [0616] Ugi, I., Meyr, R., Fetzer, U. 和 Steinbrückner (1959)。" Versuche

mitIsonitrilen." Angewandte Chemie71 :386.

[0617] Bogan AA. 和 Thorn KS.1998.-Anatomy of hot spots in proteininterfaces
J. Mol. Biol. 280 :1-9.

[0618] Friess SD. 和 Zenobi R.2001.-Protein structure information from
massspectrometry? Selective titration of arginine residues by sulfonates. J. Am.
Soc. Mass Spectrom. 12 :810-818.

[0619] Spiegel PC. 等 2004.-Disruption of protein-membrane binding
andidentification of small-molecule inhibitors of coagulation factor VIII.
Chemistry and Biology. 11 :1413-1422.

[0620] Thomsen R. 和 Christensen MH.2006.-Moldock :A new technique
forhigh-accuracy molecular docking. J. Med. Chem. 49 :3315-3321.

[0621] Novabiochem 目录 2006/2007, Merck 生物科学有限公司。

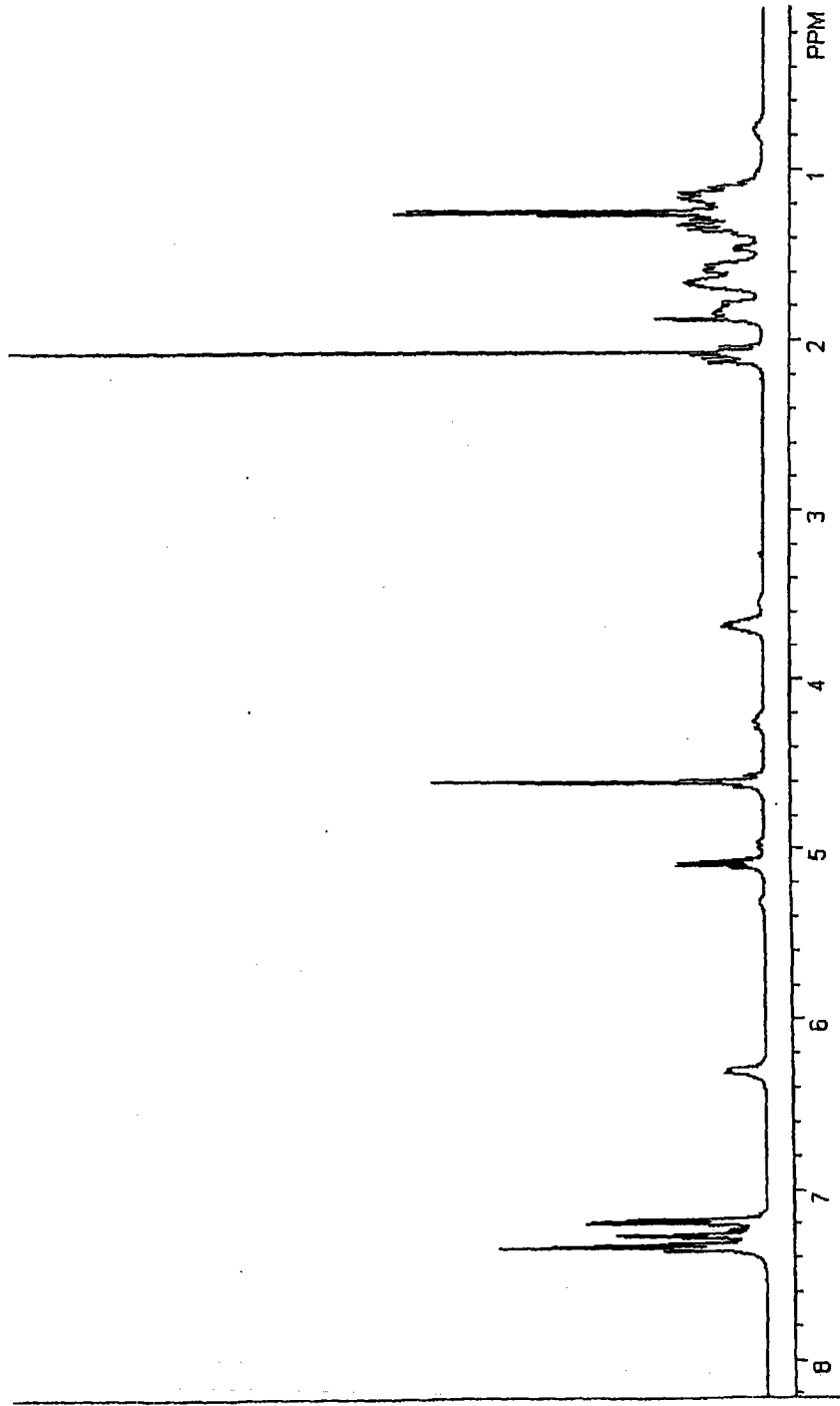


图 1A

