



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104395335 A

(43) 申请公布日 2015.03.04

(21) 申请号 201380015641.8

(22) 申请日 2013.02.08

(30) 优先权数据

12154471.2 2012.02.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/052564 2013.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/117707 EN 2013.08.15

(71) 申请人 努艾利克斯德国股份有限公司

地址 德国曼海姆塞可恩马路 4D-68163

(72) 发明人 比特曼·霍尔格 阿诺德·马克

诺伊曼·托马斯 奥特·英奇

施密特·克里斯汀娜

塞库拉·雷纳特

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司

31220

代理人 郑立 刘万磊

(51) Int. Cl.

C07K 1/22(2006.01)

B01D 15/38(2006.01)

C07D 317/66(2006.01)

权利要求书3页 说明书68页

(54) 发明名称

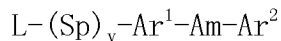
用于抗体和Fc-融合蛋白亲和色谱 IV 纯化的配体

(57) 摘要

本发明涉及一种配体取代的基质在抗体或抗体片段亲和纯化中的应用,所述配体取代的基质包括一种支撑材料和至少一种与所述支撑材料共价键合的配体,所述配体由结构式 (I) 表示 L-(Sp)_v-Ar¹-Am-Ar² (I) 其中 L 是支撑材料上配体附连的连接点;Sp 是间隔基团;v 为 0 或 1;Am 是酰胺基 -NR¹-C(O)-, 其中要么 NR¹与 Ar¹附连且 -C(O)- 与 Ar²附连,要么 -C(O)- 与 Ar¹附连且 NR¹与 Ar²附连;以及 R¹是氢或 C₁-C₄烷基,更优选为氢或甲基;最优选为氢;Ar¹是一个通过化学键与 Sp 或 L 相连的 5-、6- 或 7- 元单核芳香环或部分饱和芳香环,且其还可选择地 (a) 通过化学键与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连;或 (b) 作为一个多核环体系的一部分,与一个单核或双核芳香环融合;其中 Ar¹通过化学键直接与 Am 相连,所述化学键存在于构成 Ar¹的所述 5-、6- 或 7- 元芳香环上,或通过化学键间接相连,所述化学键要么存在于与 Ar¹附连的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上,要么存在于与 Ar¹融合的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上;且其中 Ar¹要么没有被进一步取代,要么附连至至少一个取代基上,所述取代基选自 C₁-C₄烷基、C₃和 C₄环烷基、C₂-C₄链

烯基、C₂-C₄炔基、卤素、C₁-C₄卤代烷基、羟基取代的 C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基、羟基取代的 C₁-C₄烷氧基、卤代 C₁-C₄烷氧基、C₁-C₄烷氨基、C₁-C₄烷硫基、-NO₂、= O、= S、= NH、-OH 以及它们的组合;Ar²是一个未被取代的 5- 或 6- 元单核芳香环,或通过化学键附连至至少一个取代基上,所述取代基选自 C₁-C₆烷基、C₃-C₆环烷基、C₂-C₆链烯基、C₅和 C₆环烯基、C₂-C₆炔基、卤素、C₁-C₆卤代烷基、羟基取代的 C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基取代的 C₁-C₆烷氧基、卤代 C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷氨基、C₁-C₆烷硫基、氨甲酰基、C₁-C₄亚烷二氧基(优选为亚甲二氧基和亚乙二氧基)、-OH、-SH、5- 或 6- 元单核芳香环以及它们的组合;且其中 Ar²除了可通过化学键连接到上述取代基上,还可选择地作为多核环体系的一部分,与一个 5- 或 6- 元单核芳香环融合。

1. 一种配体取代的基质在抗体或抗体片段的亲和纯化中的应用,所述配体取代的基质包括一种支撑材料和至少一种与所述支撑材料共价键合的配体,所述配体由结构式 (I) 表示



(I)

其中

L 是支撑材料上配体附连的连接点;

Sp 是间隔基团;

v 为 0 或 1;

Am 是酰胺基 $-\text{NR}^1-\text{C}(\text{O})-$, 其中要么 NR^1 与 Ar^1 附连且 $-\text{C}(\text{O})-$ 与 Ar^2 附连, 要么 $-\text{C}(\text{O})-$ 与 Ar^1 附连且 NR^1 与 Ar^2 附连; 以及

R^1 是氢或 C_1-C_4 烷基, 更优选地为氢或甲基; 最优选为氢;

Ar^1 是一个通过化学键与 Sp 或 L 相连的 5-、6- 或 7- 元单核芳香环或部分饱和芳香环, 且其还可选择地

(a) 通过化学键与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连; 或

(b) 作为一个多核环体系的一部分, 与一个单核或双核的芳香环融合

其中 Ar^1 通过化学键直接与 Am 相连, 所述化学键存在于构成 Ar^1 的所述 5-、6- 或 7- 元芳香环或部分饱和芳香环上, 或通过化学键间接相连, 所述化学键要么存在于与 Ar^1 附连的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上, 要么存在于与 Ar^1 融合的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上;

且其中 Ar^1 要么没有被进一步被取代, 要么附连至至少一个取代基上, 所述取代基选自 C_1-C_4 烷基、 C_3 和 C_4 环烷基、 C_2-C_4 烯基、 C_2-C_4 炔基、卤素、 C_1-C_4 卤代烷基、羟基取代的 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_4 烷氧基、羟基取代的 C_1-C_4 烷氧基、卤代 C_1-C_4 烷氧基、 C_1-C_4 烷氨基、 C_1-C_4 烷硫基、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NH}$ 、 $-\text{OH}$ 以及它们的组合;

Ar^2 一个是未被取代的 5- 或 6- 元单核芳香环, 或通过化学键附连至至少一个取代基上, 所述取代基选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_6 环烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_5 和 C_6 环烯基、 C_2-C_6 炔基、卤素、 C_1-C_6 卤代烷基、羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基取代的 C_1-C_6 烷氧基、卤代 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷氨基、 C_1-C_6 烷硫基、氨甲酰基、 C_1-C_4 亚烷二氧基, 优选为亚甲二氧基和亚乙二氧基、 $-\text{OH}$ 、 SH 、5- 或 6- 元单核芳香环以及它们的组合; 且其中 Ar^2 除了可通过化学键附连至上述取代基上, 还可选择地作为一个多核环体系的一部分, 与一个 5- 或 6- 元单核芳香环融合。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其中

Ar^1 是一个 5- 或 6- 元单核芳香环或含有 1、2 或 3 个 N 原子或苯的部分饱和芳香环, 其中所述单核环或苯通过化学键与 Sp 或 L 相连, 另外可选地

(a) 通过化学键与苯或噻吩附连; 或

(b) 作为一个多核环体系的一部分, 与苯或噻吩融合;

其中 Ar^1 通过化学键直接与 Am 相连, 所述化学键存在于构成 Ar^1 的所述芳香环或苯上, 或间接通过化学键连接, 所述化学键要么存在于与 Ar^1 附连的的苯环或噻吩环上, 要么存在于与 Ar^1 融合的苯环或噻吩环上;

且其中 Ar^1 要么没有被进一步被取代, 要么附连至至少一个取代基上, 所述取代基选

自：甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 以及它们的组合；

Ar^2 是一个未被取代的 5- 元单核芳香环，或通过化学键附连至至少一个取代基上，所述取代基选自：甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、叔丁基、异丁基、仲丁基、氟、氯、氨基甲酰基、乙硫基、甲硫基、5- 或 6- 元单核芳香环以及它们的组合；且其中 Ar^2 除了可通过化学键附连至上述取代基上，还可选择地作为一个多核环体系的一部分，与苯或噻唑融合。

3. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中

R^1 是氢或甲基；最优选地为氢

Ar^1 是一个 5- 或 6- 元单核芳香环或部分饱和芳香环，选自：咪唑、苯、吡啶、2, 3- 二氢-1H-咪唑和三唑，其通过化学键与 Sp 或 L 相连，且另外可选地

(a) 通过化学键与苯附连；或

(b) 作为一个多核环体系的一部分，与苯融合

其中 Ar^1 通过化学键直接与 Am 相连，所述化学键存在于所述构成 Ar^1 的 5- 或 6- 元芳香环或部分饱和芳香环上，或间接通过化学键相连，所述化学键要么存在于与 Ar^1 附连的苯环上，要么存在于与 Ar^1 融合的苯环上；

且其中 Ar^1 要么没有被进一步取代，要么附连至至少一个取代基上，所述取代基选自：甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 以及它们的组合；

Ar^2 是一个 5- 元单核芳香环，其含有至少一个原子选自于 N 、 S 、 O ，优选为 N 、 S ，它是未被取代的或其通过化学键附连至至少一个取代基上，所述取代基选自：甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、叔丁基、异丁基、仲丁基、氟、氯、氨基甲酰基、乙硫基、甲硫基、优选为甲基、乙基、甲氧基、乙硫基和环丙基、5- 或 6- 元单核芳香环以及它们的组合；且其中 Ar^2 除了可通过化学键附连至上述取代基上，还可选择地作为一个多核环体系的一部分，与苯或噻唑融合。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的应用，其中

Ar^1 选自苯并咪唑、2, 3- 二氢苯并咪唑、吡啶和 4- 三唑基苯；

其中 Ar^1 通过化学键与 Sp 或 L 相连，并附连在苯并咪唑的 1- 或 2- 位、2, 3- 二氢苯并咪唑的 1- 位、吡啶的 2- 位或 4- 三唑基苯的三唑基部分的 1- 位；

其中 Ar^1 通过化学键与 Am 相连，并附连在苯并咪唑的 5- 或 6- 位、2, 3- 二氢苯并咪唑的 5- 或 6- 位、吡啶的 5- 位或 4- 三唑基苯的苯部分的 4- 位；

且其中 Ar^1 要么没有被进一步被取代，要么附连至至少一个取代基上，所述取代基选自：甲基、乙基、甲氧基、 $=\text{S}$ 和 $=\text{O}$ 以及它们的组合；

Ar^2 是一个 5- 元单核芳香环，选自：1, 2, 4- 噻二唑、1, 3, 4- 噻二唑和噻唑；它是未被取代的，或通过化学键附连至至少一个取代基上，所述取代基选自：甲基、乙基、甲氧基、乙硫基和环丙基，选自吡啶、呋喃、异恶唑、恶唑、异噻唑、噻唑的一个 5- 或 6- 元单核芳香环，以及它们的组合。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的应用，其中所述支撑材料包括一种材料选自于：碳水化合物或交联的碳水化合物，优选为琼脂糖、纤维素、葡聚糖、淀粉、藻酸盐和角叉菜

胶、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶；合成聚合物，优选为聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯基苯共聚物、聚丙烯酸酯，PEG-聚丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚酰胺和全氟化碳；无机材料，优选为玻璃，二氧化硅和金属氧化物；及复合材料。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的应用，其中所述蛋白是一种抗体，优选为一种 IgG 型抗体或一种 Fc 融合蛋白。

7. 如权利要求 6 所述的应用，其中纯化是通过将配体取代的基质上的配体与所述抗体的 Fc 片段或域或所述融合蛋白结合来实现的。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的应用，其中所述 Fc 片段或域或所述抗体属于 IgG 抗体类别，更优选为属于人的 IgG 或属于人源多克隆或单克隆 IgG，尤其属于 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

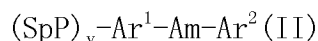
9. 如权利要求 1 至 5 中任一项所定义的一种配体取代的基质。

10. 一种合成权利要求 9 所述配体取代的基质的方法，其中一种如权利要求 1 至 7 中任一项所详细描述符合结构式 (I) 的配体与所述支撑材料附连。

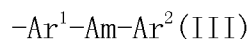
11. 一种蛋白亲和纯化的方法，优选为亲和色谱法，其中需纯化的蛋白与权利要求 1 至 5 中任一项所定义的配体取代的基质相接触。

12. 如权利要求 11 所述方法，其中所述蛋白质是一种抗体或一种 Fc 融合蛋白，且所述配体与抗体的 Fc 区域或 Fc 融合蛋白结合。

13. 一种如结构式 (II) 所示的配体，其中 Ar¹、Ar² 和 Am 具有在权利要求 1 至 4 中所定义的含义，且 SpP 是一种间隔前驱体，



14. 一种具有结构式 (III) 所述结构元素的配体，其中 Ar¹、Ar² 和 Am 具有在权利要求 1 至 4 中所定义的含义



15. 一种如权利要求 13 或 14 所述的配体，其中所述配体与蛋白结合，优选与抗体结合。

16. 如权利要求 13 至 15 中任一项所述配体在抗体或抗体片段的亲和纯化中的应用，优选为在所述配体与适当的基质附连以后。

17. 一种如权利要求 9 所述的配体取代的基质，其中所述基质进一步包括至少一种与所述配体结合的蛋白，优选为一种抗体或一种抗体片段。

用于抗体和 Fc- 融合蛋白亲和色谱 IV 纯化的配体

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白分离领域,尤其涉及通过亲和分离技术对含有免疫球蛋白 Fc 区段的单克隆和多克隆抗体及融合蛋白的提纯,特别是利用小分子配体的色谱。

背景技术

[0002] 免疫球蛋白是在人类和其他脊椎动物体液内发现的一类可溶性蛋白。它们也称作“抗体”,并在细胞识别、结合和粘着的过程中发挥关键作用。抗体是低聚物的糖蛋白,其通过识别和消灭抗原而在免疫系统中扮演着重要角色,抗原一般是指细菌和病毒。

[0003] 抗体聚合链的构造包括所谓的重链和轻链。基本的免疫球蛋白单元含有通过二硫键连接的两条相同的重链和两条相同的轻链。重链有五种类型(α , γ , δ , ϵ , μ),它们决定了免疫球蛋白的类型。轻链组包括两种亚型, λ 和 κ 。

[0004] IgG 是在血液和其它体液内发现的可溶性抗体。它们由 B 细胞衍生的浆细胞构成,以对细菌或其它病原体作出反应并压制它。IgG 是一种分子量约为 150kDa 的 Y 形糖蛋白,包括两个重链和两个轻链。每个链都区别于一个恒定区和一个可变区。重链的两个羧基末端域形成 Fc 片段(“恒定片段”),重链和轻链的氨基末端域识别抗原,并被称为 Fab 片段(“抗原结合片段”)。

[0005] 抗体的 Fc 片段和蛋白或蛋白域结合形成 Fc 融合蛋白,为一个给定药物的标靶提供特异性。例如域抗体-Fc 融合蛋白,其中 Fc 片段的两个重链只与特定抗体的重链(VH)可变区或轻链(VL)可变区中的一个相连。其它 Fc 融合蛋白是 Fc 片段与任意类型的治疗性蛋白或蛋白域的结合。Fc 部分可增加蛋白药物的稳定性和传递性。

[0006] 治疗性抗体和 Fc 融合蛋白用于治疗各种疾病,突出性的例子包括风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化症和多种形式的癌症。治疗性抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。单克隆抗体是由一种单一的抗体产生的细胞系,显示出针对一种单一抗原的相同的特异性。癌症的可能治疗方法包括可压制肿瘤细胞特异性抗原的抗体。贝伐单抗(Avastin, Genentech 公司)是一种单克隆抗体,其可压制血管内皮生长因子(VEGF),从而防止新血管生长至肿瘤组织内。

[0007] 治疗性融合蛋白,如依那西普(Enbrel, Amgen 公司,与 Fc 片段连接的 TNF-受体域)或阿法赛特(Amevive, Biogen Idec 公司,与人 IgG1 的 Fc 部分连接的 LFA-3)被利用或开发作为抵抗自身免疫性疾病的药物。

[0008] 蛋白的生物分离是指从各种生物的原料流中恢复和纯化蛋白产品,它是食品、制药和生物技术工业中的重要操作单元。越来越多的治疗性单克隆抗体($M_a b_s$)和融合蛋白正在进入市场,或处于临床开发中。这种蛋白需要特别高的纯度,并由复杂的多步骤纯化实现。下游加工和提纯构成约 50%至 80%的制造成本,因此,开发新的或改进现有的提纯策略(1)仍需相当大的努力。

[0009] 亲和色谱是一种最有效的用于纯化蛋白的方法。它基于蛋白与配体相互作用的高度特异性。配体与固定相共价结合,而固定相用于从原料溶液中捕获靶蛋白。亲和配体能

够高特异性和选择性地结合它们的标靶,从而从复杂混合物中获取多达千倍的富集产率。

[0010] 通常,大多数单克隆抗体和 Fc 融合蛋白的纯化方案的第一步是蛋白 A 的亲亲和色谱。蛋白 A 是暴露于细菌金黄色葡萄球菌的表面上的,与细胞壁相关的蛋白。其以纳摩尔级的亲和力与不同物种的免疫球蛋白的恒定部分 (Fc 域) 结合,尤其是人的 IgG₁、IgG₂ 和 IgG₄ (2) 亚型。然而,蛋白 A 的应用受到会渗入产物和在应用于以适当的程序进行消毒和清洁的苛刻条件下稳定性差的限制。蛋白 A 的化学稳定性可以通过利用基因工程蛋白 A 的变体的单克隆抗体纯化加以改善。然而,蛋白 A 树脂的高成本致使需要寻找合适的替代品,特别是小分子替代品。

[0011] Mabsorbent A2P (Prometic Biosciences 公司) 是一种用于纯化免疫球蛋白的小分子配体。但是该配体没有适当的选择性 (3),不能应用在色谱处理中。

[0012] 另一种方法是将混合模式色谱作为抗体纯化的基本捕捉步骤。最常用的材料基于固定的 2-巯基乙基吡啶 (MEP HyperCel, Pall 公司),其可有效地从发酵肉汤中捕捉 IgG,但与蛋白 A 相比具有较低的宿主细胞蛋白 (HCP) 清除率。(4)

[0013] 合成的小分子亲和配体是在纯化治疗性蛋白中特别令人感兴趣的,因为它们普遍具有较高的化学稳定性和较低的生产成本。合成的亲和配体更加容易获得,比基于蛋白的配体尤为便宜,其在严格条件下更坚固,并具有可与蛋白 A 相媲美甚至高于蛋白 A 的选择性,可能为抗体和 Fc 融合蛋白的纯化提供合适的方案。取决于靶蛋白,这种亲和配体最好是可提供与蛋白 A 相同的广泛适用性的,能识别 IgG 型免疫球蛋白和 Fc 融合蛋白的恒定 Fc 区。

[0014] 本发明要解决的问题是提供一种与抗体和 Fc 融合蛋白的 Fc 区相结合的小分子亲和配体 (化合物)。优选地,小分子配体本身必须可与基质结合。本发明进一步的问题是,提供一种基质,包括与抗体和 Fc 融合蛋白的 Fc 区相结合的小分子亲和配体。

[0015] 该问题由下述本发明实施例解决。

发明内容

[0016] 本发明涉及一种配体取代的基质在蛋白的亲亲和纯化中,特别是抗体或抗体片段的亲和纯化中的应用,所述配体取代的基质包括一种支撑材料和至少一种与支撑材料共价键合的配体,本发明的配体取代的基质,或者说,本发明的配体由结构式 (I) 表示

[0017] $L-(Sp)_v-Ar^1-Am-Ar^2$

[0018] (I)

[0019] 其中

[0020] L 是支撑材料上配体附连的连接点;

[0021] Sp 是间隔基团;

[0022] v 为 0 或 1;

[0023] Am 是酰胺基 $-NR^1-C(O)-$, 其中要么 NR^1 与 Ar^1 附连且 $-C(O)-$ 与 Ar^2 附连,要么 $-C(O)-$ 与 Ar^1 附连且 NR^1 与 Ar^2 附连;以及

[0024] R^1 是氢或 C_1-C_4 烷基,更优选为氢或甲基;最优选为氢;

[0025] Ar^1 是一个通过化学键与 Sp 或 L 相连的 5-、6- 或 7- 元单核芳香环或部分饱和芳香环,且其还可选择地

[0026] (a) 通过化学键与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连 ; 或

[0027] (b) 作为一个多核环体系的一部分, 与一个单核或双核芳香环融合 ;

[0028] 其中 Ar^1 通过化学键直接与 Am 相连, 所述化学键存在于构成 Ar^1 的所述 5-、6- 或 7- 元芳香环上, 或通过化学键间接相连, 所述化学键要么存在于与 Ar^1 附连的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上, 要么存在于与 Ar^1 融合的进一步的 5- 或 6- 元芳香环上 ;

[0029] 且其中 Ar^1 要么没有被进一步被取代, 要么附连至至少一个取代基上, 所述取代基选自 C_1 - C_4 烷基、 C_3 和 C_4 环烷基、 C_2 - C_4 烯基、 C_2 - C_4 炔基、卤素、 C_1 - C_4 卤代烷基、羟基取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、羟基取代的 C_1 - C_4 烷氧基、卤代 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷基氨基、 C_1 - C_4 烷硫基、 $-NO_2$ 、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NH$ 、 $-OH$ 以及它们的组合 ;

[0030] Ar^2 是一个未被取代的 5- 或 6- 元单核芳香环, 或通过化学键附连至至少一个取代基上, 所述取代基选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_6 环烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_5 和 C_6 环烯基、 C_2 - C_6 炔基、卤素、 C_1 - C_6 卤代烷基、羟基取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、羟基取代的 C_1 - C_6 烷氧基、卤代 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷基氨基、 C_1 - C_6 烷硫基、氨甲酰基、 C_1 - C_4 亚烷二氧基 (优选为亚甲二氧基和亚乙二氧基)、 $-OH$ 、 $-SH$ 、5- 或 6- 元单核芳香环以及它们的组合 ; 且其中 Ar^2 除了可通过化学键附连至上述取代基上, 还可选择地作为一个多核环体系的一部分与一个 5- 或 6- 元单核芳香环融合。

[0031] 结构式 (I) 代表本发明的配体或本发明的配体取代的基质。如果 L 被认作是本发明的支撑材料 / 基质的一部分, 那么结构式 (I) 代表配体取代的基质。如果 L 不被认作是本发明的支撑材料 / 基质的一部分, 那么结构式 (I) 代表附连到基质后的配体。本发明上下文中, 结构式 (I) 优选代表附连到基质后的配体。在此解释下, 本发明的配体在附连至支撑材料 / 基质之前, 最好由结构式 (II) 表示, 见下文。

[0032] 在本发明的一个实施例中, 符合结构式 (I) 的本发明的配体 (附连到支撑材料 / 基质后), 或者换一种说法, 本发明的配体取代的支撑材料 / 基质具备结构式 (Ia) 的结构。本发明的一个进一步的实施例中, 符合结构式 (I) 的本发明的配体 (附连到支撑材料 / 基质后), 或者换一种说法, 本发明的配体取代的基质具备结构式 (Ib) 中的结构。在结构式 (Ia) 或结构式 (Ib) 中, L、Sp、N、 R^1 、 Ar^1 和 Ar^2 以及整数 v 都具有与结构式 (I) 有关的上文所定义的含义。

[0033] $L-(Sp)_v-Ar^1-N(R^1)-C(O)-Ar^2$ (Ia)

[0034] $L-(Sp)_v-Ar^1-C(O)-N(R^1)-Ar^2$ (Ib)

[0035] 本发明所述配体与人源多克隆和单克隆 IgG 结合, 尤其是人 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄ 和来自不同动物种类的多克隆和单克隆 IgG, 如兔子和老鼠的免疫球蛋白。

[0036] 由于 L 是支撑材料 / 基质上的适当的实体, 配体取代的基质也可由 (Ic) 描述, 其中 M 是基质 / 支撑材料, 以及具有与结构式 (I) 相关的所列含义的其它变体。

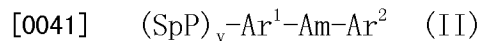
[0037] $M-L-(Sp)_v-Ar^1-Am-Ar^2$ (Ic)

[0038] 本发明还涉及所述配体取代的基质和在连接点 L 与基质附连前后的所述配体 (其也可称作为 “化合物”), 该附连也可以是通过一个间隔基团 Sp 的。所述基质包括支撑材料, 即基质完全由支撑材料构成, 或支撑材料形成基质的一部分, 这种情况的基质还包括除了支撑材料以外的组分。