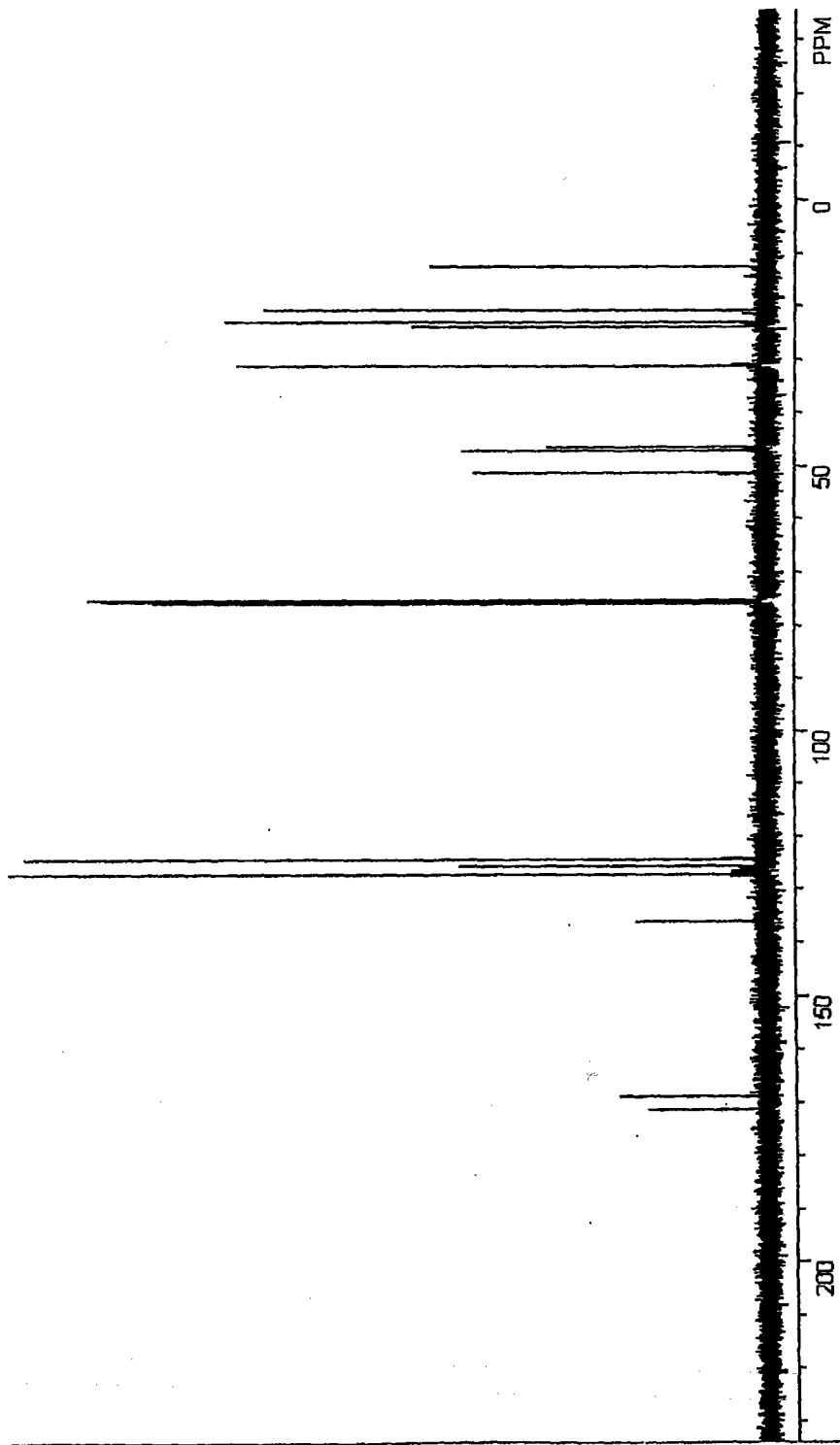


图 1B

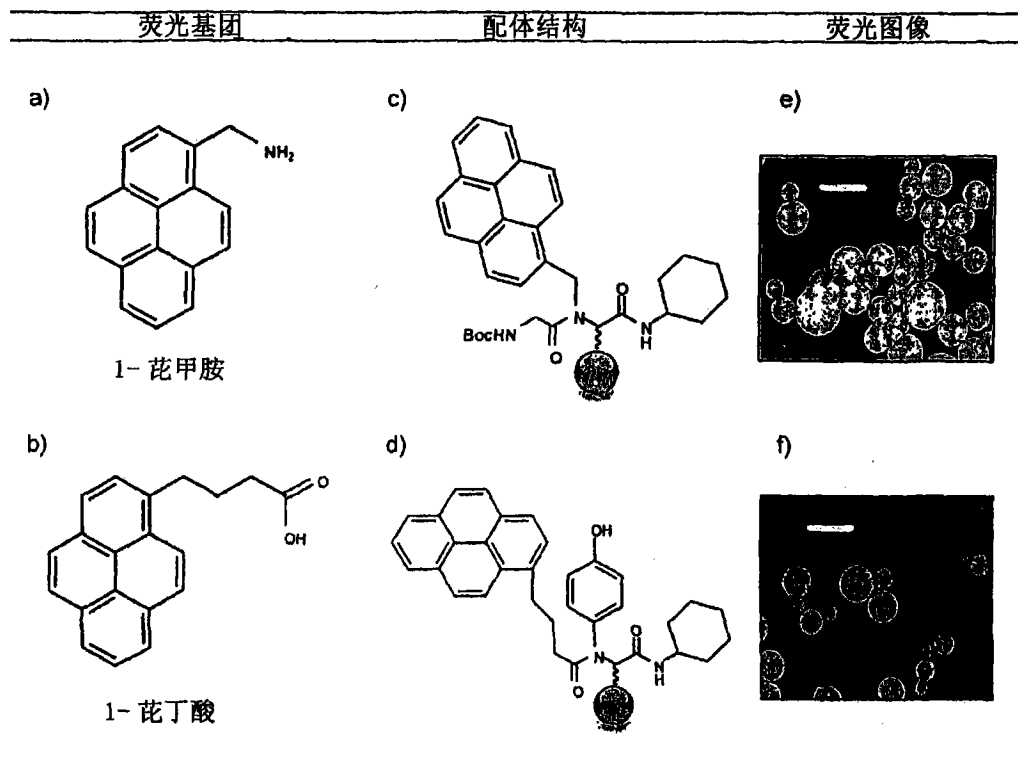


图 2

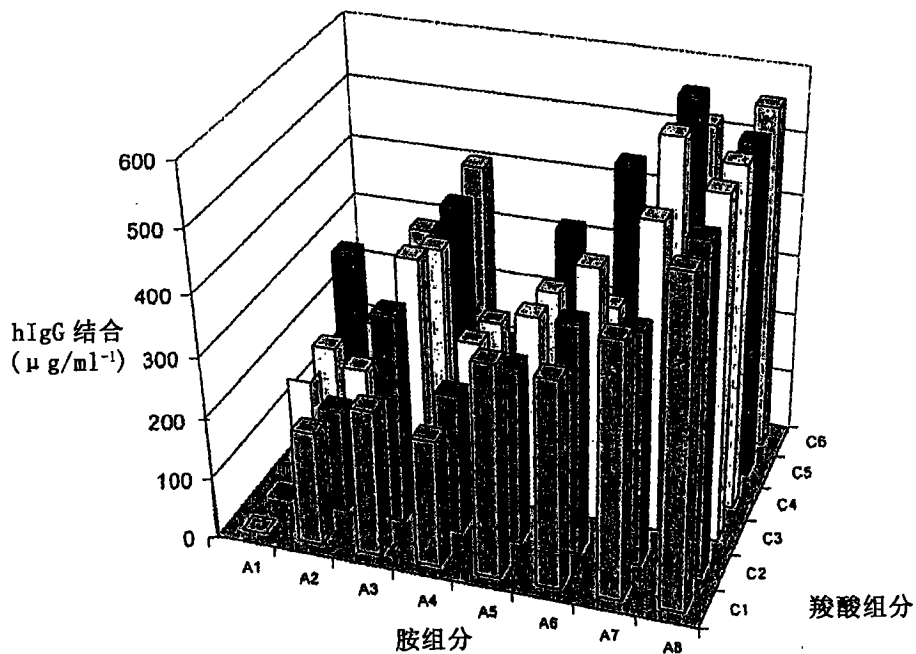


图 3

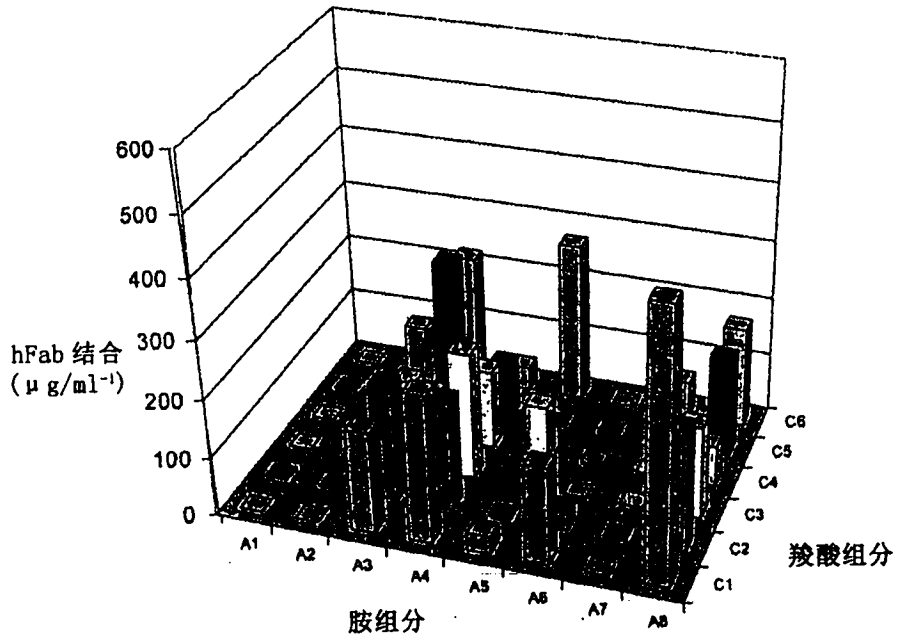


图 4

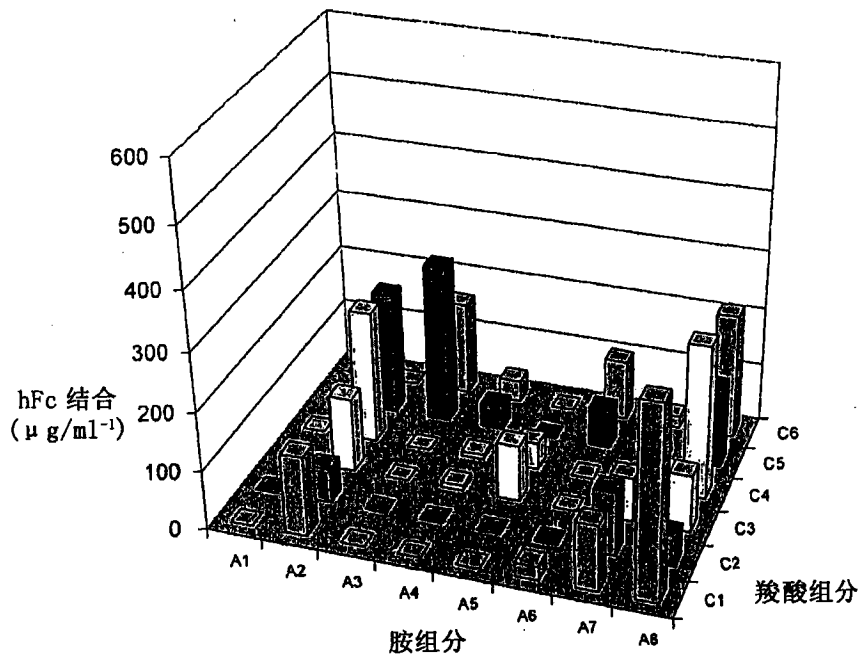


图 5

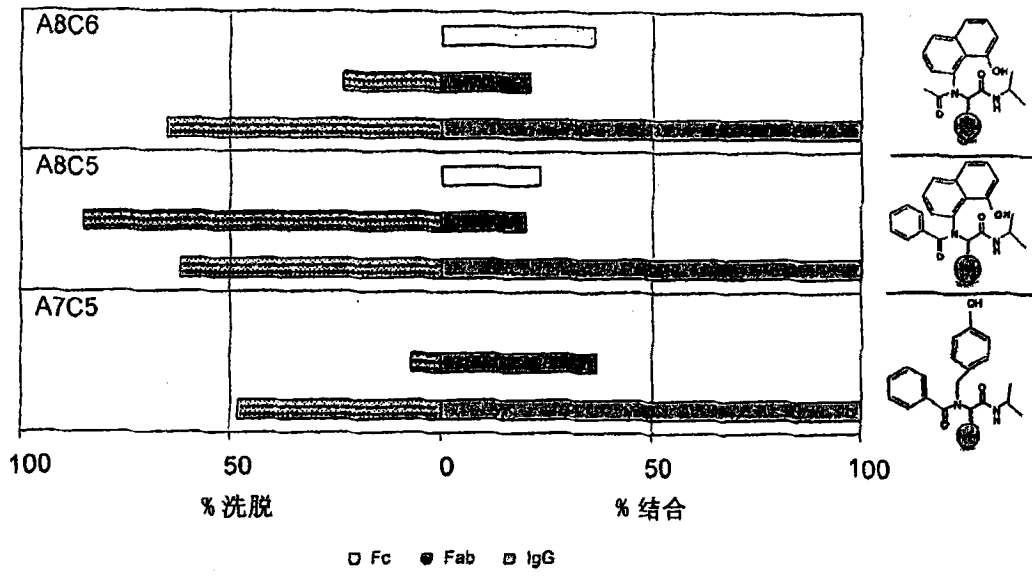


图 6

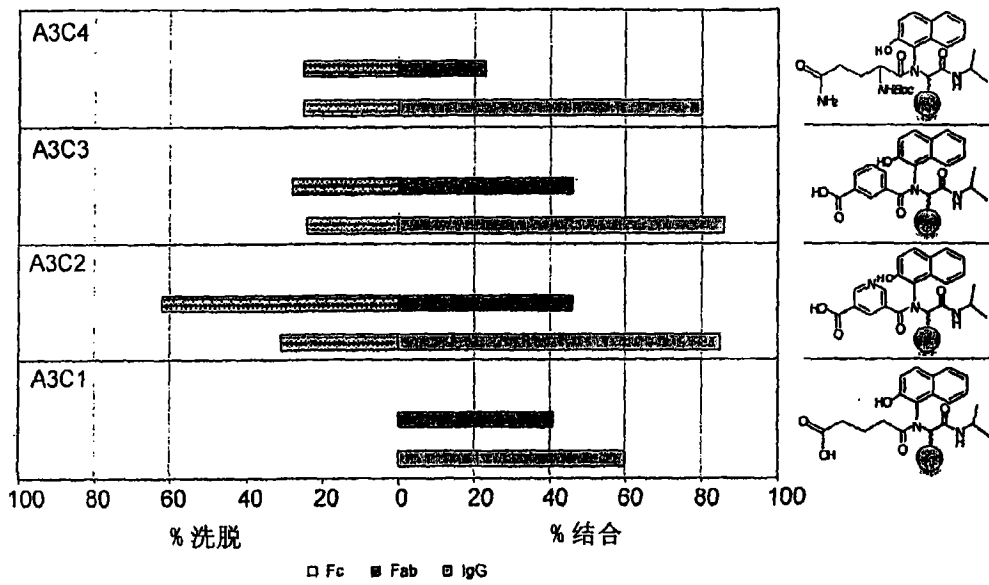


图 7

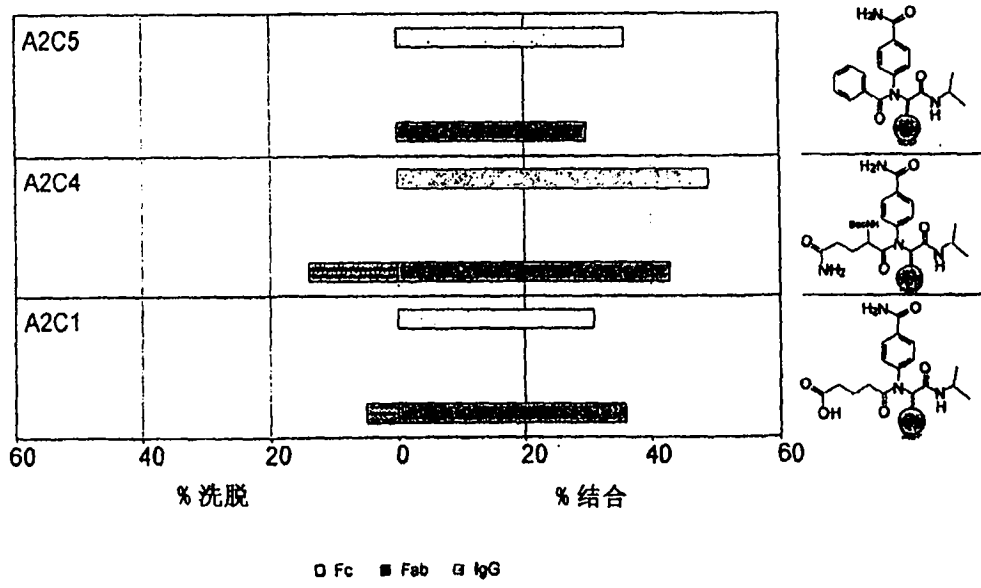


图 8

加入的因子 VIII 的系列等分部分 - 200 μ L (100 μ g/mL)

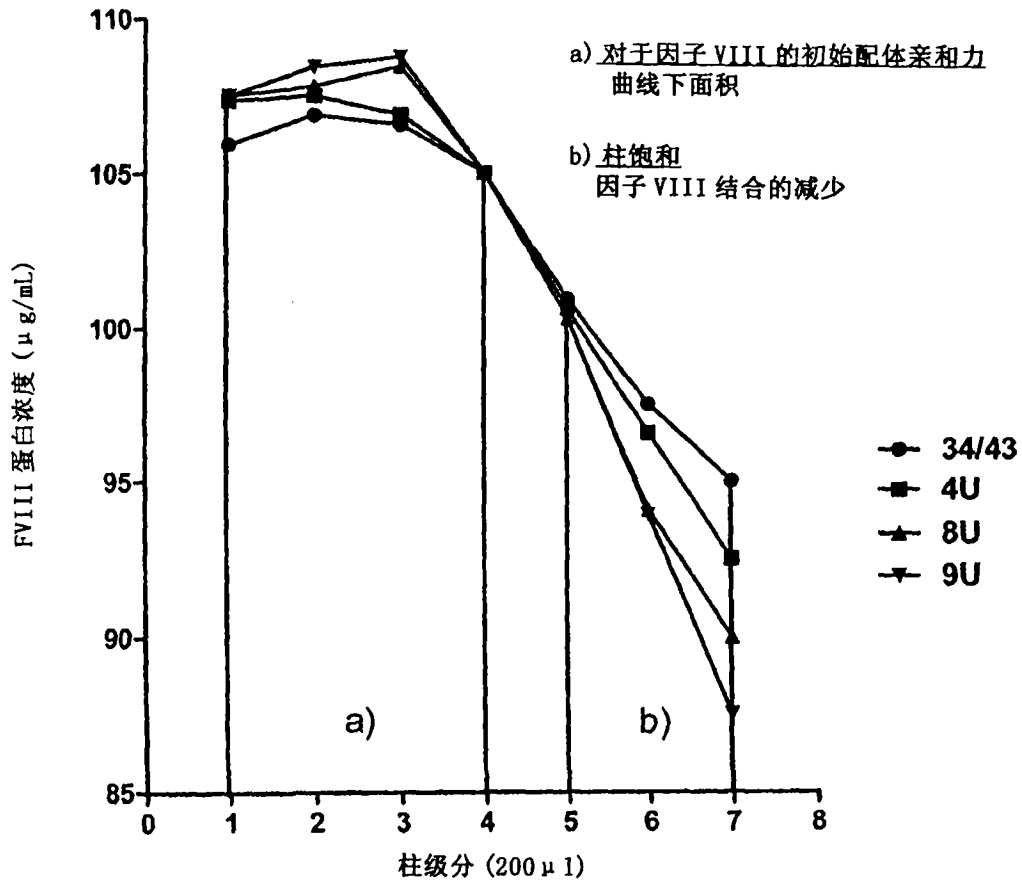


图 9

级分 1-2 负载 1.2mL (100 μg/mL)
级分 3 洗涤 0.005% 吐温 20 (T11)
级分 4-10 洗脱 0.5M CaCl₂/50% 乙二醇