[0039] 本发明还包含在上下文中所详细描述配体取代的基质, 其中的基质进一步包括

至少一种与配体结合的蛋白,优选为一种抗体或一种抗体的一个片段。所述抗体或抗体片段优选为一种 IgG 型抗体或一中 Fc 融合蛋白。在一个进一步的优选实施例中,所述配体结合至所述抗体或融合蛋白的一个 Fc 片段或域。在一个进一步的优选实施例中,所述 Fc 片段或域或所述抗体属于 IgG 抗体类别,更优选为属于人的 IgG 或属于人源多克隆或单克隆 IgG,尤其属于 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

[0040] 本发明因此包括一种配体或化合物,其中所述化合物与一种蛋白结合,优选为一种抗体或一种抗体的片段,所述配体或化合物在与支撑材料 / 基质附连之前,具有结构式:



[0042] 其中 L、v、Ar¹、Am 和 Ar² 具有后文所定义的与结构式 (I) 相关的含义,且其中 SpP 是如下所述的间隔前驱体。本发明进一步涉及所述配体在对一种抗体或一种抗体的一个片段进行亲和纯化中的应用,优选为本申请中所详细描述的对配体附连到适当的基质之后的应用。

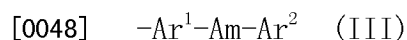
[0043] 如果结构式 (I) 中 v 是 0,那么配体是或将会是直接 L 键合的。在其它实施例中,配体是或将会是通过一个间隔基团 Sp 与支撑材料键合。这种情况适用于当结构式 (I) 中的 v 不为 0 时。

[0044] 上述结构式 (I) 中 L 是连接点,也称作“附连点”。本领域技术人员是清楚适当的连接点 / 附连点的位置的。

[0045] 可以理解,所述连接点 L 要么是直接与所述配体 / 化合物相连,要么是通过一个间隔相连。L 是支撑材料上的一个适当的实体,它凭借其自身将本发明的配体与支撑材料连接起来。本领域技术人员知道何为适当的实体。通常 L 是或可以是实体的一部分,它产生于支撑材料上的一个适当的官能团与配体的前驱体化合物上的一个相应官能团形成与基质结合的配体的反应。本发明的一个实施例中,所述配体的前驱体化合物(其与支撑材料反应生成配体取代的基质)包括一个间隔前驱体。“间隔前驱体”与化学实体有关,该化学实体形成所述间隔在形成配体取代的基质后保留的那一部分,且其含有适当的官能团(前驱体基团),所述官能团通过与支撑材料上适当的官能团反应形成连接点 L,见下文。如果配体的前驱体化合物不含有一个间隔前驱体(并将直接通过化学键与支撑材料相连),所述适当的官能团(前驱体基团)就自己与配体附连。

[0046] 在一个优选实施例中,L 直接通过化学键,优选为单键,与结构式 (I) 中的配体相连。由于 L 是支撑材料上的一个实体,结合的配体从而通过 L 与支撑材料相连。本文中,术语“支撑材料”是指本领域技术人员所知并是在市场上可获得的聚合物,这也使得它们有助于实现本发明的目的。

[0047] 本发明所述配体包括结构单元



[0049] 其中结构式 (III) 中 Ar¹、Am 和 Ar² 所具有的含义和优选含义,将在下文中定义,或在说明书和实施例有关结构式 (I) 和 (II) 的其它部分中定义。结构式 (III) 中描述的结构单元出现在附连到支撑材料 / 基质之后和之前的配体中。

[0050] 结构式 (I) 和 / 或结构式 (II),或包含结构单元的结构式 (III) 中所描述的配体与蛋白结合,所述蛋白优选为抗体,优选为 IgG 型抗体和 Fc 融合蛋白,尤其是抗体或融合蛋白的 Fc 片段或域,其中最优选为所述 Fc 片段或域或抗体属于 IgG 抗体类别,更优选为属于

人的 IgG, 或属于人源多克隆或单克隆 IgG, 特别是属于 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

[0051] 在一个优选实施例中, 上述定义的配体在附连到基质 / 支撑材料上之后和之前与上述定义的蛋白结合。

[0052] 在一个进一步的实施例中, 本申请涉及一种配体在蛋白亲和纯化中的应用, 所述蛋白优选为一种抗体或抗体片段, 所述配体的结构如本发明结构式 (I) (包括结构式 (Ia)、(Ib) 和 (Ic)), 和 / 或结构式 (II) 所描述, 和 / 或包含结构式 (III) 所描述的结构单元, 其中 L、Sp、SpP、Am、Ar¹、Ar²、R¹ 和 / 或 v 具有的含义同关于结构式 (I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(II) 和 / 或 (III) 的定义, 和 / 或本说明书和实施例, 特别是优选实施例中的定义。在本实施例中, 所述蛋白、抗体或抗体片段优选为具有结构式 (I)、(II) 和 / 或 (III) 中预设的性质。在本实施例中, 所述配体可以附连在基质上, 也可以不附连在基质上, 优选地, 本实施例中的配体附连在基质上。

[0053] 本发明上下文中的“键”最好是共价化学键, 如单键、双键或三键, 优选为单键。

[0054] 在一个优选实施例中, L 是一个官能团或化学实体, 其要么在本发明的配体与支撑材料 / 基质附连之前存在于支撑材料上, 要么在本发明的配体附连于支撑材料 / 基质的过程中的化学反应中形成 (“新的官能团”)。

[0055] 一般情况下, 支撑材料包括供分子附连的官能团, 所述分子优选为本发明的配体。在本发明的文本中, 所述官能团被认为是支撑材料的一部分, 这也适用于本发明的配体与支撑材料通过键相连的情况 (即 L 通过键直接与配体相连, 不存在间隔基团 Sp, 见下文), 且其中所述键直接形成于本发明所述的各个配体和所述支撑材料上供分子附连的官能团之间, 或在所述官能团变形为键 (优选为单键) 时, 直接形成于本发明所述的各个配体和所述支撑材料本体之间。

[0056] 如果键直接形成于本发明所述的各配体和所述与支撑材料上分子附连的官能团之间, 所述官能团可相互转化成新官能团, 其随后附连在支撑材料上。本发明上下文中, 该新官能团被认为是支撑材料 / 基质的一部分, 并形成 L, 通过键连接所述配体和所述基质, 所述键优选为单键。

[0057] 支撑材料和本发明配体上适当的官能团 (或“前驱体基团”, 即出现在本发明的配体附连之前) 之间相互独立并允许配体与支撑材料之间的直接连接, 所述官能团包括但不限于: -OH、-SH、NH₂、>NH、甲磺酸酯、三氟甲基磺酸酯、芳基磺酸酯、羧酸、磺酸、磷酸、亚磷酸、环氧化物、N- 羟基琥珀酰亚胺羧酸酯、1- 羟基苯并三唑基羧酸酯、1- 羟基-7- 氮杂苯并三唑基羧酸酯、氟、氯、溴、碘、马来酰亚胺、丙烯酸酯、丙烯酰胺、醛、酮、肼、酰肼、O- 烷基羟胺、异氰酸酯、异硫氰酸酯、氰酸酯、硫氰酸酯、乙烯砜。

[0058] 存在于支撑材料上的官能团可以根据配体的连接而相互转化的官能团 (“新官能团”) 包括但不限于: 碳-碳单键、碳-氮单键、芳基烷基醚、芳基烷基硫醚、二芳基醚、二芳基硫醚、芳基烷基胺、芳基二烷基胺、酰胺、酰肼、磺酰胺、磺酸酰肼、N- 芳氧基酰胺、N- 芳氧基磺酰胺、磷酸酯、磷酸胺、磷酸肼、N- 芳氧基磷酰胺、脘、脞、脲、硫脲、异脲、亚氨碳酸酯、异硫脲、亚氨硫代碳酸酯。

[0059] 在本发明的一个进一步的实施例中, L 与间隔基团 -Sp- 相连。本实施例中, L 是一个键或化学单元, 源于支撑材料上适当的官能团与间隔基团上适当的官能团 (或“前驱体基团”) 之间的反应。因此, 支撑材料上的官能团与间隔基团 Sp 上的官能团 (或“互补基团

“）之间的化学反应，使得本发明的配体通过连接点 L 与支撑材料相连。

[0060] 所述间隔基团 Sp 优选碳氢化合物基团，其含有 C、H 和进一步的原子。本领域技术人员所知的适当的进一步原子包括 O、S、N、P、Si。所述碳氢化合物基团可以是直链的、支链的或环状的。以下对间隔基团 Sp 进行详细的描述。Sp 通过单键、双键或三键与本发明配体的 Ar¹ 相连，优选为单键。此外，Sp 与一个官能团（前驱体基团）相连，由此本发明的配体可以与存在于基质上的官能团（前驱体官能团）在形成新官能团（也称作“最终官能团”、最终化学实体或连接单元）的化学反应中共价连接。这种可能存在于支撑材料上和 Sp 上的官能团（前驱体基团）可以是相互独立的，其实例包括但不限于：-OH、-SH、NH₂、>NH、甲磺酸酯、三氟甲基磺酸酯、芳基磺酸酯、羧酸、磺酸、磷酸、亚磷酰胺、环氧化物、N- 羟基琥珀酰亚胺羧酸酯、1- 羟基苯并三唑基羧酸酯、1- 羟基-7- 氮杂苯并三唑基羧酸酯、氟、氯、溴、碘、马来酰亚胺、丙烯酸酯、丙烯酰胺、醛、酮、肼、酰肼、O- 烷基羟胺、异氰酸酯、异硫氰酸酯、氰酸酯、硫氰酸酯、乙烯砜。由支撑材料上的官能团与间隔 Sp 上的官能团反应衍生出的适当的连接单元的实例包括但不限于：碳-碳单键、醚、芳基烷基醚、芳基烷基硫醚、二芳基醚、硫醚、二芳基硫醚、二烷基胺、三烷基胺、芳基烷基胺、芳基二烷基胺、酰胺、酯、酰肼、磺酰胺、磺酰肼、N- 芳氧基酰胺、N- 芳氧基磺酰胺、磷酸酯、磷酰胺、磷酰肼、N- 芳氧基磷酰胺、脞、脞、脞、硫脞、异脞、亚氨碳酸酯、异硫脞、亚氨硫代碳酸酯。

[0061] 如前文所述，间隔基团 Sp 通常用于连接结构式 (I) 中配体的 Ar¹ 和官能团（前驱体基团），所述官能团可以与支撑材料上的官能团（前驱体基团）发生化学反应，形成最终官能团（连接单元）。通常，Sp 也可以是含有环状亚单元的直链或支链碳氢化合物。该碳氢化合物可以是饱和的或不饱和的，即它可含有双键或三键。如果 Sp 是直链碳氢化合物，它可以将一个配体部分和支撑材料上的一个前驱体基团连接起来，相反，如果 Sp 是支链碳氢化合物，它可以多个配体部分和支撑材料上的一个前驱体基团连接起来。除了 C 和 H，所述碳氢化合物还可以含有其他原子如 N、O、P 和 S，优选 N 和 O。碳链可以被其他原子或原子团打断。Sp 可以包括打断碳链的不同原子或原子团的组合。打断碳氢化合物碳链的原子或原子团的实例为 -O-、>N-、-C(=O)N(H)-、-C(=O)N<、-O-P(=O)(-O-)₂。可以理解的是，如果所述碳氢化合物是被一个三价原子或原子团，如 -N<(叔胺基)、-C(=O)-N<(叔酰胺)，或 -O(P=O(-O-))₂(磷酸酯) 打断的，所述原子团可作为连接多个 Sp 的配体连接的亚单元和携带官能团的 Sp 的亚单元的支链点，所述官能团与支撑材料上的官能团发生化学反应，并最终形成如前所述的连接单元。额外的合适的原子团可向 Sp 中引入支链点，所述原子团包括天然或非天然的三官能团氨基酸，如谷氨酸、天冬氨酸、氨基丙二酸、赖氨酸、鸟氨酸和二氨基丙酸。在这些情况下，所述三价部分的官能团中的一个可以作为与支撑材料上的官能团发生化学反应的官能团。通常 Sp 的总长度低于 100 个原子，优选低于 50 个原子，更优选低于 30 个原子。如果 Sp 是支链的，其长度定义为连接 Sp 与官能团的原子（所述官能团是与支撑材料上的官能团发生化学反应的官能团）与直接连接至一个 Ar¹ 部分的最远的原子之间的距离，其长度低于 100 个原子，优选低于 50 个原子，更优选低于 40 个原子。

[0062] 与碳基官能团 (FG)（如羧酸、醛、环氧化物、羧酸活性酯）（所述官能团是与支撑材料上的官能团发生化学反应的官能团）相连的直链 Sp 的适当的实体的例子包括但不限于：

[0063] FG-(CH₂)_n-（亚烷基）其中 1 ≤ n ≤ 100，优选 1 ≤ n ≤ 50，更优选 1 ≤ n ≤ 30；

[0064] $\text{FG}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ (亚烷氧基), 其中 $1 \leq n \leq 99$, 优选 $1 \leq n \leq 49$, 更优选 $1 \leq n \leq 29$;

[0065] $\text{FG}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})-$ (亚烷基氨基), 其中 $1 \leq n \leq 99$, 优选 $1 \leq n \leq 49$, 更优选 $1 \leq n \leq 29$;

[0066] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ (低聚乙二醇), 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0067] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ (低聚乙二醇基氧), 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0068] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})-$ (低聚乙二醇基氨基, 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0069] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇);

[0070] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇基氧);

[0071] $\text{FG}-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇基氨基)。

[0072] 附连至一个非碳基官能团 (FG) (如 NH_2 、OH、SH、氯、溴、碘、异氰酸酯、异硫氰酸酯) (所述官能团用于与支撑材料上的化学基团发生化学反应) 的直链 Sp 的适当的实体的实例包括但不限于:

[0073] $\text{FG}-(\text{CH}_2)_n-$ (亚烷基) 其中 $1 \leq n \leq 100$, 优选 $1 \leq n \leq 50$, 更优选 $1 \leq n \leq 30$;

[0074] $\text{FG}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ (亚烷氧基), 其中 $1 \leq n \leq 99$, 优选 $1 \leq n \leq 49$, 更优选 $1 \leq n \leq 29$;

[0075] $\text{FG}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})-$ (亚烷基氨基), 其中 $1 \leq n \leq 99$, 优选 $1 \leq n \leq 49$, 更优选 $1 \leq n \leq 29$;

[0076] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ (低聚乙二醇), 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0077] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ (低聚乙二醇基氧), 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0078] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{H})-$ (低聚乙二醇基氨基), 其中 $1 \leq n \leq 30$, 优选 $1 \leq n \leq 15$, 更优选 $1 \leq n \leq 9$;

[0079] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇);

[0080] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{O}-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇基氧);

[0081] $\text{FG}-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})-$ (被酰胺打断的低聚乙二醇基氨基)。

[0082] 支链 Sp 的适当实体的实例含有一个三官能原子团, 其中一个官能团起到与支撑材料上的官能团发生反应的作用, 包括但不限于:

[0083] $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-)(-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-)$ (谷氨酸双(3,5-二氧-1-辛基)酰胺; NH_2 基团用于与支撑材料上官能团发生反应);

[0084] $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ($-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) (谷氨酸双(正丙基)酰胺; NH_2 基团用于与支撑材料上官能团发生反应);

[0085] $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{H})-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$ ($-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2)_2-$) (N, N' -双(3,5-二氧杂辛酰)二氨基丙酸; 羧基团用于与支撑材料上官能团发生反应)。

[0086] 在本发明的一个实施例中, R^1 选自氢, 和 C_1-C_4 烷基, 其中 C_1-C_4 烷基通常为直链或支链烷基, 可以包括一个环烷基单元, 如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、甲基环丙基。

[0087] R^1 优选自氢、乙基和甲基。更优选自氢或甲基。最优选为氢。

[0088] Ar^1 是脂环或杂环的单核芳香环或部分饱和的芳香环, 该环具有 5、6 或 7 元。 Ar^1 通过一个化学键与 Sp 或 L 相连。该化学键可以是单键、双键或三键, 优选为单键。 Ar^1 除了有与 Sp 或 L 相连的化学键以外, 还可以有与取代基相连的键。

[0089] 如果 Ar^1 是一个杂环的芳香环或部分饱和的杂环芳香环, 它含有选自于 N 、 S 和 O 的至少一个杂原子, 优选自 N 和 S , 更优选为一个或多个 N 原子。在所有这些实施例中, Ar^1 优选为一个 5 元或 6 元环。

[0090] 如果 Ar^1 不通过化学键与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环相连, 或不与一个进一步的单核或双核芳香环体系融合, 那么 Ar^1 优选为一个 6 元脂环芳香环 (如苯) 或一个具有 N 原子的 6 元杂环 (例如吡啶、嘧啶、哒嗪)。在本实施例中, Ar^1 优选为苯环或吡啶, 吡啶是更优选的。

[0091] 在一个实施例中, Ar^1 通过化学键与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连。 Ar^1 与进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环的连接键可以是单键或双键, 优选为单键。所述进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环可以是脂环的或杂环的, 即它含有一个或多个选自 N 、 O 和 S 的杂原子。

[0092] 如果 Ar^1 通过化学键与一个 5- 或 6- 元单核芳香环附连, 那么 Ar^1 优选为噻唑、恶唑、异噻唑、异恶唑、三唑, 其中三唑和噻唑是更优选的。与 Ar^1 相连的 5- 或 6- 元环优选为苯或吡啶。所述吡啶或苯环可以是未被取代的或被至少一个实体取代的, 所述实体选自: $-\text{OH}$ 、甲基、乙基、乙氧基、单氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、甲氧基、单氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基。 Ar^1 与 5- 或 6- 元单核芳香环附连的单元优选为: 4- 三唑基苯、5- 三唑基苯、2- 噻唑基苯、4- 噻唑基苯、5- 噻唑基苯、2- 恶唑基苯、4- 恶唑基苯、5- 恶唑基苯、3- 异噻唑基苯、4- 异噻唑基苯、5- 异噻唑基苯、3- 异恶唑基苯、4- 异恶唑基苯、5- 异恶唑基苯、3- 异噻唑基苯、4- 异噻唑基苯、5- 异噻唑基苯。 Ar^1 与 5- 或 6- 元单核芳香环附连的进一步优选单元为: 三唑基吡啶、噻唑基吡啶、恶唑基吡啶、异恶唑基吡啶、异噻唑基吡啶, 其中吡啶单元可以与 Ar^1 的不同位置连接, 且吡啶的 N 原子可以位于不同的位置。 Ar^1 与 5- 或 6- 元单核芳香环附连的更优选单元为: 4- 三唑基苯、4- 噻唑基苯、2-(4- 噻唑基) 吡啶和 3-(4- 噻唑基) 吡啶, 其中 4- 三唑基苯是最优选的。

[0093] 本申请中, 术语“部分饱和芳香环”是指 5、6- 或 7- 元芳香环, 其中的一个或多个双键被单键所取代。可以理解的是, 该环不是全部饱和的, 即存在两个 sp^2 原子。部分饱和环体系中的一个或多个原子可以被 $=\text{O}$ 取代。

[0094] 在另一个实施例中, Ar^1 作为一个多核芳香环体系或部分饱和芳香环体系的一部

分与一个单核或双核芳香环体系融合。一个多核环体系是指一个双核或三核体系,优选为一个双核体系。

[0095] 本申请中,术语“部分饱和的多核环体系”是指一个 5、6- 或 7- 元芳香环与另一个单核或多核芳香环融合,且其中有一个或多个双键被单键所取代。可以理解的是,该环不是全部饱和的,即仍然有至少两个 sp^2 原子。由于与所述环融合的芳香环体系是不饱和的,至少 Ar^1 的部分饱和环的那些原子,其也是附加环体系的一部分,是 sp^2 原子。部分饱和环体系中一个或多个原子可以被 = O 取代。

[0096] 如果 Ar^1 与一个进一步的单核或双核芳香环体系融合,那么 Ar^1 优选为咪唑、三唑、恶唑、噻唑、异恶唑、异噻唑、吡唑、吡咯、咪唑啉、恶唑啉、四氢吡嗪或四氢 [1H]-1,4- 氧氮杂卓,其中更优选为咪唑、咪唑啉和吡唑,最优选为咪唑和咪唑啉。所述进一步的芳香环体系优选为单核。所述进一步的芳香环体系优选为苯、噻吩、吡啶、嘧啶、哒嗪、呋喃、噻唑或恶唑,其中更优选为苯、噻吩和吡啶,最优选苯。优选的、更优选的和最优选的进一步芳香环体系可以是未被取代的或被至少一个实体取代,所述实体选自 -OH、甲基、乙基、乙氧基、单氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、甲氧基、单氟甲氧基、二氟甲氧基、三氟甲氧基。由 Ar^1 与一个进一步的芳香环体系融合而形成的单元是双核或三核环体系,优选为双核环体系。

[0097] 优选的单元是苯并咪唑、2- 甲基苯并咪唑、2- 乙基苯并咪唑、2- 甲氧基苯并咪唑、苯并三唑、2,3- 二氢-[1H] 苯并咪唑-2 酮、吲唑、1,2,3,4- 四氢喹恶啉-2-3- 酮、2,3,4,5- 四氢苯并 [f] [1,4] 氧氮杂卓-5- 酮、苯并噻唑和苯并恶唑,其中更优选为苯并咪唑、2- 甲基苯并咪唑、2- 乙基苯并咪唑、2- 甲氧基苯并咪唑和 2,3- 二氢-[1H] 苯并咪唑-2- 酮,最优选苯并咪唑和 2- 甲基苯并咪唑。

[0098] Ar^1 通过化学键直接与 Am 相连,所述化学键存在于构成 Ar^1 的所述 5-、6- 或 7- 元芳香环或部分饱和芳香环之上,或 Ar^1 间接通过化学键与 Am 相连,所述化学键存在于与 Ar^1 附连的进一步的 5- 或 6- 元芳香环或与 Ar^1 融合的进一步的芳香环上。 Ar^1 和 Am 的直接连接可以发生在前述所有 3 个可选项中,即当 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连时,或当 Ar^1 作为一个多核环体系的一部分与一个进一步的 5- 或 6- 元环融合时,或当以上两种情况都没发生时。

[0099] 在本发明的一个进一步的实施例中, Ar^1 未被进一步取代。术语“未被进一步取代”是指,除了连到 Sp 或 L 上的化学键及可选地存在于 Ar^1 上的一个或多个化学键(这些键选自于连至 Am 的可选键、连至进一步的 5- 或 6- 元芳香环的键以及将 Ar^1 与芳香环融合的键)以外,只有氢原子存在于 Ar^1 上,上述指定的键种类除外。

[0100] 在另一个实施例中, Ar^1 与至少一个如下详细描述取代基附连。所述至少一个取代基可以存在于前述的所有可选项中,即当 Ar^1 与 Am 直接相连时,或当 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元单核芳香环附连时,或当 Ar^1 作为一个多核环体系的一部分与一个 5- 或 6- 元芳香环融合时,或当以上各种情况都没发生时(这种情况下 Ar^1 必须与 Am 直接相连)。

[0101] 所述至少一个取代基选自: C_1 - C_4 烷基、 C_3 和 C_4 环烷基、 C_2 - C_4 链烯基、 C_2 - C_4 炔基、卤素、 C_1 - C_4 卤代烷基、羟基取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、羟基取代的 C_1 - C_4 烷氧基、卤素取代的 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 烷基氨基、 C_1 - C_4 烷硫基、-NO₂、= O、= S、= NH、OH 及它们的组合。

[0102] C_1 - C_4 烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基。 C_1 - C_4 烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧

基。C₃ 和 C₄ 环烷基是环丙基、环丁基和甲基环丙基。C₁-C₄ 卤代烷基包括：氟-、二氟-和三氟甲基，以及被一个或多个氟取代的乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基；氯-、二氯-和三氯甲基，以及被一个或多个氯取代的乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基。卤素取代的 C₁-C₄ 烷氧基包括：氟-、二氟-和三氟甲氧基，以及被一个或多个氟取代的乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基；氯-、二氯-和三氯甲基，以及被一个或多个氯取代的乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基。