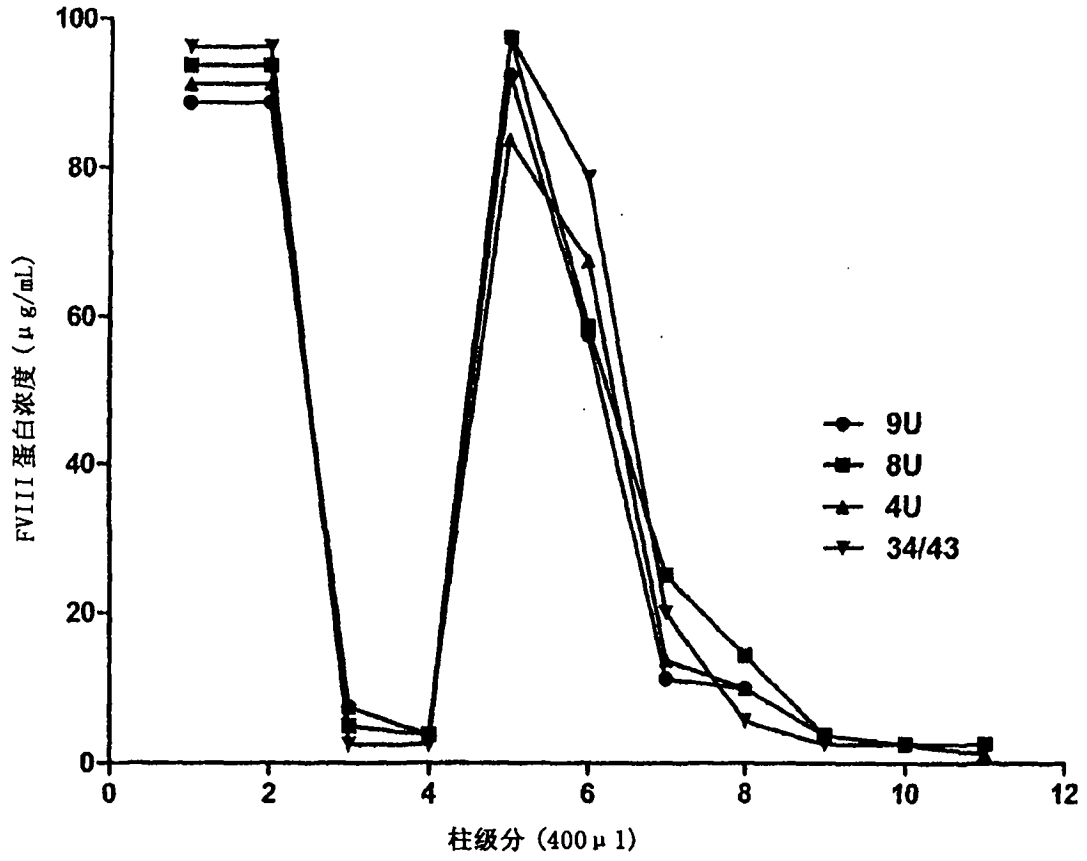


图 10

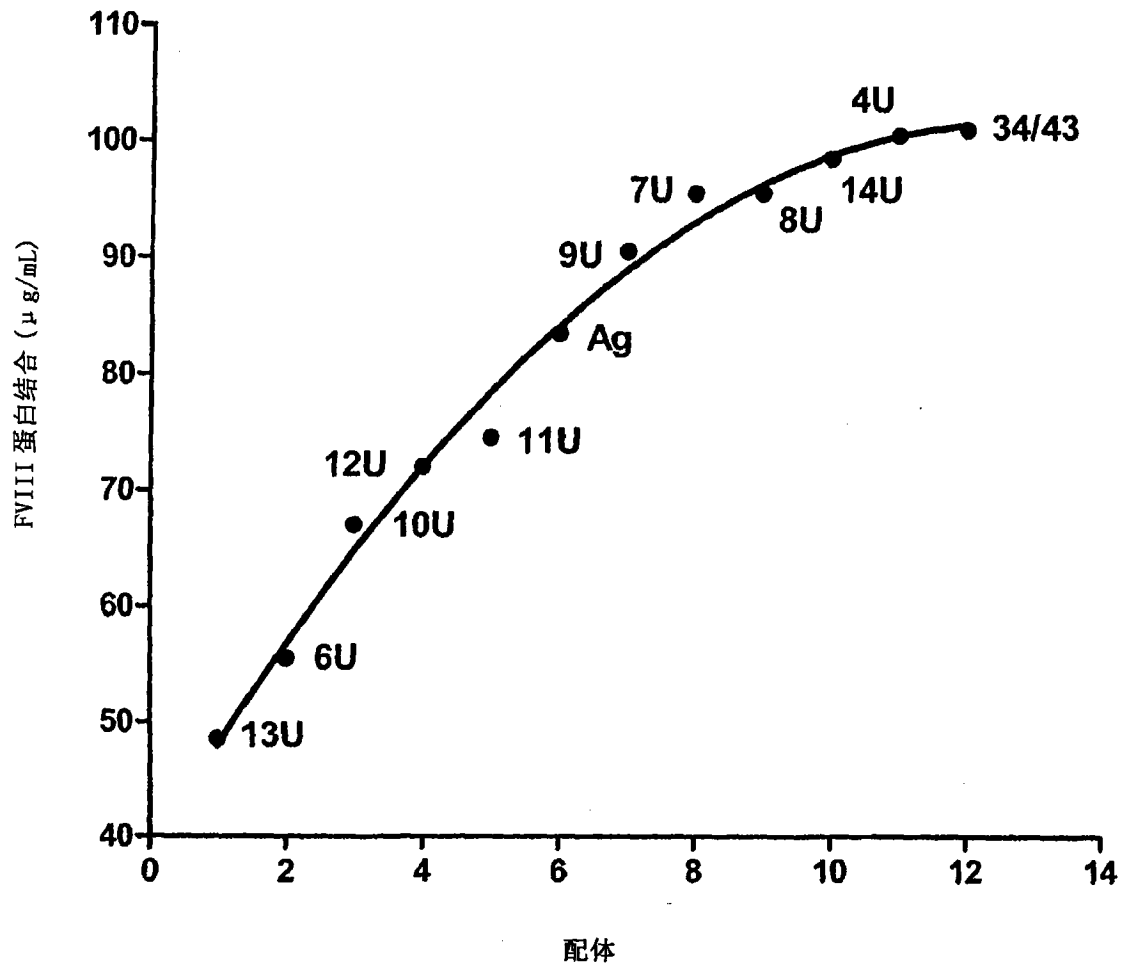


图 11

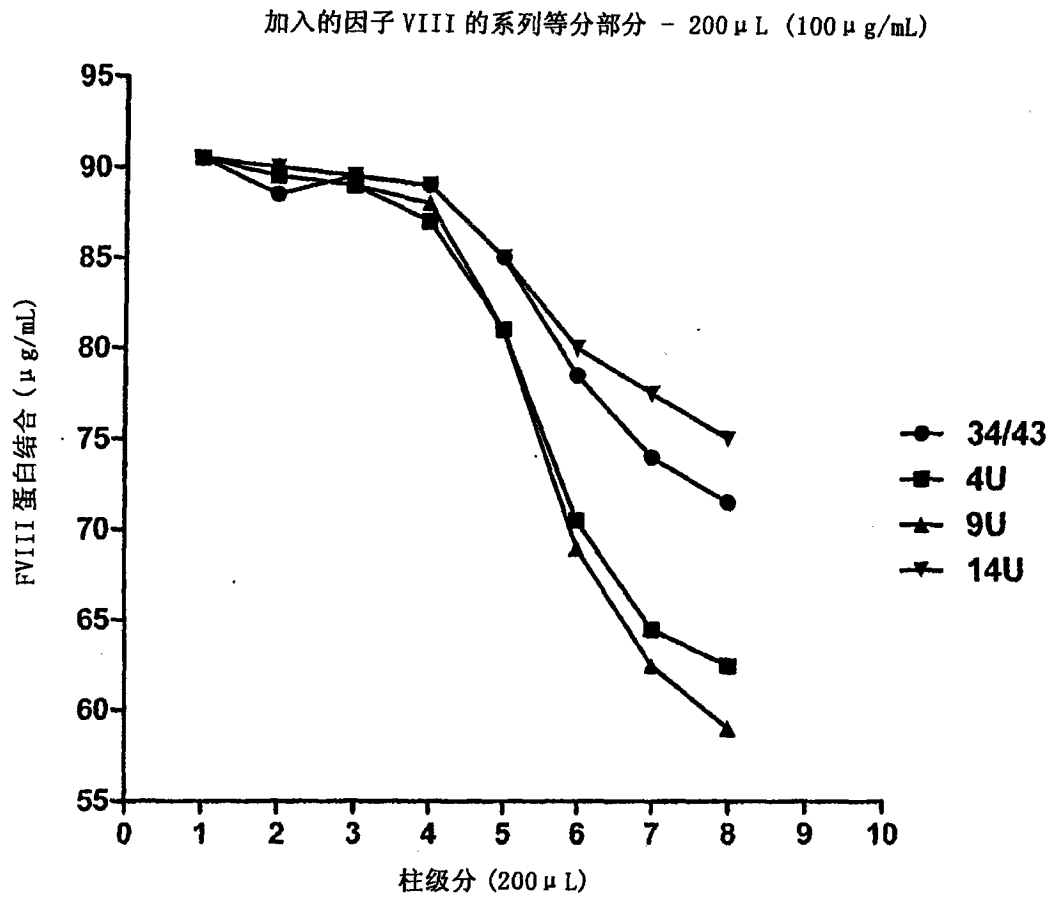


图 12

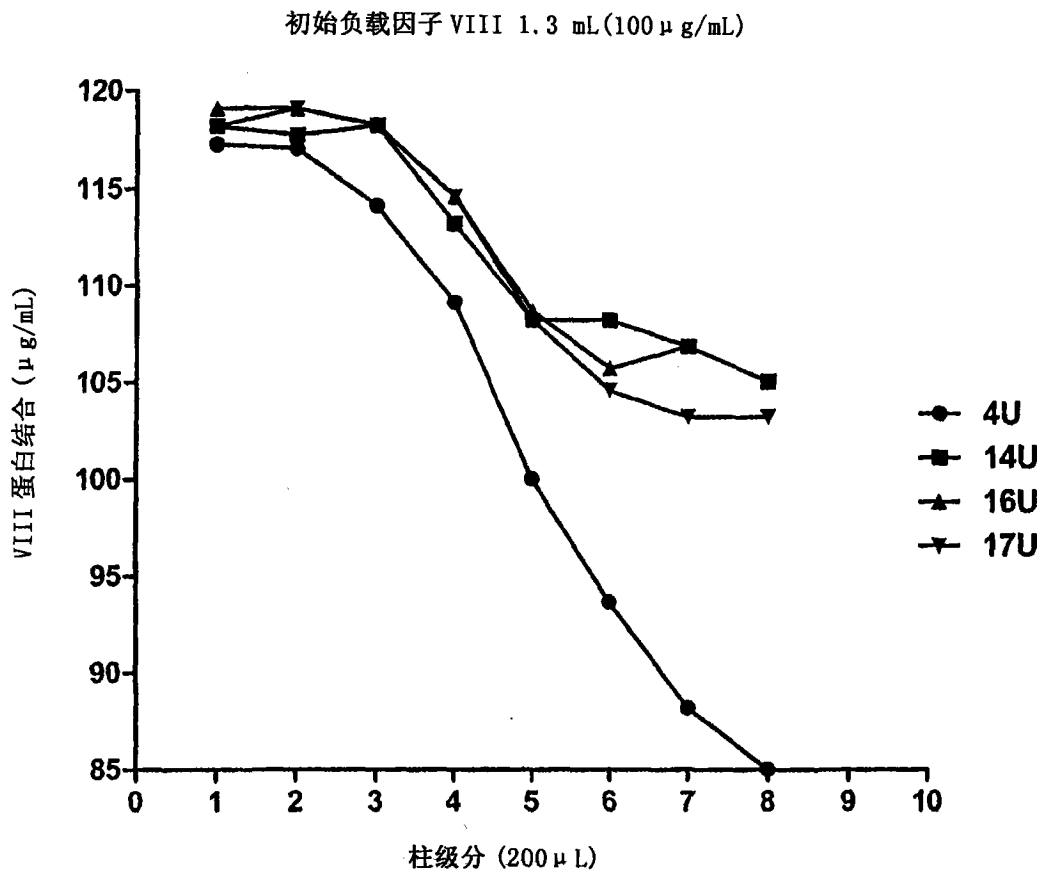


图 13

级分 1-2 负载 1.3mL (100 μg/mL)
级分 3 洗涤缓冲液 0.005% 吐温 20 (T11)
级分 4-10 洗脱缓冲液 0.5M CaCl₂/50% 乙二醇