[0103] 优选的取代基是：甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、-NO₂、=O，其中最优选为甲基、乙基、甲氧基和=O。

[0104] Ar¹ 与至少一个取代基连接的键可以是单键或双键。

[0105] Ar¹ 或来源于进一步的 5- 或 6- 元芳香环与 Ar¹ 附连而产生的单元或来源于将进一步的 5- 或 6- 元芳香环与 Ar¹ 融合而产生的单元与 Sp 或 L 以及 Am 附连。

[0106] 取决于 Am 的取向，其与 Ar¹ 或源于一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环与 Ar¹ 的附连或融合而产生的单元之间的附连可以通过 Am 上的 C=O 基团或 Am 上的 NR¹ 基团来实现。未与进一步的 5- 或 6- 元芳香环附连或融合的 Ar¹ 的适当实体包括但不限于：苯、噁吩、吡啶、嘧啶、吡嗪或哒嗪。

[0107] 在一个优选的实施例中，Ar¹ 是苯。在本实施例中，Am 上的 NR¹ 基团或 C=O 基团和 Sp 或 L 之间可以彼此定向为邻位、间位或对位，优选为间位或对位，更优选为对位。在另一个实施例中，Ar¹ 是吡啶。在本实施例中，所述 Am 上的 NR¹ 基团或 C=O 基团和 Sp 或 L 之间可以彼此定向为邻位、间位或对位，优选为间位或对位，更优选对位，同时吡啶的 N 原子可以位于不同的位置。

[0108] 由于 Ar¹ 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环附连而产生的适当的实体的例子包括但不限于：4-三唑基苯，5-三唑基苯，2-噁唑基苯，4-噁唑基苯，5-噁唑基苯，2-恶唑基苯，4-恶唑基苯，5-恶唑基苯，3-异噁唑基苯，4-异噁唑基苯，5-异噁唑基苯，3-异恶唑基苯，4-异恶唑基苯，5-异恶唑基苯，3-异噻唑基苯，4-异噻唑基苯，5-异噻唑基苯。在这些情况下，Am 的 NR¹ 基团或 C=O 基团通常附连至苯部分，并可能位于相对于 Ar¹ 的 5- 元芳香环的邻位、间位或对位，优选为间位或对位，而 Sp 或 L 则通常通过 Ar¹ 的一个环原子与 Ar¹ 的 5- 元芳香环附连，其不与与苯部分附连的环原子相邻。

[0109] 由于 Ar¹ 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环附连而产生的适当的实体的进一步的例子包括但不限于：三唑基吡啶，噁唑基吡啶，恶唑基吡啶，异恶唑基吡啶，异噻唑基吡啶，其中吡啶单元可以附连在 Ar¹ 的不同位置上，且吡啶的 N 原子可以位于不同的位置。在这些情况下，Am 的 NR¹ 基团或 C=O 基团通常附连至吡啶部分，并可能位于相对于 Ar¹ 上 5- 元芳香环的邻位、间位或对位，优选为间位或对位，而 Sp 或 L 则通常通过 Ar¹ 的一个环原子与 Ar¹ 的 5- 元芳香环附连，其不与与吡啶部分附连的环原子相邻。

[0110] 由于 Ar¹ 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的适当的单元的例子包括但不限于：苯并咪唑、苯并三唑、2,3-二氢-[1H] 苯并咪唑、吡唑、1,2,3,4-四氢喹啉、2,3,4,5-四氢苯并[f][1,4] 氧氮杂卓、苯并噻唑、苯并恶唑，其中更优选为苯并咪唑和 2,3-二氢-[1H] 苯并咪唑，最优选为苯并咪唑。

[0111] 如果由于 Ar¹ 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是苯并咪唑，那

么 L 或 Sp 通常附连在 1- 或 2- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 5- 或 6- 位, 优选为 5- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是苯并三唑, 那么 L 或 Sp 通常附连在 1- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 5- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是 2, 3- 二氢-[1H] 苯并咪唑, 那么 L 或 Sp 通常附连在 1- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 5- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是呋唑, 那么 L 或 Sp 通常附连在 1- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 3- 或 5- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是四氢喹啉, 那么 L 或 Sp 通常附连在 1- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 6- 或 7- 位, 优选 6- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是 2, 3, 4, 5- 四氢苯并 [f] [1, 4] 氧氮杂, 那么 L 或 Sp 通常附连在 4- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 7- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是苯并噻唑, 那么 L 或 Sp 通常附连在 2- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 5- 或 6- 位。如果由于 Ar^1 与一个进一步的 5- 或 6- 元芳香环融合而产生的单元是苯并恶唑, 那么 L 或 Sp 通常附连在 2- 位, 而 Am 的 NR^1 基团或 $\text{C}=\text{O}$ 基团则通常附连在 5- 或 6- 位。

[0112] Ar^2 是一个 5 或 6 元脂环或杂环的单核芳香环。 Ar^2 通过化学键与 Am 相连。在一个实施例中, Ar^2 与 Am 的 N 原子相连; 在另一个实施例中, Ar^2 与 Am 的 C 原子相连。优选地, Ar^2 与 Am 的 N 原子相连。除了连至 Am 的化学键, Ar^2 可以附连至至少一个进一步的化学实体上, 即至少一个取代基或作为一个多核环体系的一部分与一个 5- 或 6- 元单核芳香环融合。

[0113] 如果 Ar^2 是杂环芳香环, 它含有至少一个来自于 N、S 和 O 的杂原子, 优选为 N 和 S, 更优选为至少一个 N 原子和至少一个 S 原子, 最优选为两个 N 原子和一个 S 原子。在所有这些实施例中, Ar^2 优选为一个 5- 或 6- 元环, 更优选为一个 5- 元环。

[0114] 如果 Ar^2 没有与一个进一步的单核或双核芳香环体系融合, 在一个实施例中, Ar^2 是一个 6- 元脂环芳香环 (如苯) 或是一个具有至少一个 N 原子的 6- 元杂环 (如吡啶、嘧啶、哒嗪、吡嗪或三嗪)。在本实施例中, Ar^2 优选为苯、吡啶、吡嗪、哒嗪或嘧啶, 其中更优选为苯和哒嗪。在另一个实施例中, Ar^2 是一个具有至少一个来自于 N、S 和 O 的杂原子的 5 元杂环, 其中优选为 N 和 S。适当的 Ar^2 的例子包括但不限于: 恶唑、异恶唑、噻唑、异噻唑、1, 2, 4- 恶二唑、1, 2, 4- 噻二唑、1, 3, 4- 恶二唑、1, 3, 4- 噻二唑、吡咯、吡唑、咪唑、噻吩、呋喃。优选的 Ar^2 的例子为噻唑、1, 2, 4- 噻二唑和 1, 3, 4- 噻二唑, 其中最优选为 1, 2, 4- 噻二唑和 1, 3, 4- 噻二唑。

[0115] 在另一个实施例中, Ar^2 作为一个多核环体系的一部分与一个单核或双核芳香环体系融合。一个多核环体系是指一个双核或三核环体系, 优选为一个双核环体系。

[0116] 如果 Ar^2 与一个进一步的单核或双核芳香环体系融合, 那么 Ar^2 优选为 1H- 吡唑、噻唑、恶唑或咪唑。如果 Ar^2 是 1H- 吡唑, 那么第二芳香环体系通过 4- 和 5- 位与 Ar^2 融合, 而 Am 附连在 3- 位。如果 Ar^2 是噻唑, 那么第二芳香环体系通过 4- 和 5- 位与 Ar^2 融合, 而 Am 附连在 2- 位。如果 Ar^2 是恶唑, 那么第二芳香环体系通过 4- 和 5- 位与 Ar^2 融合, 而 Am 附连在 2- 位。如果 Ar^2 是咪唑, 那么第二芳香环体系通过 1- 和 2- 位与 Ar^2 融合, 而 Am 附连在 4- 位。或者, 所述第二芳香环体系通过 4- 和 5- 位与 Ar^2 融合, 而 Am 附连在 2- 位。进一步

的芳香环体系优选为单核。所述进一步的芳香环体系优选为苯、噻吩、吡啶、呋喃、噻唑、恶唑或咪唑,更优选为苯或噻唑。如果所述进一步的芳香环体系是噻唑,那么它是通过 2- 和 3- 位与 Ar^2 融合的。由于 Ar^2 与至一个进一步的芳香环体系融合而形成的单元优选为苯并恶唑 (Am 附连在 2- 位上), 苯并噻唑 (Am 附连在 2- 位上)、吡唑 (Am 附连在 3- 位上) 或咪唑并 [2, 1-b] 噻唑 (Am 附连在 6- 位上)。

[0117] 如果 Ar^2 是恶唑或噻唑,那么它可以通过 4- 和 5- 位与环戊烯融合,而不是与一个第二芳香环体系融合。所产生的单元,也即优选单元,是 5, 6- 二氢 -4H- 环戊并恶唑 (Am 附连在 2- 位上) 和 5, 6- 二氢 -4H- 环戊并噻唑 (Am 附连在 2- 位上),其中更优选为 5, 6- 二氢 -4H- 环戊并噻唑。

[0118] 在本发明进一步的实施例中, Ar^2 未被进一步取代。术语“未被进一步取代”是指除了与 Am 相连的化学键及可选的将 Ar^2 与芳香环融合而存在的键以外,只有氢原子存在于 Ar^2 上,上述指定的键种类除外。

[0119] 在另一个实施例中, Ar^2 与下述至少一个取代基附连。所述至少一个取代基可存在于前述的所有两个任意选项中,即当 Ar^2 作为一个多核环体系的一部分而与至一个进一步的 5- 或 6- 元环融合时,或当 Ar^2 未与一个进一步的环融合时。 Ar^2 连至至少一个取代基的键可以是单键或双键,优选为单键。

[0120] Ar^2 可通过化学键与至少一个取代基附连,所述取代基选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_6 环烷基、 C_2-C_6 链烯基、 C_5 和 C_6 环烯基、 C_2-C_6 炔基、卤素、 C_1-C_6 卤代烷基、羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基取代的 C_1-C_6 烷氧基、卤素取代的 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷氨基、 C_1-C_6 烷硫基、-OH、SH、氨基甲酰基、 C_1-C_4 亚烷基二氧基、一个 5- 或 6- 元单核芳香环及它们的组合,且其中 Ar^2 除了可通过化学键附连至上述取代基上,还可选择地作为一个多核环体系的一部分与一个 5- 或 6- 元单核芳香环融合。

[0121] C_1-C_6 烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基和己基。 C_1-C_6 烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。 C_3-C_6 环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、甲基环丙基、二甲基环丙基、三甲基环丙基、乙基环丙基、丙基环丙基、甲基乙基环丙基、甲基环丁基、二甲基环丁基、乙基环丁基、和甲基环戊基。 C_1-C_6 卤代烷基包括:氟 -、二氟 - 和三氟甲基,以及被一个或多个氟取代的乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、丙基和己基;氯 -、二氯 - 和三氯甲基,以及被一个或多个氯取代的乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、丙基和己基。卤素取代的 C_1-C_4 烷氧基包括:氟 -、二氟 - 和三氟甲氧基,以及被一个或多个氟取代的乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基;氯 -、二氯 - 和三氯甲基,以及被一个或多个氯取代的乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基。 C_1-C_4 亚烷基二氧基包括亚甲二氧基、亚乙二氧基、亚丙二氧基、亚丁二氧基,优选为亚甲二氧基和亚乙二氧基。

[0122] 优选的取代基是甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、叔丁基、异丁基、仲丁基、氟、氯、氨基甲酰基、乙硫基、甲硫基,其中最优选为甲基、乙基、氨基甲酰基、甲氧基、乙硫基和环丙基。

[0123] 在一个实施例中, Ar^2 通过化学键附连的取代基是一个 5- 或 6- 元单核芳香环。 Ar^2 与 5- 或 6- 元芳香环结合的键可以是单键或双键,优选为单键。进一步的 5- 或 6- 元单核

芳香环可以是脂环或杂环,即它可以含有一个或多个选自于 N、O 和 S 的杂原子。

[0124] 如果 Ar² 通过化学键附连至一个 5- 或 6- 元单核芳香环,那么 Ar² 优选为恶唑、异恶唑、咪唑、吡唑、吡咯、噻唑、异噻唑、1, 2, 4- 噻二唑、1, 3, 4- 噻二唑、吡啶、哒嗪或嘧啶,更优选为吡唑、噻唑、异噻唑、1, 2, 4- 噻二唑、1, 3, 4- 噻二唑或哒嗪,最优选为吡唑、噻唑、1, 2, 4- 噻二唑或 1, 3, 4- 噻二唑。如果 Ar² 是恶唑,那么 Am 附连至 2- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 4- 或 5- 位。或者,Am 附连至 4- 或 5- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 2- 位。如果 Ar² 是异恶唑,那么 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。或者,Am 附连至 5- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 3- 位。如果 Ar² 是咪唑,那么 Am 附连至 2- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 4- 位。或者,Am 附连至 4- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 2- 位。如果 Ar² 是吡唑,那么 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。或者,Am 附连至 3- 或 4- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 1- 位。如果 Ar² 是吡咯,那么 Am 附连至 2- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 4- 位。或者,Am 附连至 4- 位置,而所述进一步的单核芳香环附连至 2- 位。又或者 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 1- 位。如果 Ar² 是噻唑,那么 Am 附连至 2- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 4- 或 5- 位。或者,Am 附连至 4- 或 5- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 2- 位。如果 Ar² 是异噻唑,那么 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。或者,Am 附连至 5- 位置,而所述进一步的单核芳香环附连至 3- 位。如果 Ar² 是 1, 2, 4- 噻二唑,那么 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。或者,Am 附连至 5- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 3- 位。如果 Ar² 是 1, 3, 4- 噻二唑,Am 附连至 2- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。如果 Ar² 是吡啶,那么 Am 和所述进一步的单核芳香环彼此位于间位或对位,优选为对位,而吡啶核的 N 原子可以位于不同的位置。如果 Ar² 是哒嗪,那么 Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 6- 位。或者,Am 附连至 5- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 3- 位。又或者,Am 附连至 3- 位,而所述进一步的单核芳香环附连至 5- 位。如果 Ar² 是嘧啶,那么 Am 和所述进一步的单核芳香环彼此位于间位或对位,优选为对位,而嘧啶核的 N 原子可以位于不同的位置。

[0125] 所述与 Ar² 附连的进一步的 5- 或 6- 元芳香环优选为苯、呋喃、噻吩、恶唑、异恶唑、噻唑、异噻唑或吡啶。更优选为呋喃、恶唑、异恶唑或吡啶,其中最优选为呋喃。如果所述进一步的单核芳香环是呋喃,那么其通过 2- 或 3- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是噻吩,那么其通过 2- 或 3- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是恶唑,那么其通过 2-、4- 或 5- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是异恶唑,那么其通过 3-、4- 或 5- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是噻唑,那么其通过 2-、4- 或 5- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是异噻唑,那么其通过 3-、4- 或 5- 位与 Ar² 附连。如果所述进一步的单核芳香环是吡啶,那么其通过 2-、3- 或 4- 位与 Ar² 附连。

[0126] Ar² 与 5- 或 6- 元单核芳香环附连的优选单元是 1- 苯基吡唑 (通过 3- 位与 Am 附连)、2- (2- 呋喃基) 吡唑 (通过 5- 位与 Am 附连)、4- 苯基噻唑 (通过 2- 位与 Am 附连)、5- 苯基噻唑 (通过 2- 位与 Am 附连)、2- (2- 呋喃基) -1, 3, 4- 噻二唑 (通过 5- 位与 Am 附连)、2- (3- 呋喃基) -1, 3, 4- 噻二唑 (通过 5- 位与 Am 附连)、2- (2- 吡啶基) -1, 3, 4- 噻二唑 (通过 5- 位与 Am 附连)、2- (3- 吡啶基) -1, 3, 4- 噻二唑 (通过 5- 位与 Am 附连)、2- (4- 吡

啶基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、3-(2-呋喃基)-1, 2, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、4-(2-呋喃基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、5-(2-呋喃基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、2-苯基-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、3-苯基-1, 2, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、4-(2-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(3-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(4-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、5-(2-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、5-(3-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、5-(4-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、3-(2-呋喃基)哒嗪(通过 6-位与 Am 附连)、2-(5-异恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、2-(5-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、2-(2-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)。

[0127] Ar^2 与 5-或 6-元单核芳香环附连的更优选单元是 2-(2-呋喃基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、2-(3-呋喃基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、3-(2-呋喃基)-1, 2, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、4-(2-呋喃基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、5-(2-呋喃基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(2-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(3-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(4-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、3-(2-呋喃基)哒嗪(通过 6-位与 Am 附连)、2-(5-异恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、2-(5-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、2-(2-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)。 Ar^2 与 5-或 6-元单核芳香环附连的最优选单元是 2-(2-呋喃基)-1, 3, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、3-(2-呋喃基)-1, 2, 4-噻二唑(通过 5-位与 Am 附连)、4-(2-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(3-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)、4-(4-吡啶基)噻唑(通过 2-位与 Am 附连)。

[0128] Ar^2 与 5-或 6-元单核芳香环附连形成的单元,除了与 Am 附连以外,还可以与一个或多个取代基附连,所述取代基选自:甲基、乙基、甲氧基、亚甲二氧基(在这种情况下,该取代基连接至 Ar^2 与 5-或 6-元单核芳香环附连形成的单元的两个原子上)、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、二氟甲氧基、三氟甲氧基、-F、-Cl、-Br。优选的取代基是甲基和亚甲二氧基。

[0129] Ar^2 要么与 C=O 基团附连(见结构式 Ia) 要么与 NR^1 基团附连(见结构式 Ib)。

[0130] 前述对结构式 (I) 中关于变量 L、 Sp 、 Ar^1 、Am、 R^1 和 Ar^2 的不同意义的所有定义参见本发明的实施例,包括每个变量的一般实施例、优选实施例、更优选实施例、极优选实施例,对于一个变量的一般、优选、更优选或极优选实施例不考虑任何一个或其它变量的影响,仅考虑该变量本身。总之,一个变量的一般实施例可以与其它任何变量的优选、更优选、极优选实施例进行组合。

[0131] 接下来将遵循总结构式 (I) 的优选定义。

[0132] 在下述所有的实施例中(即优选的、更优选的、极优选的), R^1 是氢或甲基,最优选为氢。

[0133] 在本发明的一个优选实施例中,结构式 (I) 中的变量的定义如下:

[0134] Ar^1 是一个 5-或 6-元单核芳香环或含有 1,2 或 3 个 N 原子或苯的部分饱和芳香环,其中所述单核环或苯通过化学键与 Sp 或 L 相连,另外可选地

[0135] (a) 通过化学键与苯或噻吩附连;或

[0136] (b) 作为一个多核环体系的一部分,与苯或噻吩融合;

[0137] 其中 Ar¹ 通过化学键直接与 Am 相连,所述化学键存在于构成 Ar¹ 的所述芳香环或苯上,或间接通过化学键相连,所述化学键要么存在于与 Ar¹ 附连的苯环或噻吩环上,要么存在于与 Ar¹ 融合的苯环或噻吩环上;

[0138] 且其中 Ar¹ 要么没有被进一步取代,要么附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、-NO₂、= O、= S 以及它们的组合;和/或

[0139] Ar² 是一个未被取代的 5-元单核芳香环,或通过化学键附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、叔丁基、异丁基、仲丁基、氟、氯、氨基甲酰基、乙硫基、甲硫基、5-或 6-元单核芳香环以及它们的组合;且其中 Ar² 可选地,除了可通过化学键附连至上述取代基上,还可选择地作为一个多核环体系的一部分,与苯或噻唑融合。

[0140] 在本发明的一个极优选的实施例中,结构式 (I) 中的变量具有以下意义:

[0141] Ar¹ 是一个 5-或 6-元单核芳香环或部分饱和芳香环,选自:咪唑、苯、吡、2,3-二氢-1H-咪唑和三唑,其通过化学键与 Sp 或 L 相连,且另外可选地

[0142] (a) 通过化学键与苯附连;或

[0143] (b) 作为一个多核环体系的一部分,与苯融合

[0144] 其中 Ar¹ 通过化学键直接与 Am 相连,所述化学键存在于所述构成 Ar¹ 的 5-或 6-元芳香环或部分饱和芳香环上,或间接通过化学键相接,所述化学键要么存在于与 Ar¹ 附连的苯环上,要么存在于与 Ar¹ 融合的苯环上;

[0145] 且其中 Ar¹ 要么没有被进一步取代,要么附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、-NO₂、= O、= S 以及它们的组合;和/或

[0146] Ar² 是一个 5-元单核芳香环,其含有至少一个原子选自于 N、S、O,优选为 N、S,它是未被取代的或其通过化学键附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、正丙基、异丙基、甲氧基、乙氧基、二氟甲基、三氟甲基、三氟甲氧基、二氟甲氧基、环丙基、羟甲基、叔丁基、异丁基、仲丁基、氟、氯、氨基甲酰基、乙硫基、甲硫基、优选为甲基、乙基、甲氧基、乙硫基和环丙基、5-或 6-元单核芳香环以及它们的组合;且其中 Ar² 除了可通过化学键附连至上述取代基上,还可选择地作为一个多核环体系的一部分,与苯或噻唑融合。

[0147] 在本发明的一个极优选的实施例中,结构式 (I) 中的变量具有如下意义:Ar¹ 选自苯并咪唑、2,3-二氢苯并咪唑、吡啶和 4-三唑基苯;

[0148] 其中 Ar¹ 通过化学键与 Sp 或 L 相连,并附连在苯并咪唑的 1-或 2-位、2,3-二氢苯并咪唑的 1-位、吡啶的 2-位或 4-三唑基苯的三唑基部分的 1-位;

[0149] 其中 Ar¹ 通过化学键与 Am 相连,并附连在苯并咪唑的 5-或 6-位、2,3-二氢苯并咪唑的 5-或 6-位、吡啶的 5-位或 4-三唑基苯的苯部分的 4-位;

[0150] 且其中 Ar¹ 要么没有被进一步取代,要么附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、甲氧基 = S 和 = O 以及它们的组合;和/或

[0151] Ar² 是一个 5-元单核芳香环,选自:1,2,4-噻二唑、1,3,4-噻二唑和噻唑;它是未被取代的,或通过化学键附连至至少一个取代基上,所述取代基选自:甲基、乙基、甲氧基、乙硫基和环丙基,选自吡啶、呋喃、异恶唑、恶唑、异噻唑、噻唑的一个 5-或 6-元单核芳香

环,以及它们的组合。

[0152] 本发明还包括一种配体(与支撑材料附连之后),其与支撑材料一起形成在本发明的方法中所使用的配体取代的基质。所述配体在与基质/支撑材料附连之前符合结构式(II)、(IIa)和(IIb),其中符号 Sp、Ar¹、Ar²和 Am 具有上述的所定义的含义,包括优选含义:

[0153] (SpP)_v-Ar¹-Am-Ar² (II)

[0154] (SpP)_v-Ar¹-N(R¹)-C(O)-Ar² (IIa)

[0155] (SpP)_v-Ar¹-C(O)-N(R¹)-Ar² (IIb)

[0156] 本发明所述配体含有结构单元:

[0157] -Ar¹-Am-Ar² (III)

[0158] 其中 Ar¹、Am 和 Ar² 具有本说明书和实施例全文中与结构式(I)有关的定义所给出的含义。(III)中所描述的结构单元存在于配体与支撑材料/基质附连之前和之后。

[0159] 结构式(I)所描述的和/或结构式(II)所描述的和/或含有结构式(III)中所描述的结构单元的配体与优选为抗体,特别是 IgG 型抗体的蛋白以及 Fc 融合蛋白结合,尤其是结合至所述抗体或所述融合蛋白的 Fc 片段或域,其中最优选为所述 Fc 片段或域或所述抗体属于 IgG 抗体类别,更优选为属于人的 IgG 或属于人源多克隆或单克隆 IgG,尤其属于 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