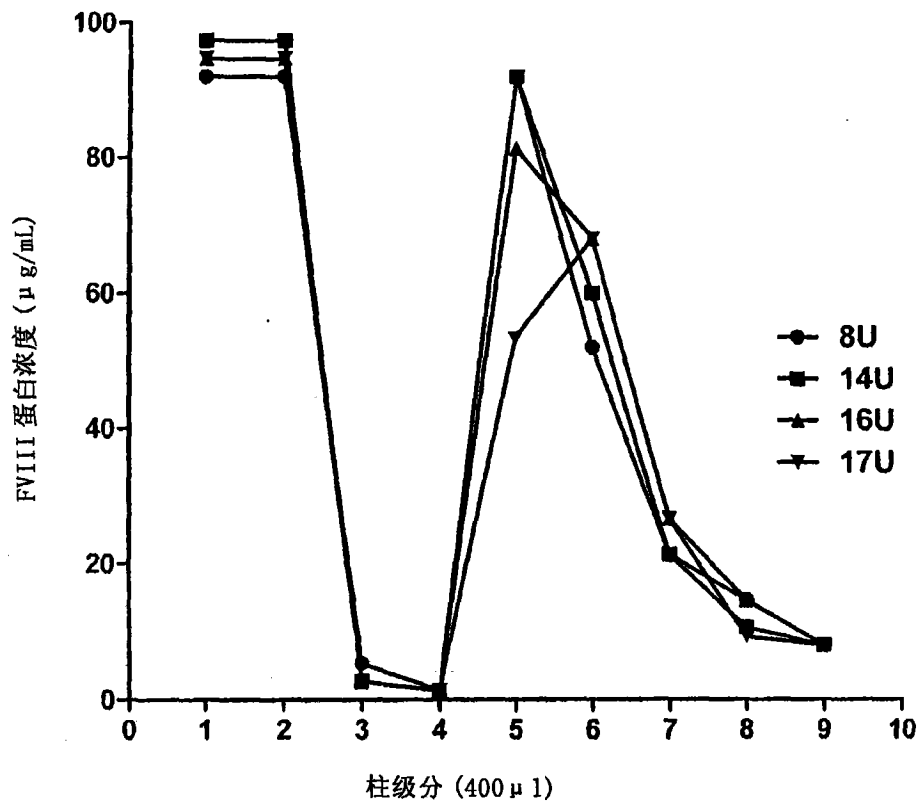


图 14

专利名称(译)	生物分子结合配体		
公开(公告)号	CN101796066A	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	CN200880104909.4	申请日	2008-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥企业有限公司		
申请(专利权)人(译)	剑桥企业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	剑桥企业有限公司		
[标]发明人	克里斯托弗·罗宾·勒韦 阿比德·侯赛因 迈克尔·路易斯·米马克 乔纳森·迈克尔·黑格		
发明人	克里斯托弗·罗宾·勒韦 阿比德·侯赛因 迈克尔·路易斯·米马克 乔纳森·迈克尔·黑格		
IPC分类号	C07K5/06 C07C309/51 C07B61/00 C40B30/04 C40B40/04 C40B50/14 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	B01J20/3244 G01N33/54353 G01N33/532 G01N33/531 B01J20/289 C07C309/51 C40B30/04 B01J2220/54 C07K1/22 C40B50/14 C40B40/04 B01J20/286 B01D15/3804 Y10T436/143333 Y10T436/145555 Y10T436/147777 Y10T436/17 Y10T436/200833		
代理人(译)	吴小明		
优先权	2007013187 2007-07-06 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供生物分子结合配体，生物分子结合配体的集合，以及它们在纯化生物混合物中以及在鉴定具有对物质的亲和力的配体中的用途。所述配体是式(III)的化合物或式(IV)的化合物：其中对于(I)的化合物，R1a，R1b，R2，R3和R4中的一个包含连接到载体的连接体的基团，并且R1a，R1b，R2，R3和R4中的其它基团独立地选自任选取代的C1-20烷基，任选取代的C3-20杂环基或任选取代的C5-20芳基，和R1a，R1b和R2另外选自氢，和R2另外进一步选自-S(=O)R5和-C(=S)NR6R7，其中R5，R6和R7独立地是任选取代的C1-20烷基，任选取代的C3-20杂环基或任选取代的C5-20芳基，或，任选地，R1a，R1b，R2，R3和R4中其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环；和对于式(II)的化合物，R1a，R1b，R3和R4中的一个包含连接到载体的连接体的基团，并且R1a，R1b，R3和R4中的其它基团独立地选自任选取代的C1-20烷基，任选取代的C3-20杂环基或任选取代的C5-20芳基，并且R1a和R1b另外选自氢，或，任选地，R1a，R1b，R3和R4中的其它基团中的两个或更多个与它们结合的原子一起可以形成环。