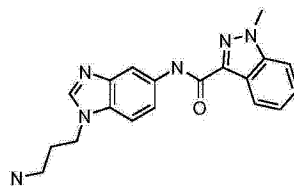
[0160] 在一个优选实施例中,上述配体在与基质/支撑材料附连之前和之后,与上述蛋白结合。

[0161] 结构式(II)、(IIa)和(IIb)中所述配体包括与配体附连的间隔前驱体基团 SpP。

[0162] 结构式(II)、(IIa)和(IIb)中所述配体可作为前驱体用于合成没有间隔基团附连的进一步的化合物。所谓化合物在间隔基团分裂后产生,具体情况可能为,与 SpP 相连的配体的所具有的功能会发生转变,转变为本领域技术人员所知的其它适当的功能。为该目的的适当的反应是本领域技术人员所知的。其所得到的化合物也包括在本发明中。

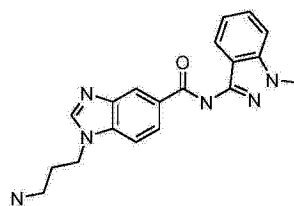
[0163] 本发明的基质的优选配体如下所述,其中在每个结构式中,最左侧的 N 原子与连接点 L 连接(未显示出)。下述所有结构式显示了与配体附连的间隔前驱体基团(SpP):

[0164]



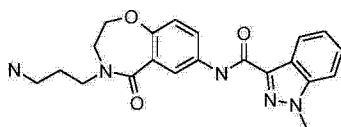
[0165] 1-(3-氨基-1-丙基)-5-[(1-甲基咪唑-3-基)甲酰胺基]苯并咪唑(L01)

[0166]



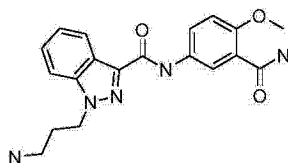
[0167] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(1-甲基-3-咪唑基)酰胺(L02)

[0168]



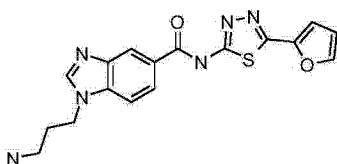
[0169] 4-(3-氨基-1-丙基)-7-[(1-甲基咪唑-3-基)甲酰胺]-2,3,4,5-四氢苯并[f][1,4]氧氮杂卓-5-酮 (L03)

[0170]



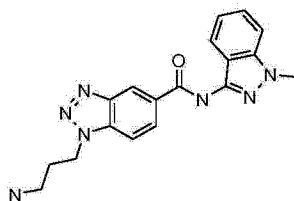
[0171] 1-(3-氨基-1-丙基)-咪唑-3-羧酸 N-(3-氨基甲酰基-4-甲氧基苯基) 酰胺 (L04)

[0172]



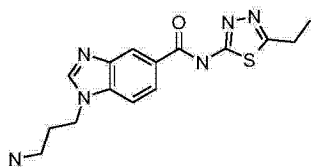
[0173] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L05)

[0174]



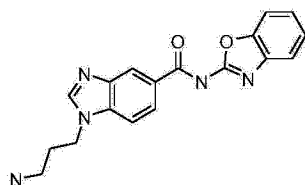
[0175] 1-(3-氨基-1-丙基)-苯并三唑-5-羧酸 N-(1-甲基咪唑-3-基) 酰胺 (L06)

[0176]



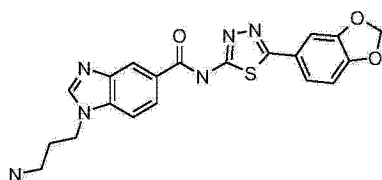
[0177] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-乙基-1,3,4-噻二唑-5-基) 酰胺 (L07)

[0178]



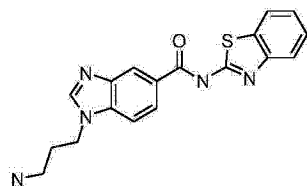
[0179] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(苯并恶唑-2-基) 酰胺 (L08)

[0180]



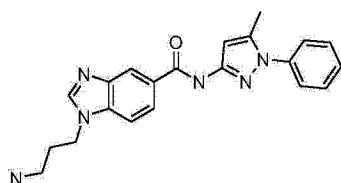
[0181] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[2-(3,4-亚甲二氧苯基)-1,3,4-噻二唑-5-基]酰胺 (L09)

[0182]



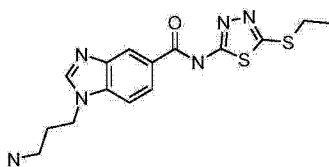
[0183] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(苯并噻唑-2-基)酰胺 (L10)

[0184]



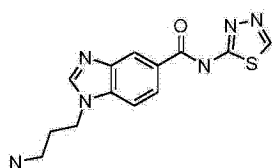
[0185] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5-甲基-1-苯基吡唑-3-基)酰胺 (L11)

[0186]



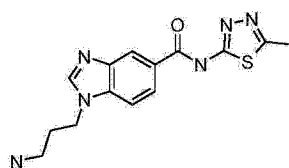
[0187] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-乙硫基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L12)

[0188]



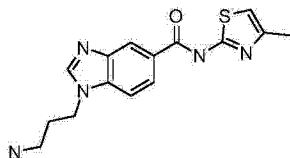
[0189] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L13)

[0190]



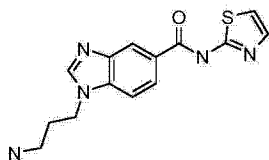
[0191] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-甲基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L14)

[0192]



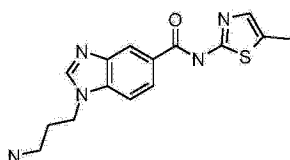
[0193] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(4-甲基噻唑-2-基)酰胺 (L15)

[0194]



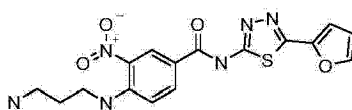
[0195] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(噻唑-2-基)酰胺 (L16)

[0196]



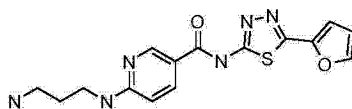
[0197] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5-甲基噻唑-2-基)酰胺 (L17)

[0198]



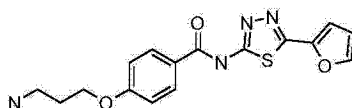
[0199] 4-[(3-氨基-1-丙基)氨基]-3-硝基苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L18)

[0200]



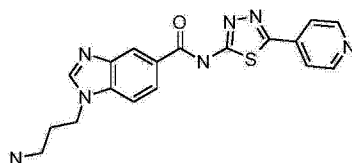
[0201] 6-[(3-氨基-1-丙基)氨基]烟酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L19)

[0202]



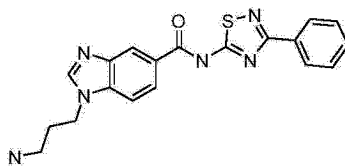
[0203] 4-[(1-氨基-3-丙基)氧基]苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L20)

[0204]



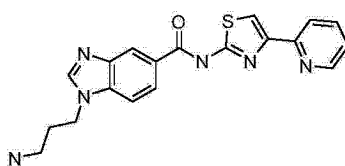
[0205] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(4-吡啶基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L21)

[0206]



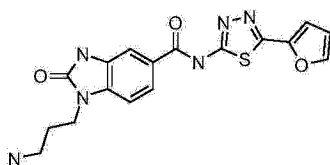
[0207] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(3-苯基-1,2,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L22)

[0208]



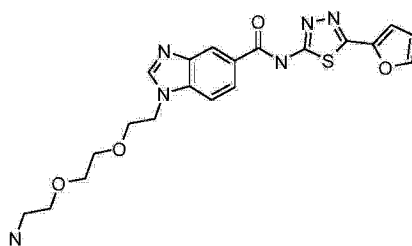
[0209] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L23)

[0210]



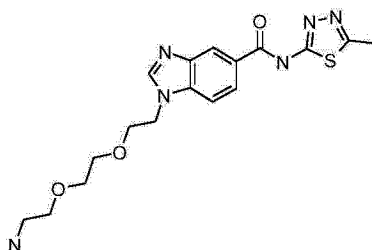
[0211] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸 N-[5(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L24)

[0212]



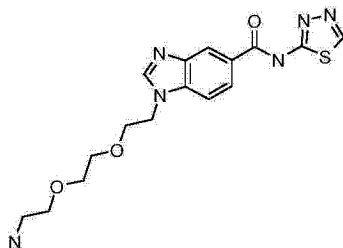
[0213] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L25)

[0214]



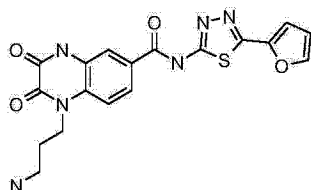
[0215] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5-甲基-1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L26)

[0216]



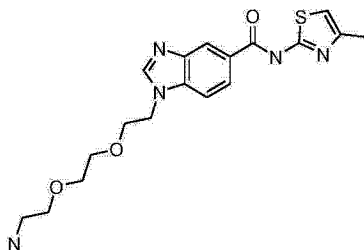
[0217] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸N-(1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L27)

[0218]



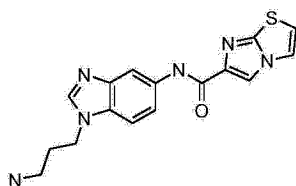
[0219] 1-(3-氨基-1-丙基)-2,3-二氧化-1,2,3,4-四氢喹啉-6-羧酸N-[5(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L28)

[0220]



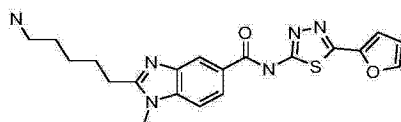
[0221] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸N-(4-甲基噻唑-2-基)酰胺 (L29)

[0222]



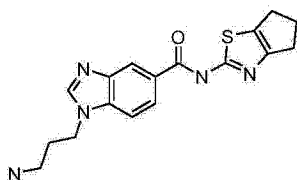
[0223] 1-(3-氨基-1-丙基)-5-[(咪唑并-[2,1-b]噻唑-6-基)甲酰胺]苯并咪唑 (L30)

[0224]



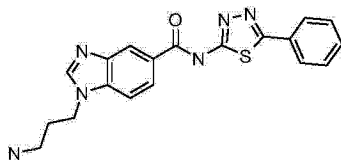
[0225] 2-(5-氨基-1-戊基)-1-甲基苯并咪唑-5-羧酸N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L31)

[0226]



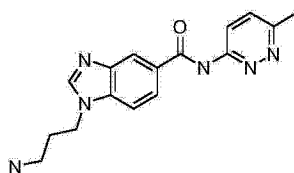
[0227] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5,6-二氢-(4H)-环戊噻唑-2-基)酰胺 (L32)

[0228]



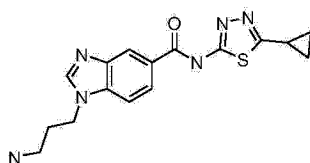
[0229] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-苯基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L33)

[0230]



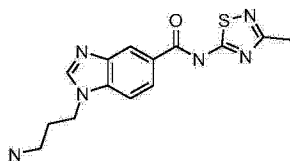
[0231] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(6-甲基吡嗪-3-基)酰胺 (L34)

[0232]



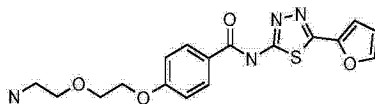
[0233] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-环丙基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L35)

[0234]



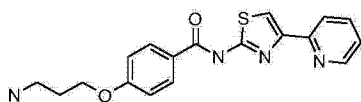
[0235] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(3-甲基-1,2,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L36)

[0236]

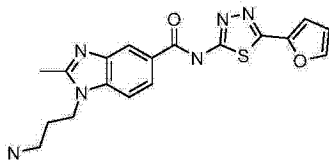


[0237] 4-(5-氨基-3-氧杂-1-戊氧基)苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L37)

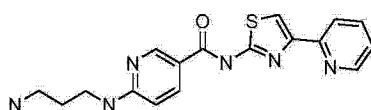
[0238]



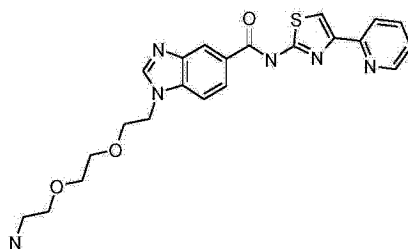
[0239] 4-[(1-氨基-3-丙基)氧基]苯甲酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L38)
[0240]



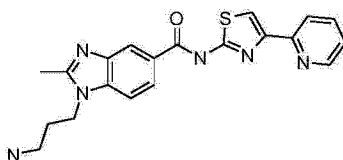
[0241] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L39)
[0242]



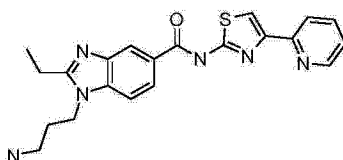
[0243] 6-[(3-氨基-1-丙基)氨基]烟酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L40)
[0244]



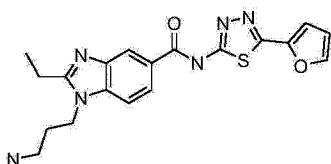
[0245] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L41)
[0246]



[0247] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L42)
[0248]

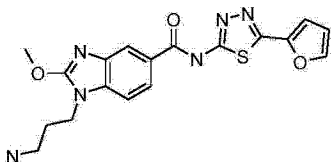


[0249] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L43)
[0250]



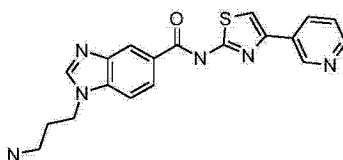
[0251] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L44)

[0252]



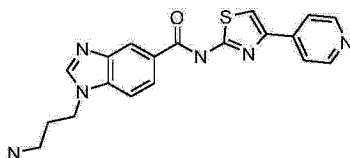
[0253] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲氧基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L45)

[0254]



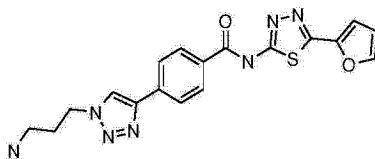
[0255] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(3-吡啶基)噻唑-2-基] 酰胺 (L46)

[0256]



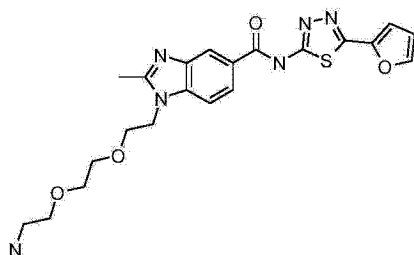
[0257] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基] 酰胺 (L47)

[0258]



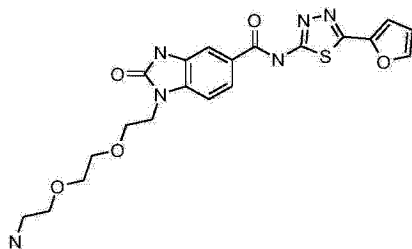
[0259] 6-[1-(3-氨基-1-丙基)-三唑-4-基]苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L48)

[0260]



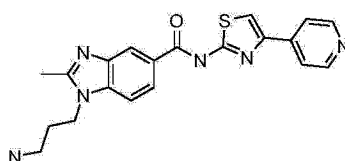
[0261] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L49)

[0262]



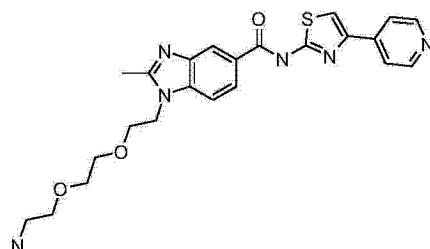
[0263] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L50)

[0264]



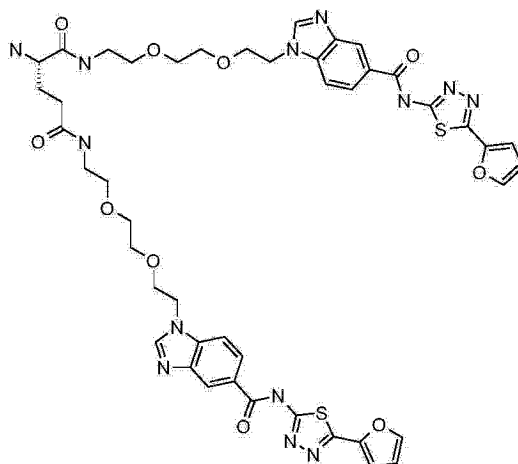
[0265] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L51)

[0266]



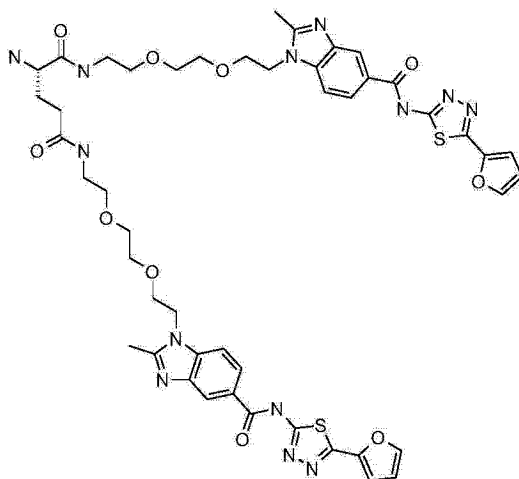
[0267] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L52)

[0268]



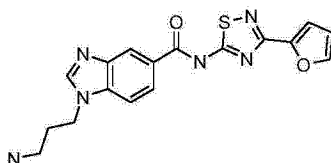
[0269] (S)-谷氨酸 N,N'-双{8-[5-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基氨基甲酰基]苯并咪唑-1-基]-3,5-二氧杂-1-辛基}酰胺 (L53)

[0270]



[0271] (S)-谷氨酸 N,N'-双 {8- {5-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基氨基甲酰基]-2-甲基苯并咪唑-1-基}-3,5-二氧杂-1-辛基} 酰胺 (L54)

[0272]



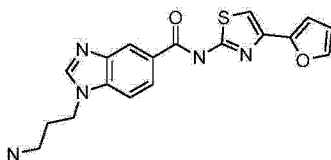
[0273] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑-5-基] 酰胺 (L55)

[0274]



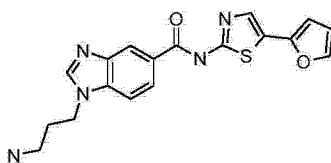
[0275] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L56)

[0276]



[0277] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺 (L57)

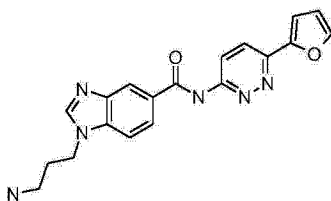
[0278]



[0279] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺

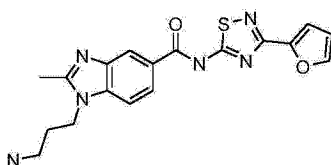
(L58)

[0280]



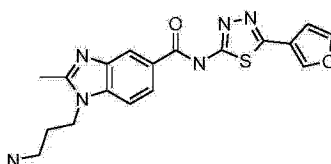
[0281] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基]酰胺 (L59)

[0282]



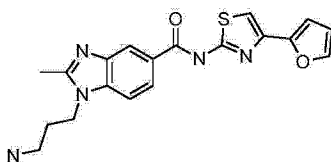
[0283] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑-5-基]酰胺 (L60)

[0284]



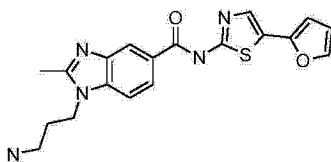
[0285] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L61)

[0286]



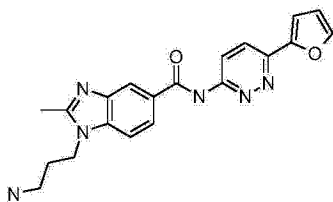
[0287] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噻唑-2-基]酰胺 (L62)

[0288]



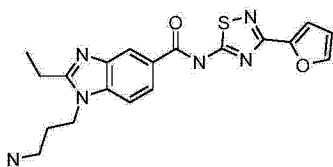
[0289] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基]酰胺 (L63)

[0290]



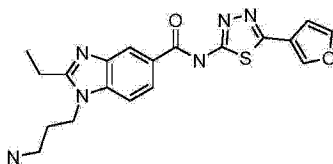
[0291] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基] 酰胺 (L64)

[0292]



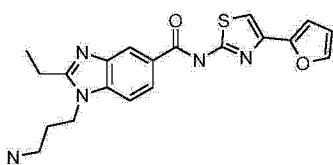
[0293] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑-5-基] 酰胺 (L65)

[0294]



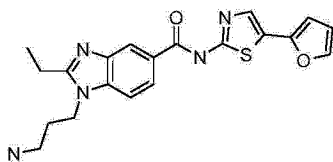
[0295] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L66)

[0296]



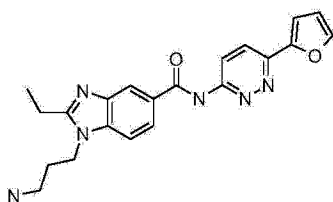
[0297] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺 (L67)

[0298]



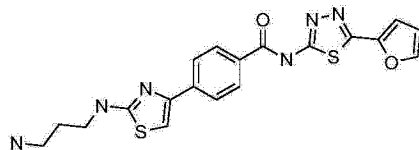
[0299] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺 (L68)

[0300]



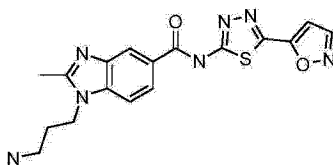
[0301] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基]酰胺 (L69)

[0302]



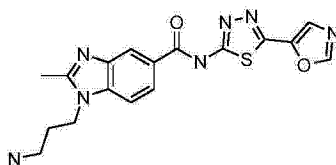
[0303] 4-[2-(3-氨基-1-丙氨基)噻唑-4-基]苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L70)

[0304]



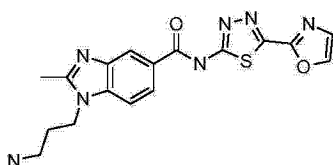
[0305] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(5-异恶唑基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L71)

[0306]



[0307] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(5-恶唑基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L72)

[0308]



[0309] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-恶唑基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L73)

[0310] 例如,所述配体(II)的合成可以在由羧酸组分和胺组分组成的溶液相合成液中进行,并最终形成酰胺 Am。耦合过程可以通过使用本领域技术人员所知的活化剂活化羧酸组分,且随后将活化的羧酸与胺组分反应来完成,必要的话通过反应混合物的常规加热或微波辐射提高温度。在此反应过程中,氨基随后作为附连支撑材料和配体的前驱体基团,需要适当的保护基团的保护,如叔丁氧羰基。两组分成功耦合之后,需在适当的条件下去除保护基团。对于各组分的组合,可以采用本领域技术人员所知的额外的溶液相合成步骤。含有间隔基团的脱保护的配体通过本领域技术人员所知的色谱法提纯。

[0311] 如果一些特别的配体不能采用合适的液相合成步骤,合成可以在不溶性支持物上进行,不溶性支持物也称作树脂,如聚苯乙烯树脂,优选其预加载了合适的间隔基团的,所述间隔基团承载了反应基团(官能团),如羟基,附加的分子可以通过本领域技术人员所知

的反应与其附连。最后,所述配体含有间隔基团,其经过本领域技术人员所知的合适的裂解过程脱离不溶性支持物/树脂,并经本领域技术人员所知的色谱法提纯。

[0312] 术语“抗体”是指一种免疫球蛋白,包括天然的和全部或部分合成的,还包括它们所有的维持特定结合能力的片段和衍生物。典型的片段是 Fc、Fab、重链和轻链。该术语还包括任何具有一个同源或大部分同源的结合域的多肽,如在对比氨基酸序列时,与一种免疫球蛋白的结合域至少有 95% 相同。这些多肽可以是天然的衍生物,或全部或部分合成的。一种抗体可以是单克隆或多克隆的,也可以是人源的或非人源的,或者是一种嵌合蛋白,其中人的 Fc 部分与鼠源的 Fab 片段融合(含有……ximab 末端的治疗性抗体,如利妥昔单抗),或与含有人和鼠的序列的 Fab 片段融合(含有……zumab 末端的治疗性抗体,如贝伐单抗),或与不同的 Fab 片段相连(双特异性抗体)。所述抗体可以是任何免疫球蛋白类别中的一员,优选为 IgG,如果是人类抗体,更优选为 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

[0313] 在本发明最优选实施例中,抗体包括一个 Fc 片段或域,推测本发明的配体会与抗体的 Fc 部分结合。相应地,本发明最优选的抗体是一种含有一个属于免疫球蛋白类别的 Fc 片段或域的抗体,优选为 IgG,更优选为人的 IgG 或人源的多克隆或单克隆的 IgG,特别是 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

[0314] 术语“Fc 融合蛋白”是指一个 Fc 片段与一个或多个蛋白或蛋白域的任意组合。Fc 融合蛋白的实例包括但不限于:含有可溶性受体域的人 IgG₁Fc 域的嵌合体(含有……cept 末端的治疗性蛋白),如依那西普(结合有两个肿瘤坏死因子受体域的人 IgG₁Fc)或利洛纳塞(融合有白介素-1-受体域的人 IgG₁)。所述融合蛋白可以通过任何方法制备。例如,Fc 融合蛋白可以通过耦合 Fc 片段至适当的蛋白或蛋白域的酶法或化学法制得,或者可以通过编码 Fc 和蛋白/蛋白域序列的基因重组制得。另外,所述 Fc 融合蛋白可以全部或部分通过合成来制备。所述 Fc 融合蛋白也可以是一个多分子复合物。功能 Fc 融合蛋白一般包括至少约 50 个氨基酸,更典型的包括至少约 200 个氨基酸。

[0315] 本发明利用结构式 (I) 的亲配体及其说明书中公开的优选实施例,旨在从复杂混合物中亲和提纯出抗体或 Fc 融合蛋白,优选通过亲和色谱,所述复杂混合物例如发酵上清液或人或动物来源的血浆。

[0316] 相应地,在一个优选实施例中,本发明包括一种通过亲和纯化法,优选为亲和色谱,提纯蛋白的方法,所述蛋白优选为免疫球蛋白或 Fc 融合蛋白。本发明所述亲和配体与抗体的 Fc 区结合。

[0317] 贝伐单抗 (Avastin®, Genentech/Roche) 是一种人类单克隆抗体。它通过靶向并抑制蛋白血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 的功能来阻止新血管的形成,从而阻止肿瘤的生长,其中皮生长因子-A (VEGF-A) 可以激发新血管的形成。

[0318] 托珠单抗 (RoActemra®, Genentech/Roche) 是一种人类单克隆抗体。它直接作用于白细胞介素-6 受体,并阻断促炎细胞因子白细胞介素-6 的作用。它被批准用于治疗类风湿性关节炎。

[0319] 帕利珠单抗 (Synagis®, Abbott) 是一种人类单克隆抗体,直接作用于呼吸道合胞体病毒 (RSV) F-蛋白的 A-抗原表位。它用于防止 RSV 的感染。

[0320] 西妥昔单抗 (Erbix®, Merck Serono) 是一种嵌合单克隆抗体,直接作用于表皮

生长因子受体。它适用于结肠癌、头部和颈部鳞状细胞癌的治疗。

[0321] 多克隆人类 IgG 的研究证明了所述配体在通过 Fc 部分的免疫球蛋白亲和纯化中具有普遍适用性。

[0322] 当应用本发明时,总结构式 (I) 的配体与适当的支撑材料附连,形成配体取代的基质,一般是一种用于亲和纯化的基质,优选用于蛋白分离的亲色谱(也指本发明上下文中的亲和基质)。总结构式的配体通过 L 与支撑材料附连,可选择地含有一个间隔基团 -Sp-。

[0323] 相应地,发明包括一种用于蛋白分离的配体取代的基质(一种亲和基质),包括支撑材料和至少一种本说明书前述的配体,其中所述配体通过 L 附连至所述支撑材料。

[0324] 所述基质 - 可表示为 M- 可包括或由任意本领域技术人员所知的适当的支撑材料组成。所述材料可以是可溶的或不可溶的,微粒的或非微粒的,或是一个包括纤维和膜的整体结构,多孔的或非多孔的。它提供了一种从接触溶液的溶质中分离出本发明配体的方便的方法。支撑材料的实例包括:碳水化合物和交联的碳水化合物基质,如琼脂糖、琼脂糖凝胶(Sepharose)、葡聚糖凝胶(Superdex)、纤维素、葡聚糖、淀粉、藻酸盐或角叉菜胶;合成聚合物基质,如聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯基苯共聚物、聚丙烯酸酯、PEG 聚丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸酯(如聚甲基丙烯酸羟乙酯)、聚乙烯醇、聚酰胺或全氟化碳;无机基质,如玻璃、硅或金属氧化物;及复合材料。

[0325] 所述亲和基质通过提供一个由适当的支撑材料和附连的具有结构式 (I) (的配体组成的基质制备而得,所述具有结构式 (I) 的配体包括结构式 (Ia)、(Ib) 和 (Ic) 和 / 或结构式 (II),和 / 或具有结构式 (III) 的结构元素。附连所述配体 (I) 至支撑材料的方法是本领域技术人员所知的。

[0326] 因此,本申请包括利用一种具有结构式 (I) 的配体,包括结构式 (Ia)、(Ib) 和 (Ic),和 / 或结构式 (II),和 / 或具有结构式 (III) 的结构元素,且其中变量 L、Sp、SpP、Am、Ar¹、Ar²、R¹ 和 / 或 v 具有结构式 (I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(II) 和 / 或 (III) 中所定义,和 / 或在本说明书中,尤其是优选实施例中所定义的含义,制备 / 合成一种配体取代的基质,所述配体取代的基优选如结构式 (I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、(II),更优选为结构式 (II) 所定义的。

[0327] 本发明还涉及一种亲和纯化蛋白的方法,优选为亲和色谱法,其中被纯化的蛋白如前述那样与配体取代的基质接触。

[0328] 术语“亲和纯化”(也可与术语“亲和分离”互换使用)是指任何涉及通过结构式 (I) 的配体分子识别一种蛋白的分离技术。所述配体可以固定在固相支撑材料上,以方便之后的配体-抗体复合物的分离。分离技术可以包括但不限于基于填充柱、整体结构或膜的亲和色谱。所述术语进一步包括在批处理模式下或亲和沉淀的吸收中。

[0329] 具有独立的特点,纯化技术具有一个初始识别相,在其中配体与粗抗体接触。在第二相,要么杂质从配体-抗体复合物中分离出(如柱层析),要么配体-抗体复合物从杂质中分离出(如亲和沉淀)。第三步,通过改变化学和 / 或物理条件,如改变 pH 值、离子强度和 / 或添加改性剂(如有机溶剂、洗涤剂或离液剂),将抗体从配体-抗体复合物中分离出来。

[0330] 本发明将用下面的实施例来说明,但其不限制本发明。

[0331] 本说明书所引用的文献：

[0332] 1. A. Cecilia, A. Roque, C. R. Lowe, M. A. Taipa:Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules:Production and Purification, Biotechnol. Prog. 2004, 20, 639-654

[0333] 2. K. L. Carson:Flexibility-the guiding principle for antibody manufacturing, Nature Biotechnology, 2005, 23, 1054-1058 ;S. Hober, K. Nord, M. Linhult:Protein A chromatography for antibody purification, J. Chromatogr. B. 2007, 848, 40-47

[0334] 3. T. Arakawa, Y. Kita, H. Sato, D. Ejima, Protein Expression and Purification. 2009, 63, 158-163

[0335] 4. S. Ghose, B. Hubbard, S. M. Cramer, Journal of Chromatography A, 2006, 1122, 144-152

具体实施方式

[0336] 材料和方法

[0337] 如果没有另外说明,除了实施例 1 外的所有化学品和溶剂均为分析纯。实施例 1 中所使用的试剂为制备级至分析级纯,取决于对颗粒的要求和可获得性。

[0338] 具有 0.45 μm 平均孔径的亲水性滤膜的 96 和 384 孔滤板购自 Pall 公司 (Dreieich/ 德国)。由聚乙烯制成的具有 10 μm 平均孔径的顶部玻璃料由 Porex (Bautzen/ 德国) 提供。用于收集流份和分析测定的通用微量滴定板从 Greiner Bio One 公司 (Frickenhausen/ 德国) 订购。分析测定的读取使用来自 BMG Labtech 公司 (Offenburg/ 德国) 的 Fluostar Galaxy plate reader。

[0339] 抗体的柱色谱和抗体片段的纯化在 Waters HPLC 系统 (Waters 公司, Eschborn/ 德国) 上进行。Omnifit 柱座 (Diba 工业有限公司, Cambridge/ 英国) 用于柱子的填塞。NHS 活化的 Sepharose 4FF、重组蛋白 A Sepharose FF 和 Superdex70 色谱介质购自 GE Healthcare (Uppsala/ 瑞典)。Mabsorbent A2P HF 购自 ProMetic Life Sciences (Cambridge/ 英国) 以及 MEP Hypercel 购自 Pall 公司 (Port Washington NY, 美国)。

[0340] 配体的分析色谱在 Shimadzu HPLC 系统 (Shimadzu 德国公司, Duisburg/ 德国) 上进行,其包括一个二极管阵列检测器和单四极杆质谱仪。整体 C18 反相柱购自 Merck KGaA (Darmstadt/ 德国)。分析中所使用的溶剂是质谱级的。

[0341] 本发明所使用的抗体是贝伐单抗 (Avastin, F. Hoffmann-La Roche, 瑞士), 托珠单抗 (RoActemra, F. Hoffmann-La Roche, 瑞士), 帕利珠单抗 (Synagis, Abbott, 美国), 西妥昔单抗 (Erbix, Merck Serono GmbH, 德国) 以及人血清聚-IgG (Sigma-Aldrich, 美国)。

[0342] 蛋白 A 色谱的流出物 (作为宿主细胞蛋白被提及) 衍生自无血清培养基中产生抗体的 CHO 细胞培养物的上清液。

[0343] 用于 Bradford 测定的考马斯亮蓝染色试剂购自 Thermo Scientific (Bonn/ 德国)。

[0344] 实施例 1 :配体的合成

[0345] 总的步骤 A :在微波辐射下耦合芳香羧酸和芳香胺 ;脱保护。(叔-丁氧基羰基胺

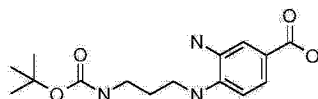
基) 烷基或(叔-丁氧基羰基氨基) 烷氧基-烷氧基-烷基取代的芳香羧酸(0.1-0.5mmol, 一般为0.1mmol) 和 HATU(相对于羧酸的1当量) 溶解于乙腈(1-5mL, 一般为1mL) 和 DIPEA(相对于羧酸的2当量) 中。搅拌5至10分钟(一般为10分钟) 后, 将该溶液加入到微波小瓶内的芳香胺(相对于羧酸的1当量) 中。充满氩气后, 将小瓶密封, 并将混合物在微波辐射下加热至100-120°C(一般为120°C), 保持60-90分钟(一般为90分钟)。取出少量样品进行 HPLC-MS 分析。如果反应完全(即 HPLC-MS 显示无活性酯存在), 将混合物进行后处理。如果活性酯和芳香胺都被检测出, 再继续加热直至12小时。如果检测出了未反应的活性酯, 但没有检测出残留的芳香胺, 那么就加入过量的溶于微量乙腈(一般为0.5mL) 的芳香胺(一般相对于羧酸的0.5当量), 并继续加热, 直到活性酯被完全消耗。

[0346] 在大多数情况下, 反应混合物冷却至室温时产物几乎都会定量地沉淀。这些情况下, 将固体分离并用乙酸乙酯(一到两次, 一般一次) 或甲醇(一次) 洗涤, 然后用 TBME(一次) 洗涤, 并用氮气流小心干燥。

[0347] 如果该产物没有沉淀或仅部分沉淀, 用氮气流除去溶剂。将残留物用柠檬酸水溶液(5%) 处理, 然后用乙酸乙酯多次萃取。将合并的有机层用水洗并蒸发至干。

[0348] 在所有情况下, 叔-丁氧基羰基保护基团的脱保护通过用二氯甲烷(一般为2mL) 和三氟乙酸(一般为1mL) 处理残留物来完成, 一般为1小时, 随后将溶剂彻底蒸发。将粗产物通过制备型反相 HPLC-MS(乙腈-水梯度洗脱) 提纯, 或者通过快速柱色谱(氨基官能化的固定相, 甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 提纯。

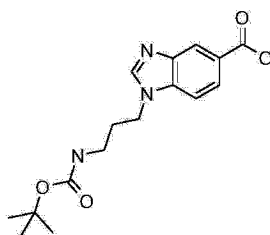
[0349]



[0350] 3-氨基-4-[(3-叔丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸的合成: 将含有 N-叔-丁氧羰基-1,3-二氨基丙烷(5mmol) 和 DIPEA(10mmol) 的二恶烷(5mL) 加入到含有的 4-氟-3-硝基苯甲酸(5mmol) 的二恶烷(5mL) 中。将混合物加热回流90分钟, 随后, 将溶剂真空去除, 残留物用柠檬酸水溶液(5%) 溶液处理, 并用乙酸乙酯萃取两次。将合并的有机层用水洗涤, 蒸发至干, 与乙酸乙酯共蒸发, 并且将残留物在高真空下干燥。

[0351] 在氩气氛围下向残留物中加入活性炭载钯(5%, 蘸有50%的水; Degussa Type E101N0/W; 50mg) 和甲醇(20mL)。滴加三乙基硅烷(4mL) 10分钟以上。随后, 将混合物通过硅藻土过滤, 将滤液蒸发至干, 残留物在高真空条件下干燥且不经进一步纯化可直接使用。数次成功地重复了该反应。

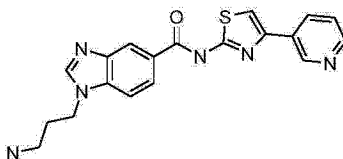
[0352]



[0353] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸的合成: 将原甲酸三甲酯(10mL) 加入到上述步骤获得的全部量的 3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]

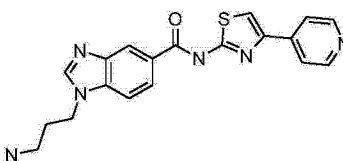
基]苯甲酸中。将混合物加热回流 35 分钟,随之将溶剂去除,残留物在高真空条件下干燥并通过快速柱色谱(SiO_2 固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱)纯化,得到的 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸为褐色固体。

[0354]



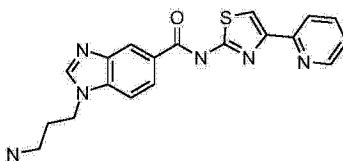
[0355] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(3-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L46) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(3-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :379(M+1)。

[0356]



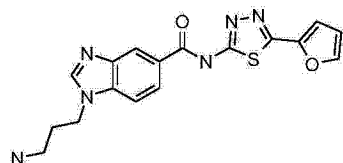
[0357] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L47) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(4-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :379(M+1)。

[0358]



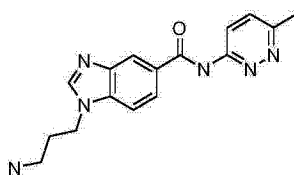
[0359] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L23) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :379(M+1)。

[0360]



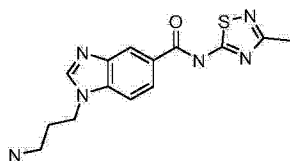
[0361] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L05) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :369(M+1)。

[0362]



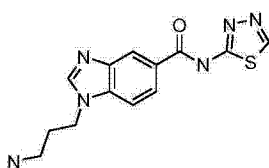
[0363] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(6-甲基哒嗪-3-基)酰胺 (L34) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 3-氨基-6-甲基哒嗪制备而得。ESI-MS :311 (M+1)。

[0364]



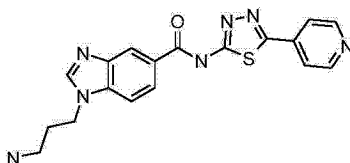
[0365] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(3-甲基-1,2,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L36) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 5-氨基-3-甲基-1,2,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :317 (M+1)。

[0366]



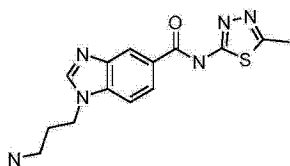
[0367] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L13) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :303 (M+1)。

[0368]



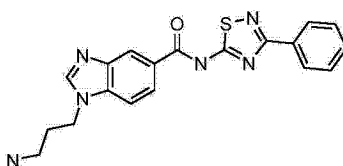
[0369] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(4-吡啶基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L21) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(4-吡啶基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :380 (M+1)

[0370]



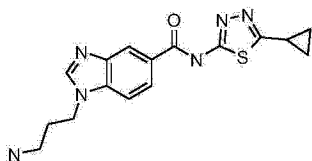
[0371] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-甲基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L14) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-甲基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :317 (M+1)。

[0372]



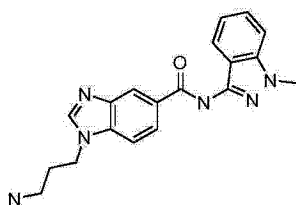
[0373] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(3-苯基-1,2,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L22) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 5-氨基-3-苯基-1,2,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :379(M+1)。

[0374]



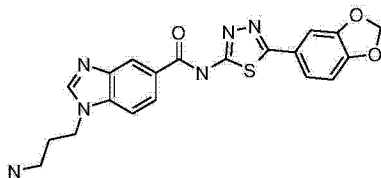
[0375] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-环丙基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L35) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-环丙基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :343(M+1)。

[0376]



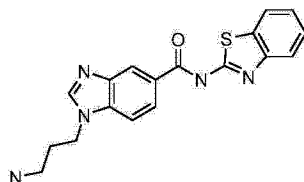
[0377] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(1-甲基-3-吡唑基)酰胺 (L02) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 3-氨基-1-甲基吡唑制备而得。ESI-MS :349(M+1)。

[0378]



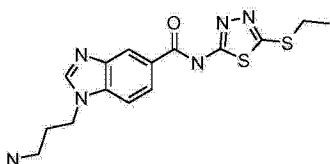
[0379] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[2-(3,4-亚甲二氧苯基)-1,3,4-噻二唑-5-基]酰胺 (L09) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(3,4-亚甲二氧苯基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :423(M+1)。

[0380]



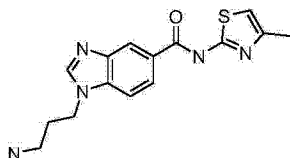
[0381] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(苯并噻唑-2-基)酰胺 (L10) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基苯并噻唑制备而得。ESI-MS :352(M+1)。

[0382]



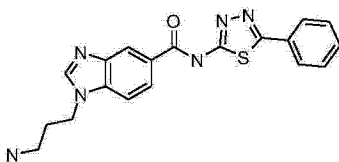
[0383] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸N-(2-乙硫基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺(L12)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-5-乙硫基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS:363(M+1)。

[0384]



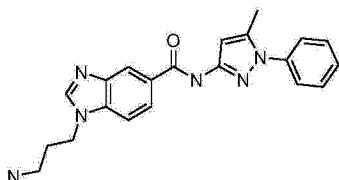
[0385] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸N-(4-甲基噻唑-2-基)酰胺(L15)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-4-甲基噻唑制备而得。ESI-MS:316(M+1)。

[0386]



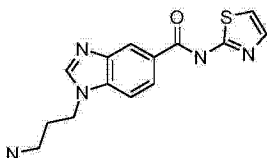
[0387] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸N-(2-苯基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺(L33)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-5-苯基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS:379(M+1)。

[0388]



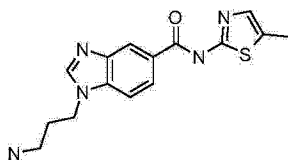
[0389] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸N-(5-甲基-1-苯基吡唑-3-基)酰胺(L11)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和3-氨基-5-甲基-1-苯基吡唑制备而得。ESI-MS:375(M+1)。

[0390]



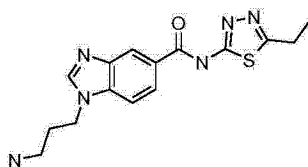
[0391] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸N-(噻唑-2-基)酰胺(L16)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基噻唑制备而得。ESI-MS:302(M+1)。

[0392]



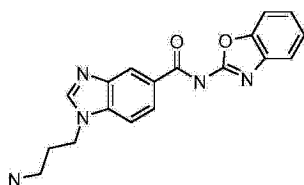
[0393] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5-甲基噻唑-2-基)酰胺 (L17) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-甲基噻唑制备而得。ESI-MS :316 (M+1)。

[0394]



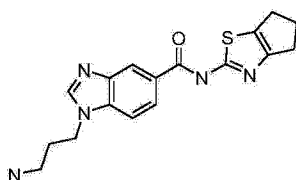
[0395] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(2-乙基-1,3,4-噻二唑-5-基)酰胺 (L07) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-乙基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :331 (M+1)。

[0396]



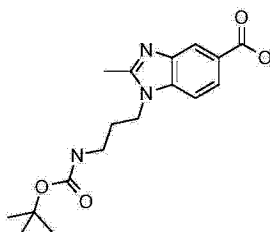
[0397] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(苯并恶唑-2-基)酰胺 (L08) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基苯并恶唑制备而得。ESI-MS :336 (M+1)。

[0398]



[0399] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5,6-二氢-(4H)-环戊噻唑-2-基)酰胺 (L32) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5,6-二氢-(4H)-环戊噻唑制备而得。ESI-MS :342 (M+1)。

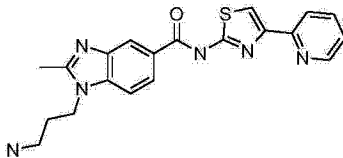
[0400]



[0401] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸的合成:向玻璃小瓶中二恶烷 (2mL) 中的 3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸 (其

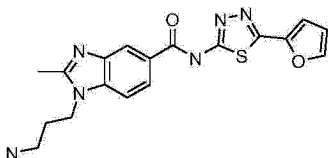
合成参见前述,0.5mmol) 内加入原乙酸三甲酯 (2mmol)。将所述小瓶完全封闭,并将混合物加热至 100℃,保持 1 小时,随之蒸发溶剂。将残留物通过快速柱色谱 (SiO₂ 固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 纯化,得到的 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸为褐色固体。

[0402]



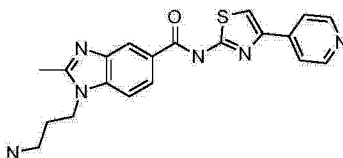
[0403] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L42) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :393(M+1)。

[0404]



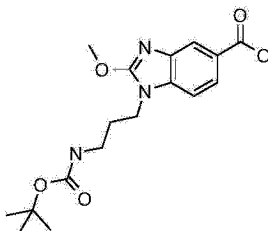
[0405] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L39) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :383(M+1)。

[0406]



[0407] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L51) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(4-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :393(M+1)。

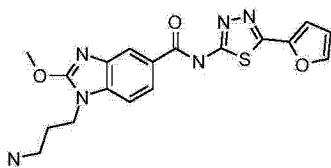
[0408]



[0409] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲氧基苯并咪唑-5-羧酸的合成:向玻璃小瓶中二恶烷 (2mL) 中的 3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸 (其合成参见前述,0.5mmol) 内加入原碳酸四甲酯 (2mmol)。将所述小瓶完全封闭,并将混合物加热至 100℃,保持 1 小时,随之蒸发溶剂。将残留物通过快速柱色谱 (SiO₂ 固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 纯化,得到的 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪

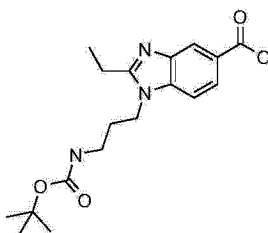
唑-5-羧酸为褐色固体。

[0410]



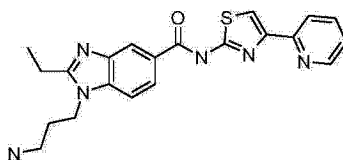
[0411] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲氧基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L45) 的合成:根据总的步骤 A (在低浓度的三氟乙酸和最短的反应时间内进行保护基团的裂解,以避免甲氧基的酸解/水解),由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-甲氧基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :399(M+1)。

[0412]



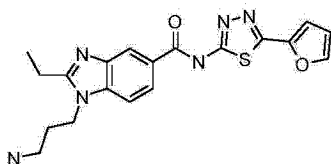
[0413] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸的合成:向玻璃小瓶中二恶烷 (2mL) 中的 3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸 (其合成参见前述,0.5mmol) 内加入原丙酸三乙酯 (2mmol)。将所述小瓶完全封闭,并将混合物加热至 100°C,保持 1 小时,随之蒸发溶剂。将残留物通过快速柱色谱 (SiO₂ 固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 纯化,得到的 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸为褐色固体。

[0414]



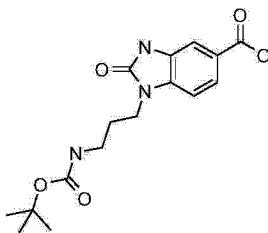
[0415] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基] 酰胺 (L43) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :407(M+1)。

[0416]



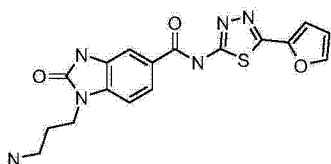
[0417] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L44) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :397(M+1)。

[0418]



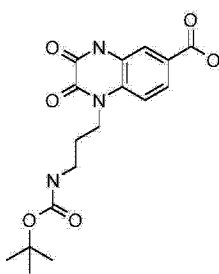
[0419] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸的合成:向含有3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸(其合成参见前述,0.2mmol)的二氯甲烷(2mL)中加入DIPEA(1mmol)和氯代三甲基硅烷(0.6mmol)。搅拌5分钟后,将含有双(三氯甲基)碳酸酯(0.1mmol)的二氯甲烷(1mL)滴加进去并继续搅拌5分钟。加入饱和碳酸氢钠水溶液(200 μ L),并摇晃2分钟,然后加入柠檬酸水溶液(5%),并将有机层分离。水层再次用二氯甲烷萃取,用柠檬酸水溶液(5%)和水洗涤合并的有机层,随后蒸干形成的悬浮液。将残留物用乙酸乙酯(1mL)和TBME(0.5mL)萃取,接着再用TBME萃取。将合并的有机层蒸干并在高真空下干燥。粗1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸在使用时无需进一步提纯。

[0420]



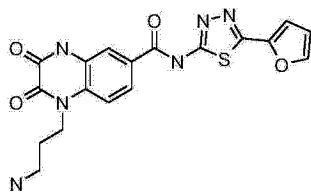
[0421] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺(L24)的合成:根据总的步骤A,由1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS:385(M+1)。

[0422]



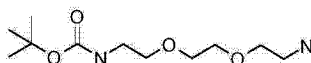
[0423] 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2,3-二氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-羧酸的合成:向含有3-氨基-4-[(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)氨基]苯甲酸(其合成参见前述,0.2mmol)的二氯甲烷(2mL)中加入DIPEA(1mmol)和氯代三甲基硅烷(0.6mmol)。搅拌5分钟后,将含有草酰氯(0.3mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液滴加进去并继续搅拌5分钟。加入饱和碳酸氢钠水溶液(200 μ L),并摇晃2分钟,然后加入柠檬酸水溶液(5%),并将有机层分离。水层再次用二氯甲烷萃取,用柠檬酸水溶液(5%)和水洗涤合并的有机层,随后蒸干形成的悬浮液。将残留物在高真空下干燥。粗1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2,3-二氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-羧酸在使用时无需进一步提纯。

[0424]



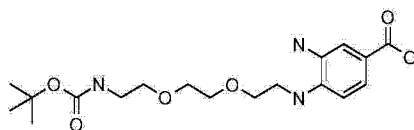
[0425] 1-(3-氨基-1-丙基)-2,3-二氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L28) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-2,3-二氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-羧酸和 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS:413(M+1)。

[0426]



[0427] 1-氨基-8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂辛烷的合成:将 1,8-二氨基-3,5-二氧杂辛烷 (135mmol) 溶于二氯甲烷 (100mL) 中。在搅拌的同时缓慢加入二碳酸二叔丁酯 (45mmol) 的二氯甲烷 (50mL) 溶液。1 小时后除去溶剂,残留物用乙酸乙酯 (200mL) 稀释,用碳酸钠水溶液 (10%) 洗涤三次,用硫酸钠干燥,过滤并蒸发至干。在高真空下干燥至无色油状物后,使用该粗产物时无需进一步提纯。

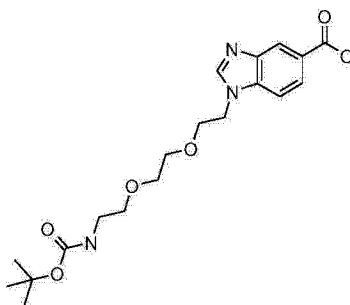
[0428]



[0429] 4-氨基-3-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]氨基苯甲酸的合成:将 1-氨基-8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂辛烷 (6mmol) 和 DIPEA (10mmol) 溶解在二恶烷 (5mL) 中。加入 4-氟-3-硝基苯甲酸 (5mmol) 的二恶烷 (5mL) 溶液,将混合物加热回流 2 小时,随之加入另一部分含有 1-氨基-8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂辛烷 (2mmol) 的二恶烷 (2mL),继续加热 1 小时。蒸发溶剂,将残留物溶解在乙酸乙酯 (50mL) 中,并用柠檬酸水溶液 (5%) 和水洗涤。除去溶剂,残留物在高真空下干燥。

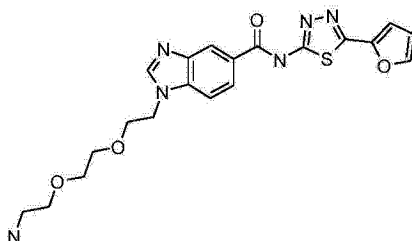
[0430] 在氩气氛围下向残留物中加入活性炭载钯 (5%, 蘸有 50% 的水; Degussa Type E101NO/W; 50mg) 和甲醇 (20mL)。滴加三乙基硅烷 (4mL) 10 分钟以上。搅拌 20 分钟后,再滴加三乙基硅烷 (1mL) 2 分钟以上,然后继续搅拌 10 分钟。随后,将混合物通过硅藻土过滤,将滤液蒸发至干,残留物在高真空条件下干燥且不经进一步纯化可直接使用。数次成功地重复了该反应。

[0431]



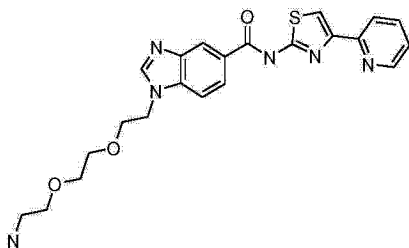
[0432] 1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸的合成:将4-氨基-3-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]氨基苯甲酸(其合成参见前述,使用整批的材料)溶解于原甲酸三甲酯(5mL)中,在80°C下搅拌1小时。蒸发溶剂,将残留物用快速柱色谱(SiO₂固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱)纯化,得到的1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸为褐色固体。

[0433]



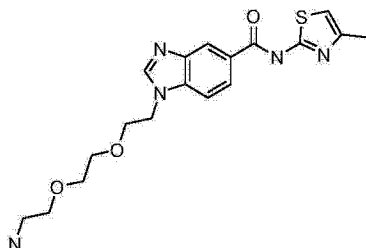
[0434] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺(L25)的合成:根据总的步骤A,由1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS:443(M+1)。

[0435]



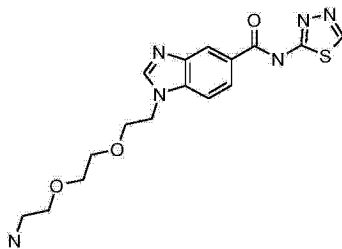
[0436] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺(L41)的合成:根据总的步骤A,由1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS:453(M+1)。

[0437]



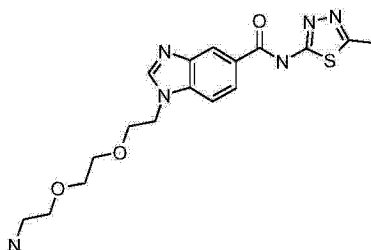
[0438] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(4-甲基噻唑-2-基)酰胺 (L29) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-[(8-叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-4-甲基噻唑制备而得。ESI-MS :390(M+1)。

[0439]



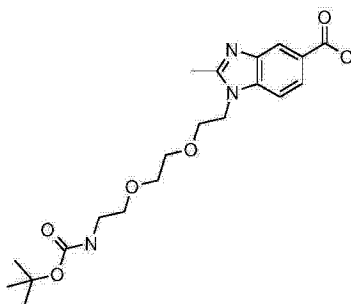
[0440] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L27) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-[(8-叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :377(M+1)。

[0441]



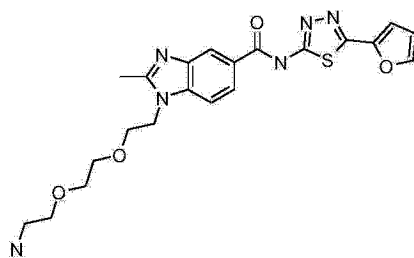
[0442] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸 N-(5-甲基-1,3,4-噻二唑-2-基)酰胺 (L26) 的合成:根据总的步骤 A,由 1-[(8-叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]苯并咪唑-5-羧酸和 2-氨基-5-甲基-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :391(M+1)。

[0443]



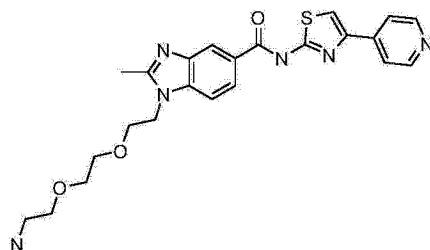
[0444] 1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸的合成:将 4-氨基-3-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]氨基苯甲酸(其合成参见前述,使用整批的材料)溶解于二恶烷(20mL)中,用原乙酸三甲酯(20mmol)处理,并加热回流 1 小时。蒸发溶剂,将残留物通过快速柱色谱(SiO₂固定相,甲醇-二氯甲烷梯度洗脱)纯化,得到的 1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸为褐色固体。

[0445]



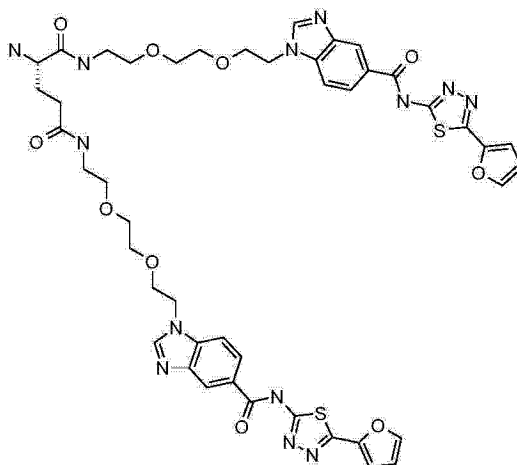
[0446] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L49) 的合成:根据总的步骤A,由1-(8-叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑制备而得。ESI-MS :457 (M+1)。

[0447]



[0448] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(4-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L52) 的合成:根据总的步骤A,由1-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸和2-氨基-4-(4-吡啶基)噻唑制备而得。ESI-MS :467 (M+1)。

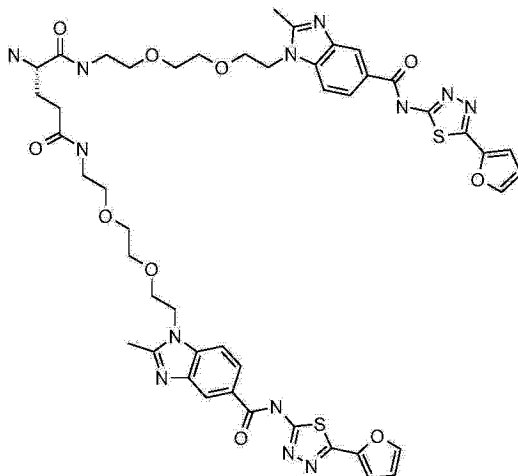
[0449]



[0450] (S)-谷氨酸 N, N'-双 {8-[5-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]氨基甲酰基]苯并咪唑-1-基]-3,5-二氧杂-1-辛基} 酰胺 (L53) 的合成:制备 500 μmol 量的 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L25) (其合成参见前述,未进行色谱纯化)。粗的三氟乙酸胺盐用 DMF (1mL) 和 DIPEA (3mmol) 处理。将 N-叔-丁氧羰基谷氨酸 (0.2mmol)、HATU (0.4mmol) 和 DIPEA (1mmol) 溶解于 DMF (1mL) 中。5 分钟后,将该混合物加入到之前制备的溶液中。20 分钟后,加入 TBME (2mL),并将该混合物静置约 1 小时,随之形成了稠密的沉淀,经离心分离出沉淀,用乙酸乙酯和 TBME 洗涤,并在氮气流中小心干燥。将得到的固体用二氯甲烷 (2mL) 和三氟

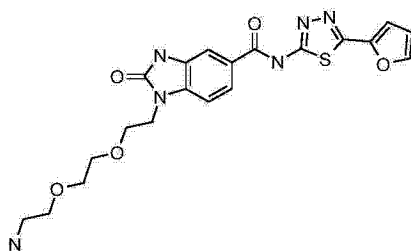
乙酸 (1mL) 处理 30 分钟, 然后去除溶剂, 通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS : 499 ((M+2)/2)。

[0451]



[0452] (S)-谷氨酸 N,N'-双 {8-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻唑二唑-2-基氨基甲基]-2-甲基苯并咪唑-1-基}-3,5-二氧杂-1-辛基} 酰胺 (L54) 的合成: 制备 500 μ mol 量的 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻唑二唑-2-基] 酰胺 (L49) (其合成参见前述, 未进行色谱纯化)。粗的三氟乙酸胺盐用 DMF (1mL) 和 DIPEA (3mmol) 处理。将 N-叔-丁氧羰基谷氨酸 (0.2mmol)、HATU (0.4mmol) 和 DIPEA (1mmol) 溶解于 DMF (1mL) 中。5 分钟后, 将该混合物加入到之前制备的溶液中。20 分钟后, 加入 TBME (2mL), 并将该混合物静置约 1 小时, 随之形成了稠密的沉淀, 经离心分离沉淀, 用乙酸乙酯和 TBME 洗涤, 并在氮气流中小心干燥。将得到的固体用二氯甲烷 (2mL) 和三氟乙酸 (1mL) 处理 30 分钟, 然后去除溶剂, 通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS : 513 ((M+2)/2)。

[0453]

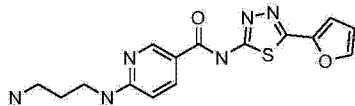


[0454] 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻唑二唑-2-基] 酰胺 (L50) 的合成: 将 4-氨基-3-[8-(叔-丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基] 氨基苯甲酸 (1mmol; 其合成见前述) 溶解在二恶烷 (4mL) 中, 用原碳酸四甲酯处理 (4mmol), 并加热至 100 $^{\circ}$ C 保持 1 小时。蒸发溶剂, 残留物通过快速柱色谱 (SiO₂ 固定相, 甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 纯化, 得到 1-[8(叔丁氧羰基)氨基-3,5-二氧杂-1-辛基]-2-甲氧基苯并咪唑-5-羧酸。

[0455] 将羧酸 (0.1mmol)、HATU (0.1mmol) 和 DIPEA (0.2mmol) 溶解于乙腈 (1mL) 中。10 分钟后, 将溶液加至 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻唑二唑 (0.1mmol) 中, 并在微波辐射下将混合物加热至 120 $^{\circ}$ C, 保持 90 分钟。冷却至室温后, 将沉淀物分离, 用 TBME 洗涤,

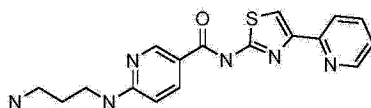
在氮气流中小心干燥,并用三氟乙酸(1mL)处理。在微波辐射下,将溶液加热至 100℃,保持 1 小时。冷却至室温后,将溶剂除去并且将残留物通过制备型反相 HPLC-MS 提纯,得到 1-(8-氨基-3,5-二氧杂-1-辛基)-2-氧代-2,3-二氢苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺。ESI-MS :459 (M+1)。

[0456]



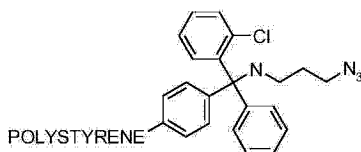
[0457] 6-[(3-氨基-1-丙基)氨基]烟酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L19) 的合成:将 6-氯烟酸(0.2mmol)、HATU(0.2mmol)和 DIPEA(0.4mmol)溶于乙腈(1mL)中。1 分钟后将该暗红色溶液中加入到 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑(0.2mmol)中,将混合物加热至 50℃保持 5 分钟。冷却至室温后,形成沉淀,分离出沉淀,并用乙酸乙酯和 TBME 洗涤,在空气中干燥。接着,加入 1,3-二氨基丙烷(1mL),并在微波辐射下将该混合物加热至 150℃,保持 1 小时。用氮气流除去溶剂之后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :345 (M+1)。

[0458]



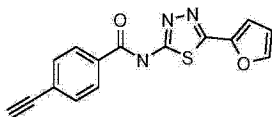
[0459] 6-[(3-氨基-1-丙基)氨基]烟酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L40) 的合成:将 6-氯烟酸(0.2mmol)、HATU(0.2mmol)和 DIPEA(0.4mmol)溶于乙腈(1mL)中。1 分钟后将该暗红色溶液中加入到 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑(0.2mmol)中,将混合物加热至 50℃保持 20 分钟。冷却至室温后,将溶剂蒸发,将残留物溶于乙酸乙酯中,用柠檬酸水溶液(5%)、饱和碳酸钠水溶液和水洗涤,蒸发溶剂后加入 1,3-二氨基丙烷(1mL),并在微波辐射下将该混合物加热至 100℃,保持 2 小时。用氮气流除去溶剂之后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :355 (M+1)。

[0460]



[0461] 与 2-氯三苯甲基聚苯乙烯树脂连接的 3-叠氮基-1-丙胺的合成:用 3-氨基-1-丙醇(0.5mL)处理预载有 2-氯三苯甲基氯(150 μmol)的聚苯乙烯树脂,接着用二氯甲烷(2mL)处理。搅拌该浆液 30 分钟,然后用 DMF、甲醇和二氯甲烷(各三次)彻底清洗该树脂,并在空气流中干燥。向该干燥树脂中加入二氯甲烷(2mL)、DIPEA(1mmol)和甲基磺酰氯(0.5mmol)。在室温下振荡 1 小时后,用二氯甲烷洗涤树脂三次,并在空气流中干燥。将该干燥树脂转移至含有叠氮化钠(1mmol)的玻璃小瓶中。加入 DMF(2mL)后,将小瓶完全封闭,并将混合物加热至 60℃过夜。用水/甲醇和 DMSO(各二次)洗涤该树脂。

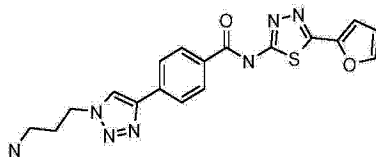
[0462]



[0463] 4-乙炔基苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺的合成:将 4-溴苯甲酸 (0.2mmol)、HATU(0.2mmol) 和 DIPEA(0.4mmol) 溶于乙腈 (1mL) 中。5 分钟后,将该溶液加至 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑 (0.2mmol) 中。在微波辐射下,将混合物加热至 100℃,保持 60 分钟。冷却至室温后,将沉淀分离出,并用乙酸乙酯和 TBME 洗涤,用氮气流中小心干燥。

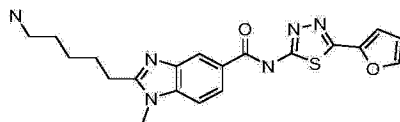
[0464] 将固体悬浮于四氢呋喃 (1mL) 中并加入到装有二氯化双(三苯基氧膦基)钯-(II) (5 μmol)、三苯基膦 (15 μmol) 和碘化铜-(I) (15 微摩尔) 的微波管中。对该管施加超声波的同时用氩气充满,然后将其密封。加入三乙胺 (0.5mL) 和乙炔基三异丙基硅烷 (0.5mmol) 后,将该管形瓶再次用氩气充满,并在微波辐射下加热至 100℃,保持 3 小时。随后,用氮气流将所有的挥发性成分蒸发掉。将残留物用四氢呋喃 (1mL)、水 (10 μL) 和四正丁基氟化铵溶液 (THF 中 1M, 0.5mL) 处理。将混合物搅拌 15 分钟,然后蒸发溶剂,残留物通过短 SiO₂ 柱 (用乙酸乙酯/甲醇洗脱,约 4:1) 吸附和洗脱而从主要副产物中分离出。蒸除溶剂后,将产物在真空中干燥且无需进一步提纯即可使用。

[0465]



[0466] 6-[1-(3-氨基-1-丙基)-三唑-4-基]苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L48) 的合成:向与 2-氯三苯甲基聚苯乙烯树脂连接的 3-叠氮基-1-丙胺 (150 μmol;其合成如前述) 中加入碘化铜-(I) (3mg)。将之前得到的所有 4-乙炔基苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺溶于 DMSO (2mL) 中,并加入到树脂中。用氩气充满后,将混合物在 60℃ 下搅拌过夜。接着将树脂用 DMF、水、甲醇和二氯甲烷洗涤 (各三次),并干燥。产物通过三氟乙酸、二氯甲烷和三乙基硅烷 (45:45:10) 双倍处理后,从支持物上裂解出来,然后用二氯甲烷洗涤。蒸发溶剂后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化粗产物。ESI-MS:396 (M+1)。

[0467]



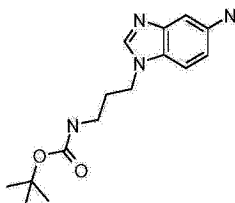
[0468] 2-(5-氨基-1-戊基)-1-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L31) 的合成:4-甲氨基-3-硝基苯甲酸 (0.2mmol)、HATU(0.2mmol) 和 DIPEA(0.4mmol) 悬浮于乙腈 (1mL) 中并搅拌 5 分钟,然后将悬浮液加入到 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑 (0.2mmol) 中。将混合物加热至 100℃,保持 20 分钟,然后加入 DMSO(0.1mL) 和乙腈 (1mL),并继续加热 1 小时。冷却至室温后,收集沉淀,用乙酸乙酯洗涤两次,并用氮气流小心干燥。

[0469] 由于使用活性炭载钯和三乙基硅烷以减少硝基用量的尝试均未成功,将残留物用

含有氯化锡-(II) (1mmol) 的吡啶 (1mL) 和水 (50 μ L) 在 100°C 下处理 30 分钟。冷却至室温后,将固体滤出并用甲醇彻底冲洗。蒸发溶剂,并将残留物悬浮在乙酸乙酯中。将该悬浮液用水洗涤三次,并蒸发至干。

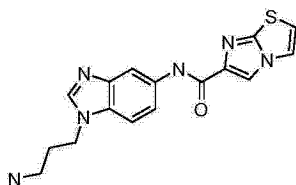
[0470] 将 6-(叔-丁氧羰基氨基)己酸 (0.2mmol)、HATU (0.2mmol) 和 DIPEA (0.4mmol) 溶于乙腈 (1mL) 中。2 分钟后将该溶液加入到之前获得的残留物中,并将混合物在室温下搅拌 75 分钟,随之形成稠密的沉淀并分离出沉淀,用乙酸乙酯洗涤两次,用氮气流小心干燥。加入三氟乙酸 (1mL),并将该混合物搅拌过夜。将混合物蒸发至干,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :411 (M+1)。

[0471]



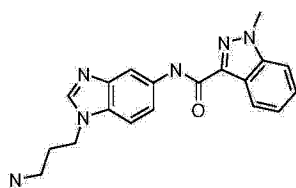
[0472] 5-氨基-1-(3-叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)-苯并咪唑的合成:向 3-(叔-丁氧羰基氨基)-1-丙胺 (0.3mmol) 和 DIPEA (0.5mmol) 中加入 2,4-二硝基氟苯 (0.25mmol) 的二恶烷 (1mL) 溶液。将混合物加热至 100°C 保持 25 分钟,然后蒸发溶剂。将残留物溶于乙酸乙酯中,用柠檬酸水溶液 (5%) 和水洗涤两次。蒸发溶剂,残留物用活性炭载钯 (5%, 蘸有 50% 的水; Degussa Type E101N0/W; 50mg) 和甲醇 (1mL) 进行处理。将混合物用氩气充满并加入三乙基硅烷 (0.6mL)。摇晃混合物直至上浮层脱色,然后加入原甲酸三甲酯 (1mL),并将该混合物在氩气氛下加热至 80°C 保持 1 小时。接着,将悬浮液用经甲醇冲洗过的硅藻土过滤。蒸发溶剂,将残留物真空干燥。

[0473]



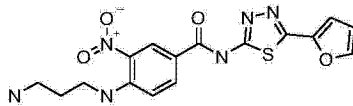
[0474] 1-(3-氨基-1-丙基)-5-[(咪唑并-[2,1-b]噻唑-6-基)甲酰胺]苯并咪唑 (L30) 的合成:将咪唑并 [2,1-b] 噻唑-6-羧酸 (0.25mmol)、HATU (0.25mmol) 和 DIPEA (0.5mmol) 溶于乙腈 (1mL) 中,并在 10 分钟之后加入到 5-氨基-1-(3叔-丁氧羰基氨基-1-丙基)苯并咪唑 (其合成见前述,使用整批材料) 中。将混合物在室温下振荡过夜,然后蒸发溶剂,将残留物溶解在乙酸乙酯中,用柠檬酸水溶液 (5%)、碳酸钠水溶液和水洗涤,并蒸发至干。在残留物中加入二氯甲烷 (2mL),接着加入三氟乙酸,并将混合物在室温下搅拌 30 分钟,随之蒸发溶剂,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :341 (M+1)。

[0475]



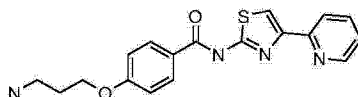
[0476] 1-(3-氨基-1-丙基)-5-[(1-甲基咪唑-3-基)甲酰胺基]苯并咪唑 (L01) 的合成:按 1-(3-氨基-1-丙基)-5-[(咪唑并-[2,1-b]噻唑-6-基)甲酰胺]苯并咪唑 (L30) 的制备方法,使用 1-甲基咪唑-3-羧酸代替咪唑并[2,1-b]噻唑-6-羧酸。ESI-MS: 349(M+1)。

[0477]



[0478] 4-[(3-氨基-1-丙基)氨基]-3-硝基苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L18) 的合成:将含有 3-(叔-丁氧羰基氨基)-1-丙胺 (0.3mmol)、4-氟-3-硝基苯甲酸 (0.3mmol) 和 DIPEA (0.6mmol) 的二恶烷 (2mL) 加热至 100℃ 保持 40 分钟,随后,蒸发溶剂。向残留物中加入含有 HATU (0.3mmol) 的乙腈 (1mL) 和 DIPEA (0.6mmol),并在室温下搅拌混合物 5 分钟。加入含有 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑 (0.3mmol) 的乙腈 (1mL) 后,将混合物加热至 100℃ 保持 20 分钟。紧接着冷却至室温后,收集固体沉淀,用乙酸乙酯洗涤三次,并用氮气流干燥。接着,加入二氯甲烷 (2mL) 和三氟乙酸 (1mL),并将该混合物搅拌 30 分钟,随之蒸发溶剂。残留物通过快速柱色谱纯化,在 NH₂ 修饰的固定相上用甲醇-二氯甲烷(含有 1% 的三乙胺)梯度洗脱。ESI-MS:389(M+1)。

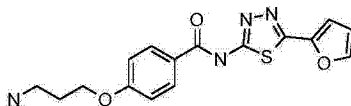
[0479]



[0480] 4-[(1-氨基-3-丙基)氧基]苯甲酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L38) 的合成:预载有 2-氯三苯甲基氯 (150 μmol) 的聚苯乙烯树脂先后用 3-氨基-1-丙醇 (0.5mL) 及二氯甲烷 (2mL) 处理。搅拌该浆液 30 分钟,然后用 DMF、甲醇和二氯甲烷(各三次)彻底洗涤树脂,并在氮气流中干燥。向该干燥树脂中加入三苯基膦 (1mmol) 和 4-羟基苯甲酸甲酯 (1mmol)。加入无水四氢呋喃 (2mL) 后,搅拌混合物,直到树脂被充分溶胀。然后逐滴加入 N,N'-偶氮二羧酸二异丙酯 (1mmol),并将混合物振摇 2 小时。之后用 DMF、甲醇和二氯甲烷(各三次)洗涤树脂。将该干燥树脂转移至玻璃小瓶中,并用四氢呋喃 (2mL)、甲醇 (1mL) 和氢氧化钠水溶液 (2N, 1mL) 处理。将小瓶完全关闭,并且将混合物加热至 80℃ 保持 3 小时,然后用 DMF、DMF 中的乙酸(约 5%)、DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤(各三次)树脂。

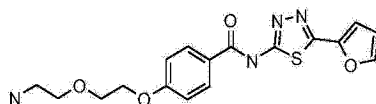
[0481] 将树脂在 NMP 中溶胀。加入 NMP (1mL)、HATU (0.2mmol) 和 DIPEA (0.4mmol) 后,将混合物搅拌 10 分钟,随之加入溶于 NMP (1mL) 中的 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑 (0.2mmol)。用氩气充满小瓶,将混合物在微波辐射下加热至 120℃ 保持 90 分钟。然后洗涤树脂 (DMF、甲醇、二氯甲烷,各三次),通过用三氟乙酸、二氯甲烷和三乙基硅烷 (45:45:10) 双倍处理,将目标化合物从支持物上裂解出来,接着用二氯甲烷冲洗。蒸发溶剂后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS:355(M+1)。

[0482]



[0483] 4-[(1-氨基-3-丙基)氧基]苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L20) 的合成:按 4-(1-氨基-3-丙氧基)苯甲酸 N-[4-(2-吡啶基)噻唑-2-基]酰胺 (L38) 的制备方法,使用 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑替代 2-氨基-4-(2-吡啶基)噻唑。ESI-MS :345 (M+1)。

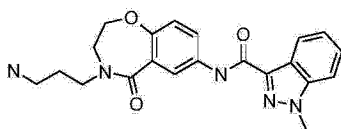
[0484]



[0485] 4-(5-氨基-3-氧杂-1-戊氧基)苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺 (L37) 的合成:预载有 2-氯三苯甲基氯 (150 μmol) 的聚苯乙烯树脂先后用氨基乙氧基乙醇 (0.5mL) 和二氯甲烷 (2mL) 处理。搅拌该浆液 30 分钟,然后用 DMF、甲醇和二氯甲烷 (各三次) 彻底洗涤树脂,并在高真空下干燥。向该干燥树脂中加入三苯基膦 (1mmol) 和 4-羟基苯甲酸甲酯 (1mmol)。加入无水四氢呋喃 (2mL) 后,搅拌混合物,直到树脂被充分溶胀。然后逐滴加入 N, N'-偶氮二羧酸二异丙酯 (1mmol),并将混合物振摇 2 小时。之后用 DMF、甲醇和二氯甲烷 (各三次) 洗涤树脂。将该干燥树脂转移至玻璃小瓶中,并用四氢呋喃 (2mL),甲醇 (1mL) 和氢氧化钠水溶液 (2N, 1mL) 处理。将小瓶完全关闭,并且将混合物加热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 小时,至 80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 30 分钟,然后用 DMF、DMF 中的乙酸 (约 5%)、甲醇和二氯甲烷洗涤 (各三次)。

[0486] 将树脂在 NMP 中溶胀。加入 NMP (1mL)、HATU (0.2mmol) 和 DIPEA (0.4mmol) 后,将混合物搅拌 10 分钟,随之加入溶于 NMP (1mL) 中的 2-氨基-5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑 (0.2mmol)。用氩气充满小瓶,将混合物在微波辐射下加热至 120 $^{\circ}\text{C}$ 保持 90 分钟。然后洗涤树脂 (DMF、甲醇、二氯甲烷,各三次),通过用三氟乙酸、二氯甲烷和三乙基硅烷 (45:45:10) 双倍处理,将目标化合物从支持物上裂解出来,接着用二氯甲烷冲洗。蒸发溶剂后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :375 (M+1)。

[0487]



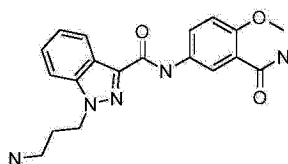
[0488] 4-(3-氨基-1-丙基)-7-[(1-甲基咪唑-3-基)甲酰胺]-2,3,4,5-四氢苯并[f][1,4]氧氮杂卓-5-酮 (L03) 的合成:向 2-氯三苯甲基氯聚苯乙烯树脂 (150 μmol) 中加入 3-氨基丙-1-醇 (1mL) 和二氯甲烷 (1mL),并将该混合物搅拌 20 分钟,再用 DMF、甲醇和二氯甲烷 (各三次) 洗涤树脂。干燥该树脂液,并用含有 DIPEA (1mmol) 的二氯甲烷 (1mL) 处理,接着滴加含有甲磺酰氯 (0.5mmol) 的二氯甲烷 (1mL)。将混合物在室温下振摇 20 分钟,然后用二氯甲烷洗涤树脂三次,干燥,转移到玻璃小瓶中,用乙醇胺 (1mL) 和 NMP (1mL) 中在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 2 小时。随后用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤 (各三次)。

[0489] NMP (1.5mL) 中的 2-氟-5-硝基苯甲酸 (200 μmol) 和 TBTU (200 μmol) 用 DIPEA (400 μmol) 处理 2 分钟。随后,将该混合物加入到 NMP 溶胀的树脂中,并将混合物搅

拌 25 分钟,然后如前文所述洗涤该树脂。加入 THF(2mL)、甲醇(1mL)和 NaOH 水溶液(2M, 1mL)后,将树脂搅拌三天,然后用甲醇和二氯甲烷彻底洗涤。

[0490] 用 NMP(1.5mL) 中的吡啶(0.5mL) 和无水氯化锡-(II)(1mmol) 处理树脂,并于室温下振摇 5.5 小时,随之加入另一部分溶于 NMP(0.5mL) 中的无水氯化锡-(II)(0.5mmol)。将该混合物振摇过夜,并随后用甲醇洗涤。不溶性的反应副产物用甲醇通过反复小心浮选而从树脂中分离出去。用二氯甲烷洗涤后,将树脂溶胀在 NMP 中。含有 1-甲基-3-吡啶羧酸(0.2mmol) 和 HATU(0.2mmol) 的 NMP(1.5mL) 用 DIPEA(0.4mmol) 处理,2 分钟后将混合物加入到树脂中,并搅拌 5 小时。用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤树脂(各三次)。通过用含有三氟乙酸(45%) 和三乙基硅烷(10%) 的二氯甲烷双倍处理,从而将目标化合物从支持物上裂解出来,接着用二氯甲烷彻底冲洗树脂。蒸发溶剂后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :394(M+1)。

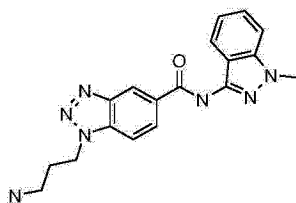
[0491]



[0492] 1-(3-氨基-1-丙基)-吡啶-3-羧酸 N-(3-氨基甲酰基-4-甲氧基苯基) 酰胺(L04) 的合成:预载有由 9-苄基甲氧羰基保护的 Sieber 酰胺链接剂的聚苯乙烯树脂溶胀于二氯甲烷中,再溶于 DMF 中。用吡啶(DMF 中 25%,约 3mL) 处理树脂中 10 分钟,接着用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤(各三次)。将 5-(9-苄基甲氧羰基)氨基-2-甲氧基苯甲酸(0.2mmol) 和 HATU(0.2mmol) 溶解于 NMP(1.5mL) 中,并用 DIPEA(0.4mmol) 处理。2 分钟后将该溶液加入到树脂中,将混合物搅拌 30 分钟,然后将树脂用 DMF 洗涤三次。加入吡啶(DMF 中 25%,约 3mL) 后,将混合物搅拌 15 分钟,随后用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤(各三次)。

[0493] 将吡啶-3-羧酸(0.5mmol) 和 1-羟基苯并三唑(0.5mmol) 溶解在 NMP(1.5mL) 中,用 N,N'-二异丙基碳化二亚胺(0.5mmol) 处理 2 分钟,随之将溶液加入到树脂中,并将混合物振摇 1 小时,然后洗涤(DMF、甲醇、二氯甲烷,各三次)。干燥后,将树脂转移到玻璃小瓶中,并在 NMP 中的 1,3-二溴丙烷(1mmol) 和 DIPEA(1mmol) 在 60°C 下过夜处理。将该反应再重复一次,在 100°C 下进行 4.5 小时,随之洗涤树脂(DMF、甲醇、二氯甲烷,各三次),再次转移到玻璃小瓶中。加入四氢呋喃(2mL) 和浓氨水(1mL) 后,密封小瓶,将混合物加热至 50°C 保持 90 分钟。加入额外的氨水(1mL) 后,继续加热过夜。用 DMF、甲醇和二氯甲烷(各三次) 洗涤树脂后,用二氯甲烷、三氟乙酸和三乙基硅烷(85:10:5) 三倍处理,使产物从树脂上裂解出来,接着用二氯甲烷冲洗树脂。蒸发溶剂后,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS :368(M+1)。

[0494]



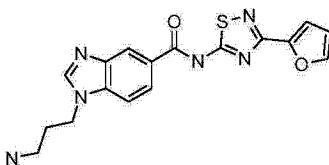
[0495] 1-(3-氨基-1-丙基)-苯并三唑-5-羧酸 N-(1-甲基吡啶-3-基) 酰胺(L06) 的

合成:将含有 3-(叔-丁氧羰基氨基)-1-丙胺 (0.3mmol)、4-氟-3-硝基苯甲酸 (0.3mmol) 和 DIPEA (0.6mmol) 的二恶烷 (2mL) 加热至 100℃ 保持 1 小时,随后蒸发溶剂。向残留物中加入柠檬酸水溶液 (5%),并用乙酸乙酯萃取混合物两次。将合并的有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤两次,用硫酸镁干燥,过滤并蒸发至干。然后加入活性炭载钯 (5%, 蘸有 50% 的水; Degussa Type E101N0/W; 50mg) 和甲醇 (2mL),接着加入三乙基硅烷 (500 μ L, 滴加超过 3 分钟)。追加振摇混合物 5 分钟后,经硅藻土过滤,蒸发至干,残留物在一个完全封闭的玻璃小瓶中用 DMF (2mL) 和亚硝酸异戊酯 (0.9mmol) 60℃ 下处理过夜。冷却至室温后,加入柠檬酸水溶液 (5%, 2mL) 并用乙酸乙酯萃取混合物三次。将合并的有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤三次,用硫酸镁干燥,过滤,蒸发并真空干燥。

[0496] 将残留物溶解在二恶烷 (1mL) 和 DIPEA (0.6mmol) 中,并在室温下用双(三氯甲基)碳酸酯 (0.1mmol) 的二恶烷 (1mL) 溶液处理 30 分钟。随后,加入含有 3-氨基-1-甲基吡唑 (0.3mmol) 的二氯甲烷 (1mL) 并搅拌混合物 30 分钟,随之蒸发溶剂,用饱和碳酸钠水溶液 (2mL) 处理残留物,并用乙酸乙酯萃取两次。将合并的有机层用柠檬酸水溶液 (5%) 和饱和碳酸钠水溶液洗涤两次,用硫酸镁干燥,通过硅藻土过滤,并蒸发至干。

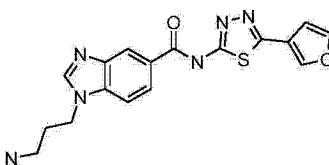
[0497] 室温下用二氯甲烷 (2mL)、三乙基硅烷 (0.1mL) 和三氟乙酸 (1mL) 处理残留物 15 分钟。然后蒸发溶剂,通过制备型反相 HPLC-MS 纯化残留物。ESI-MS: 350 (M+1)。

[0498]



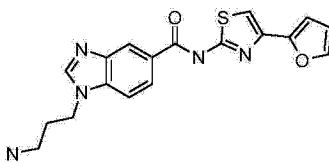
[0499] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噁二唑-5-基]酰胺 (L55) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。5-氨基-3-(2-呋喃基)-1,2,4-噁二唑作为芳香胺使用。

[0500]



[0501] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噁二唑-2-基]酰胺 (L56) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(3-呋喃基)-1,3,4-噁二唑作为芳香胺使用。

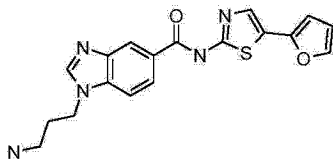
[0502]



[0503] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噁唑-2-基]酰胺

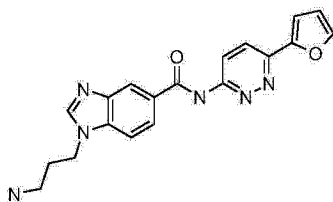
(L57) 的合成:使用总的步骤A合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。2-氨基-4-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0504]



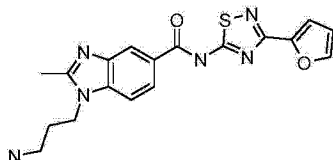
[0505] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基]酰胺(L58)的合成:使用总的步骤A合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0506]



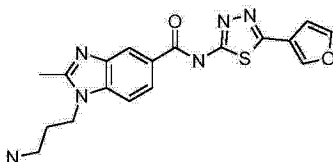
[0507] 1-(3-氨基-1-丙基)苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基]酰胺(L59)的合成:使用总的步骤A合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。3-氨基-6-(2-呋喃基)哒嗪作为芳香胺使用。耦合时间需于 120°C 在微波辐射条件下延长至 6-18 小时。

[0508]



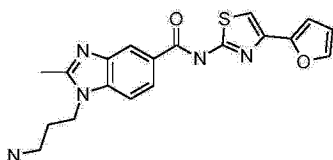
[0509] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑-5-基]酰胺(L60)的合成:使用总的步骤A合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。5-氨基-3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑作为芳香胺使用。

[0510]



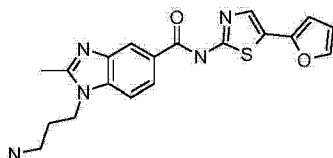
[0511] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基]酰胺(L61)的合成:使用总的步骤A合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑作为芳香胺使用。

[0512]



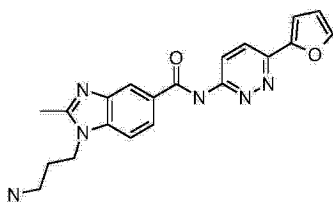
[0513] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噻唑-2-基]酰胺 (L62) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。2-氨基-4-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0514]



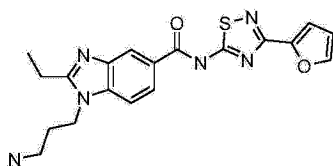
[0515] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基]酰胺 (L63) 的合成:使用总的步骤法 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸(合成如前所述)作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0516]



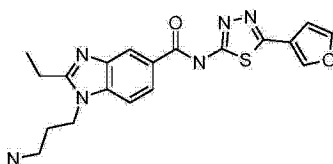
[0517] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基]酰胺 (L64) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。3-氨基-6-(2-呋喃基)哒嗪作为芳香胺使用。耦合时间需于 120°C 在微波辐射条件下延长至 6-18 小时。

[0518]



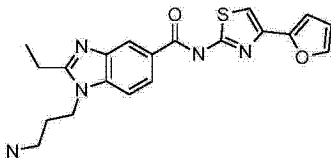
[0519] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑-5-基]酰胺 (L65) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸(其合成见前述)作为羧酸成分使用。5-氨基-3-(2-呋喃基)-1,2,4-噻二唑作为芳香胺使用。

[0520]



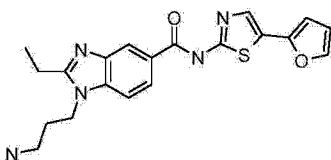
[0521] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L66) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(3-呋喃基)-1,3,4-噻二唑作为芳香胺使用。

[0522]



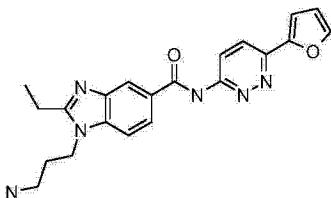
[0523] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[4-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺 (L67) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。2-氨基-4-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0524]



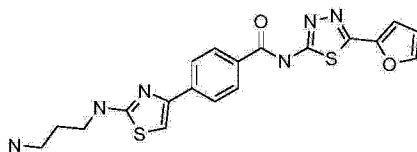
[0525] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-呋喃基)噻唑-2-基] 酰胺 (L68) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。2-氨基-5-(2-呋喃基)噻唑作为芳香胺使用。

[0526]



[0527] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 N-[6-(2-呋喃基)哒嗪-3-基] 酰胺 (L69) 的合成:使用总的步骤 A 合成。1-[3-(叔-丁氧羰基)氨基-1-丙基]-2-乙基苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 作为羧酸成分使用。3-氨基-6-(2-呋喃基)哒嗪作为芳香胺使用。耦合时间需于 120°C 在微波辐射条件下延长至 6-18 小时。

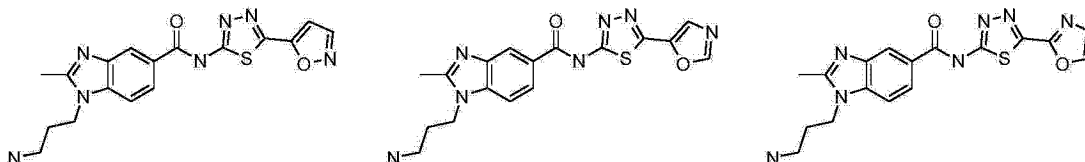
[0528]



[0529] 4-[2-(3-氨基-1-丙基)噻唑-4-基] 苯甲酸 N-[5-(2-呋喃基)-1,3,4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L70) 的合成:合成在不溶性支持物上进行。因此,预载有 1,3-二氨基丙烷 (150 μ mol) 的三苯甲基聚苯乙烯树脂与 N-(9-苄基甲氧羰基) 异氰酸酯 (150-500 μ mol) 在 1-甲基吡咯-2-酮或二氯甲烷 (1-5mL) 中反应 30 分钟至过夜。用 DMF、甲醇和二氯甲

烷洗涤树脂后,用含有哌啶的 DMF (25%, 2-5mL) 处理树脂 10-30 分钟,随之如前所述洗涤树脂。然后加入含有 4-溴乙酰苯甲酸甲酯 (150-500 μmol) 的 1-甲基吡咯-2-酮、二甲亚砜或二氯甲烷 (1-5mL), 伴随加入等摩尔量的合适的碱 (DIPEA、N-甲基吗啉、三乙胺或 N, N-二甲基苯胺), 并将该混合物在室温下搅拌 30 分钟至过夜, 随之如前所述洗涤树脂。接着, 用氢氧化钠水溶液 (2-5M, 0.5-2mL)、甲醇 (0.5-2mL) 和四氢呋喃 (1-4mL) 的混合物处理树脂, 并在 40-70°C 下搅拌 1 小时至过夜, 然后反复用 DMF、含有乙酸的 DMF (1-5%)、甲醇和二氯甲烷洗涤。然后加入 HATU (相对于树脂的负载量的 1-2 当量) 的 NMP (1-3mL) 和 DIPEA (相对于 HATU 量的 2 当量) 溶液, 并将该混合物搅拌 2-10 分钟, 随之加入 2-氨基-5-(2-咪唑基)-1, 3, 4-噻二唑 (相对于 HATU 量的 1-2 当量), 并通过传统加热或微波辐射将该混合物加热至 100-120°C 保持 30-180 分钟。用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤树脂之后, 通过含有三氟乙酸 (10%) 和三乙基硅烷 (5%) 的二氯甲烷处理, 使最终产物从支持物上裂解出来。蒸发溶剂后, 通过快速柱色谱法 (氨基修饰的固定相, 甲醇-二氯甲烷梯度洗脱) 或制备型反相 HPLC-MS 纯化最终产物。

[0530]



[0531] 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(5-异恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L71)、1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(5-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L72) 和 1-(3-氨基-1-丙基)-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 N-[5-(2-恶唑基)-1, 3, 4-噻二唑-2-基] 酰胺 (L73) 的合成: 使用总的步骤 A 合成。各苯胺的合成应用以下步骤: 一种羧酸, 即异恶唑-5-羧酸 (L71), 恶唑-5-羧酸 (L72) 和恶唑-2-羧酸 (L73) (10mmol) 和缩氨基硫脲 (15mmol) 溶解在磷酸氯 (5mL) 中, 并加热至 60-80°C 保持 10 分钟至 5 小时。冷却至室温后, 将混合物倒在冰水中, 并用氢氧化钠水溶液调节 pH 至 8-10。通过过滤或用合适的溶剂萃取 (乙酸乙酯、氯仿或二氯甲烷) 将产物从所得的混合物中重新获得, 然后蒸发。通过重结晶 (如从乙醇, 异丙醇, 乙醇/水混合物中) 或柱色谱法 (普通相或氨基修饰的固定相, 甲醇-二氯甲烷或甲醇-氯仿梯度洗脱) 纯化粗产物。使用所得的苯胺和作为羧酸成分的 1-[3-(叔-丁氧羰基) 氨基-1-丙基]-2-甲基苯并咪唑-5-羧酸 (其合成见前述) 按照总的步骤 A 合成目标化合物。

[0532] 实施例 1 中所使用的缩写:

[0533] DIPEA = N-乙基-N,N-二异丙基胺

[0534] TBME = 叔-丁基甲基醚

[0535] HATU = 邻-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯

[0536] HPLC-MS = 高效液相色谱-质谱联用仪

[0537] ESI-MS = 电喷雾电离质谱

[0538] DMF = N,N-二甲基甲酰胺

[0539] DMSO = 二甲亚砜

[0540] 实施例 2: 配体的固定

[0541] 将实施例 1 中所得配体固定在 NHS- 活化的 Sepharose 4FF 上,以用于随后的色谱和批吸附实验。耦合是通过在配体上间隔前驱体基团的氨基和预活化树脂的 NHS 活化羧酸基团之间形成酰胺键来实现。

[0542] 干燥的配体以接近 50mM 的浓度重溶解于 DMSO 中。耦合反应中,将一体积的以近 20-30mM 的浓度溶解在含有 1M 的 N, N- 二异丙基乙胺的 90% DMSO 和 10% N- 甲基 -2- 吡啶酮中的配体加入一体积的稳定的 NHS- 活化的 Sepharose 4FF(GE Healthcare) 中。反应在 25°C 剧烈摇动下进行至少 3 小时。倒出反应上清液,并用适当的溶剂清洗树脂两次。树脂上剩余的活性基团用 1M 的乙醇胺在 25°C 下处理 1-2 小时进行阻断。洗涤最终的树脂,并于 4°C 下保存在 30% 的乙醇中,直至随后的实验中使用。

[0543] 实施例 3:(实施例 1 所得)配体的色谱评价

[0544] 实验

[0545] 在填充模式下通过微量滴定板色谱法对树脂进行了评价。对于每根柱,大约 30 μ L 的树脂被转移到 384 孔过滤板内,并用适当的顶部玻璃料密封。重组蛋白 A Sepharose 4FF 和 Mabsorbent A2P HF 的柱作为对照。

[0546] 在注射前,用 6.7 柱体积 (cv) 的磷酸盐缓冲盐水 (0.15M NaCl, 20mM 磷酸钠, PH 7.3 ;PBS) 平衡柱子。将以 0.5mg ml⁻¹ 的浓度溶解在 PBS 中的 3.3cv 的全 IgG 或未稀释的宿主细胞蛋白 (HCP) 注入柱子。

[0547] 用 5cv 的 PBS 将游离的蛋白从柱子中洗去,然后用 5cv 的甘氨酸缓冲液于 PH 2.5 的条件下洗脱。被转移的体积以 50g 的转度快速旋转通过柱子 1-2 分钟。样品注射过程中,速度降至 10g,且离心时间增至 5-10 分钟。将流份收集在 384 孔板中,且用 Bradford 测定法分析蛋白的浓度。蛋白的质量 m_i 、 m_{ft} 和 m_e , (见下) 计算为流份体积和测定的蛋白浓度的乘积。

[0548] 总结和结果

[0549] 证明了几个抗体间的结合和洗脱。其中包括三个人的治疗性抗体贝伐单抗、托珠单抗和帕利珠单抗、嵌合抗体西妥昔单抗和分离自人血清的人聚合 IgG (h-poly-IgG) 混合物。配体对抗体的选择性由宿主细胞蛋白的结合行为的研究确定。商业树脂重组蛋白 A Sepharose 4FF (rProtein A) 和 Mabsorbent A2P (A2P) 的结果被列入比较。

[0550] 蛋白结合分数 (bound) 计算为:注入蛋白的总质量 m_i 与检测到的流出蛋白的质量 m_{ft} 之差,除以注入蛋白的总质量 m_i 。

$$[0551] \quad bound = \frac{m_i - m_{ft}}{m_i}$$

[0552] 蛋白产率 (yield) 计算为:洗脱蛋白的质量 m_e 除以注入蛋白的质量 m_i 。

$$[0553] \quad yield = \frac{m_e}{m_i}$$

[0554] 树脂选择性 (selectivity) 计算为:结合贝伐单抗抗体的分数 B_{Ab} 除以结合宿主细胞蛋白的分数 B_{HCP} 。

$$[0555] \quad selectivity = \frac{B_{Ab}}{B_{HCP}}$$

[0556] 各树脂的蛋白结合分数和蛋白产率是基于全 IgG 抗体的数据计算出的。对于宿主

细胞蛋白只给出了蛋白结合分数。树脂选择性根据贝伐单抗全 IgG 和宿主细胞蛋白的数据进行计算。由于实验精确度有限,截断了选择性数值超过 10 的。

[0557] 下表给出了实施例 2 中树脂和参考树脂的色谱结果。L55-73 中的结果为基于从 L01-L54 中所获得信息的估计值。

[0558]

配体	贝伐单抗		托珠单抗		帕利珠单抗		西妥昔单抗		人聚合IgG		宿主细胞蛋白	
	结合分数 (%)	产率 (%)	结合分数 (%)	产率 (%)	结合分数 (%)	产率 (%)	结合分数 (%)	产率 (%)	结合分数 (%)	产率 (%)	结合分数 (%)	选择性
L01	100	90	100	110	99	79	100	89	100	97	33	3.0
L02	100	101	100	97	91	92	100	97	100	100	28	3.6
L03	100	92	99	103	78	73	99	94	-	-	45	2.2
L04	100	98	100	97	85	84	100	102	100	86	28	3.6
L05	100	101	100	103	100	98	100	100	100	104	17	5.9
L06	100	84	-	-	74	74	-	-	-	-	31	3.2
L07	100	93	100	100	90	88	100	102	94	97	23	4.3
L08	100	100	100	100	91	86	100	104	95	95	39	2.6
L09	100	97	100	100	100	95	100	105	100	106	39	2.6
L10	100	100	100	103	100	96	100	107	100	104	45	2.2
L11	100	99	96	90	61	66	98	100	88	87	51	2.0
L12	100	104	100	106	100	96	100	95	100	96	40	2.5
L13	100	98	100	103	97	92	100	94	97	93	21	4.8
L14	100	100	100	101	89	84	100	94	92	90	16	6.3
L15	100	91	100	103	100	98	100	94	100	93	39	2.6
L16	100	96	100	103	87	88	100	91	88	92	37	2.7
L17	100	100	100	100	88	86	100	95	89	96	34	2.9
L18	100	102	100	100	100	92	100	98	100	107	29	3.4
L19	100	98	100	91	99	85	100	95	98	96	14	7.1

[0559]

[0560]

L20	100	100	100	92	100	88	100	100	96	100	105	35	2.9
L21	100	100	98	86	85	72	100	100	98	82	81	2	10.0
L22	100	104	100	94	100	90	100	100	98	100	108	30	3.3
L23	100	107	100	95	100	93	100	100	98	100	103	13	7.7
L24	100	101	100	93	100	90	100	100	97	100	99	12	8.3
L25	100	99	100	93	100	85	99	100	97	100	92	4	10.0
L26	100	103	72	73	63	54	94	90	90	63	71	2	10.0
L27	100	103	61	64	41	34	88	50	87	50	58	4	10.0
L28	100	95	98	101	58	60	89	63	93	63	72	12	8.3
L29	100	98	90	94	72	64	99	76	92	76	72	18	5.6
L30	100	100	100	99	93	79	100	94	95	94	88	21	4.8
L31	100	95	100	95	100	89	100	100	91	100	95	20	5.0
L32	100	103	100	98	91	81	100	89	89	91	91	44	2.3
L33	100	105	100	100	100	92	100	94	94	100	94	34	2.9
L34	100	104	85	84	78	69	100	90	90	78	74	10	10.0
L35	100	104	100	98	100	87	100	89	89	100	96	29	3.4
L36	100	104	90	96	93	89	99	94	94	81	87	9	10.0
L37	100	87	100	103	100	91	100	94	94	100	101	25	4.0
L38	100	106	99	97	95	91	100	103	103	99	98	35	2.9
L39	100	85	100	99	100	96	100	96	96	100	98	10	10.0
L40	100	101	99	101	89	80	100	94	94	98	87	20.5	4.9
L41	100	103	100	103	98	87	100	96	96	100	95	13	7.7
L42	100	98	100	106	97	91	100	96	96	100	103	13.5	7.4

L43	100	95	100	108	98	91	100	95	100	94	18	5.6
L44	100	88	100	106	100	92	100	96	100	96	16	6.3
L45	100	93	100	102	100	91	100	96	100	99	15	6.7
L46	100	103	100	109	98	95	100	94	100	98	17	5.9
L47	100	100	99	108	98	89	100	93	100	97	13	7.7
L48	100	100	100	105	95	86	100	96	100	91	16.5	6.1
L49	100	97	100	96	100	102	100	82	100	97	0	10.0
L50	100	103	80	84	72	78	100	81	76	82	0	10.0
L51	100	95	98	100	94	88	100	80	97	98	15	6.7
L52	100	96	86	86	80	85	99	81	83	89	9	10.0
L53	100	96	100	91	100	101	100	81	100	95	11	9.1
L54	100	95	100	100	100	93	100	90	100	99	4	10.0
L55	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<40	>2.5
L56	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<40	>2.5
L57	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<40	>2.5
L58	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<40	>2.5
L59	100	>80	>90	>80	>60	>50	>95	>80	>60	>50	<30	>3.3
L60	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<20	>5
L61	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<20	>5
L62	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<20	>5
L63	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<20	>5
L64	100	>80	>90	>80	>60	>50	>95	>80	>60	>50	<20	>5
L65	100	>80	>95	>80	>80	>70	100	>80	>80	>70	<30	>3.3

[0561]

L66	100	>80	>95	>80	>70	100	>80	>80	>70	>80	>80	>70	<30	>3,3
L67	100	>80	>95	>80	>70	100	>80	>80	>70	>80	>80	>70	<30	>3,3
L68	100	>80	>95	>80	>70	100	>80	>80	>70	>80	>80	>70	<30	>3,3
L69	100	>80	>90	>80	>50	>95	>80	>80	>50	>80	>60	>50	<30	>3,3
L70	100	>80	>80	>80	>40	>80	>80	>80	>40	>80	>50	>40	<40	>2,5
L71	100	>80	>90	>80	>50	>95	>80	>80	>50	>80	>60	>50	<20	>5
L72	100	>80	>90	>80	>50	>95	>80	>80	>50	>80	>60	>50	<20	>5
L73	100	>80	>90	>80	>50	>95	>80	>80	>50	>80	>60	>50	<20	>5
rProtein A	100	94	100	95	100	100	100	100	100	100	95	79	0	10.0
A2P	100	84	97	77	89	-	-	-	82	100	100	82	100	1.0

[0562] 对照与所有抗体的结合率接近 100%。而蛋白 A 不与宿主细胞蛋白 (HCP) 结合，A2P 表现出与它们的高结合性。最终选择性指数蛋白 A 为 10.0，A2P 为 1.0。

[0563] 实施例 2 的树脂根据它们与抗体的结合性和选择性,可将其分为三个不同的组。第一组配体的特征在于,抗体结合率至少为 90% 及选择性指数至少为 7(如 L24、L25、L39、L53 和 L54)。第二组配体表现出与至少一个测试抗体的较低的抗体结合率(80%至 89%)和 / 或选择性指数在 4 至 6.9 之间(如 L5、L30、L31 和 L52)。第三组配体与至少一个测试抗体的结合率小于 80%和 / 或选择性指数小于 4(如 L1、L18、L32 和 L50)。

[0564] 实施例 4 :结合的等温线和时间尺度

[0565] 实验

[0566] 用贝伐单抗作为抗体进行实验。纯化抗体的 Langmuir 等温线参数由在 96 孔微量滴定板上进行的成批吸附实验确定。每个孔中,10 μ l 的吸附剂浆料(50% v/v)与 100 μ l 的蛋白溶液混合。在磷酸盐缓冲盐水(0.15M NaCl, 20mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.3 ;PBS)中的初始浓度在 0.05–5mg/ml 中变化。在 25 $^{\circ}$ C 下剧烈搅拌反应物至少 3 小时。此后,通过 Bradford 测定法测定上清液中的抗体浓度。用 Langmuir 等温线方程 (1) 通过直接拟合数值对数据进行估算。

[0567] 通过在 96 孔过滤板上进行的成批吸附对吸收动力学做类似的研究。再次 10 μ l 的吸附剂浆料(50% v/v)与 100 μ l 的蛋白溶液混合。但是 PBS 中的贝伐单抗使用固定的初始浓度 0.75mg/ml。在 25 $^{\circ}$ C 下剧烈搅拌反应物直至 80min。经 2.5、5、10、20、40 和 80 分钟通过旋压过滤,将上清液迅速分离出,并取样进行分析。用 Bradford 测定法分析抗体的浓度。

[0568] 总结和结果

[0569] 实施例 1 中的固定配体的一个子集的特征与它们的亲和力和对贝伐单抗的最大容量有关。此外,还确定了一些配体结合所需的时间尺度。商业树脂重组蛋白 A Sepharose4FF(rProtein A) 和 Mabsorbent A2P(A2P) 被列入比较。

[0570] Langmuir 等温线的参数,即解离常数 K_d 和最大容量 q_m ,由上清液中测得的浓度确定。由 Chase (1) 得到的模型方程的数值拟合估算参数。

[0571] 吸收动力学的特征在于结合的时间尺度为 $t_{0.8}$,它被定义为在此时间后,树脂与抗体的平衡饱和达到 80%。通过拟合图表 (2) 中的双指数和 $t_{0.8}$ 的值修改上清液中测得的浓度以确定 $t_{0.8}$ 。实施例 2 中树脂和参考树脂的结合 Langmuir 等温线和时间尺度参数列于下表中。

[0572]

配体	K_d (mg/ml)	q_m (mg/ml)	$t_{0.8}$ (min)
L01	0.073	40	9.2
L02	0.113	41	-
L05	0.076	47	9.8
L07	0.066	38	8.8
L13	0.091	37	7.0
L14	0.067	35	-
L19	0.199	42	8.9
L23	0.046	46	7.7
L24	0.224	42	9.4
L25	0.038	37	6.6
L30	0.122	40	9.3
L31	0.048	45	5.3
L36	0.234	35	-
L39	0.081	49	7.8
L40	0.086	39	9.2
L41	0.082	41	9.0
L42	0.125	45	7.6
L43	0.162	43	8.2
L44	0.105	53	7.7
L46	0.070	48	6.0
L47	0.064	43	5.6
L48	0.282	37	6.3
L49	0.152	45	8.9
L51	0.098	34	8.8
L53	0.130	34	11.8
L54	0.048	35	8.4
重组蛋白 A	0.005	41	8.9
A2P	0.049	68	9.2

[0573] 研究结果显示,重组蛋白 A 具有最高的亲和力,其 K_d 为 0.005mg/ml。A2P、树脂 L01、L05、L07、L13、L14、L23、L25、L31、L39、L40、L41、L46、L47、L51 和 L54 的解离常数低一个数量级,范围在 0.038mg/ml 和 0.098mg/ml 之间。剩余的树脂的解离常数低两个数量级,范围为 0.105mg/ml 至 0.282mg/ml。关于最大容量, A2P 测得最高容量 (68 毫克每毫升树脂)。重组蛋白 A 的最大容量为 41 毫克每毫升树脂。实施例 2 中树脂的最大容量的变化范围为 34 至 53 毫克每毫升树脂。结合的时间尺度,重组蛋白 A 的为 8.9min, A2P 的为 9.2min, 实施例 2 中树脂的为 5.3min 至 11.8min。

[0574] 实施例 5 :动态结合容量

[0575] 实验

[0576] 动态结合容量由纯化的贝伐单抗的柱色谱确定。把树脂填充进长度为 25mm、内径为 3mm 的分析柱内。以 50cm/h(3min 柱停留时间) 的流速向柱内注入含有 1mg/ml 抗体的磷酸盐缓冲盐水 (150mM NaCl, 20mM 磷酸盐缓冲液, PH 7.3), 同时流出物中抗体的浓度通过其在 280nm 的吸光度在线监测。一直加载抗体直至进料完全穿透。动态结合容量由 10% 穿透时确定。平衡容量由穿透曲线上区域积分确定。用 PH 为 3.0 的甘氨酸洗脱从柱上剥离结合抗体。

[0577] 总结和结果

[0578] 作为流速的函数,测定了 L05(实施例 2)和重组蛋白 A Sepharose 4FF(rProtein A)的贝伐单抗的动态(结合)容量(dynamic capacity)。计算为:时间 $t_{0.1}$ (其后发生 10% 的穿透)乘以流速 F 和进料浓度 c_f 。

$$[0579] \quad \text{dynamic capacity} = t_{0.1} \cdot F \cdot c_f$$

[0580] 平衡容量(equilibrium capacity)定义为对于一个给定的进料流浓度,与柱结合的抗体的最大的量。它由下列积分式计算:

$$[0581] \quad \text{equilibrium capacity} = \int_0^{\infty} [c_f - c(t)] \cdot F dt$$

[0582] 包括进料浓度 c_f , 随时间的流出物浓度 $c(t)$ 和流速 F 。对积分进行数值计算。积分受时间的限制,在此时间后发生完全穿透。动态容量和平衡容量的计算都根据柱和色谱系统的停顿纠正。容量根据柱中树脂的体积进行标准化。

[0583] 下表给出了作为流速的函数的 L05 和重组蛋白 A Sepharose 4FF 的动态结合容量和进料浓度为 1mg/ml 的贝伐单抗的平衡结合容量。

[0584] 对于重组蛋白 A, 确定其动态结合容量为 28 毫克每毫升树脂。L05 的动态结合容量为 25 毫克每毫升树脂。计算出重组蛋白 A 的平衡容量为 40 毫克每毫升树脂, L05 的平衡容量为 39 毫克每毫升树脂。

[0585]

配体	动态容量 (mg/ml)	平衡容量 (mg/ml)
L05	25	39
rProtein A	28	40

[0586] 实施例 6:碱稳定性

[0587] 对实施例 1 中配体的一个子集进行了碱稳定性测试。于 25°C 下用 0.5M 氢氧化钠对配体处理了 8 天。通过 LC-MS 分析仪对水解进行监控。

[0588]

配体	$t_{0.5}$ (h)
L01	840
L02	>999
L04	>999
L05	>999
L07	>999
L13	>999
L14	>999
L19	>999
L23	>999
L24	>999
L25	>999
L30	903
L36	>999
L39	>999
L40	782
L41	>999
L42	>999
L43	>999
L44	>999
L45	>999
L46	719
L47	>999

[0589] 大多数配体在 0.5M 氢氧化钠存在时表现出超过 999 小时的半衰期。剩余配体表现出在 719 小时至 903 小时之间的半衰期。

[0590] 实施例 7 :从细胞培养上清液中提纯抗体

[0591] 实验

[0592] 用于从细胞培养上清液中提纯抗体的树脂适用性用柱色谱法进行评估。使用 0.12mg/ml 浓度的刺入宿主细胞蛋白中的贝伐单抗作为进料 (20% 纯度)。此外, 色谱仪上还对宿主细胞蛋白和单独纯抗体进行检测。每次运行注入 25 倍柱体积的相应样品。注射前后用 PBS 平衡和洗涤柱子。在 pH 3.0 的条件下用 50mM 的甘氨酸洗脱结合蛋白。纯度通过积分和平衡三个单次运行的洗脱峰的面积来确定。产率表示为从蛋白 A 柱中洗脱出的抗体的量的相对回收率, 以所述蛋白 A 柱作为 100%, 进行平行操作。

[0593] 总结和结果

[0594] 通过建立在实施例 2 中的一个子集的树脂上的色谱从细胞培养上清液中纯化了抗体。建立在商业树脂重组蛋白 A Sepharose FF (rProtein A) 上的色谱被列入比较。对各树脂进行了同等条件下的三种色谱运行, 要么注射抗体、宿主细胞蛋白要么注射后者的混合物。

[0595] 通过运行纯抗体计算出经色谱后的操作“产率 (yield)”。它表示为在配体上运行的洗脱峰面积 $A_{E, \text{Ligand}}$ 与在蛋白 A 上运行的洗脱峰面积 $A_{E, \text{Protein A}}$ 的比例。

$$[0596] \quad \text{yield} = \frac{A_{E, \text{Ligand}}}{A_{E, \text{Protein A}}}$$

[0597] 该混合物的经色谱后的抗体“纯度 (purity)”通过用运行纯抗体的洗脱峰面积

$A_{E,Ab}$ 或运行刺入抗体经运行 HCP 的洗脱峰面积 $A_{E,HCP}$ 校正的值平衡运行刺入抗体的洗脱峰面积 $A_{E,Mix}$ 进行计算。

$$[0598] \quad \text{purity} = \frac{A_{E,Mix} - A_{E,HCP}}{A_{E,Mix}} \qquad \text{purity} = \frac{A_{E,Ab}}{A_{E,Mix}}$$

[0599] 下表给出了经建立在实施例 2 中一些树脂和参考树脂上的色谱后获得的纯度和产率。

[0600] 在实验精度内,所有测试树脂的产率均为 100%。经建立在重组蛋白 A 上的色谱后的纯度最高 (98%),接着是树脂 L25 (93%) 和树脂 L24 及 L39 的 (都为 91%)。其余树脂的经色谱后的纯度范围为 80%至 89%。

[0601]

配体	纯度 (%)	产率 (%)
L05	86	100
L19	80	100
L23	82	100
L24	91	100
L25	93	100
L39	91	100
L40	85	100
L47	85	100
L42	89	100
重组蛋白 A	98	100

[0602] 实施例中所引用的文献：

[0603] 1. Chase HA. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. J Chromatogr 1984 ;297:179-202.

[0604] 2. Coffman JL, Kramarczyk JF, Kelley BD. High-throughput screening of chromatographic separations:I. Method development and column modeling. Biotechnology and Bioengineering 2008 ;100(4):605-618.