



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108368051 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201680071444.1

C07C 243/18 (2006.01)

(22) 申请日 2016.11.09

C07C 247/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07C 247/12 (2006.01)

申请公布号 CN 108368051 A

C07D 207/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.08.03

(30) 优先权数据

15003213.4 2015.11.10 EP

(56) 对比文件

CN 103403011 A, 2013.11.20

US 2011207171 A1, 2011.08.25

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.06

WO 2007095506 A1, 2007.08.23

US 2005271673 A1, 2005.12.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/077122 2016.11.09

Pete Crisalli and Eric T. Kool. Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation.《 J. Org. Chem.》.2013, 第78卷第1184-1189页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/081069 EN 2017.05.18

Yinliang Yang and Steven H. L.

(73) 专利权人 ETH苏黎世公司

地址 瑞士苏黎世

Verhelst. Cleavable trifunctional biotin reagents for protein labelling, capture and release.《 Chem. Commun.》.2013, 第49卷第5366-5368页.

(72) 发明人 埃里克·莫兰·卡雷拉

迈克尔·安德烈亚斯·沙夫罗特

娜丁·索博茨基

贝恩德·沃尔沙伊德

Pete Crisalli and Eric T.

Kool. Importance of ortho Proton Donors in Catalysis of Hydrazone Formation.《Organic Letters》.2013, 第15卷(第7期), 第1646-1649页.

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

代理人 魏彦

审查员 林春敏

(51) Int. Cl.

C07D 213/81 (2006.01)

权利要求书2页 说明书28页 附图3页

(54) 发明名称

三官能交联试剂

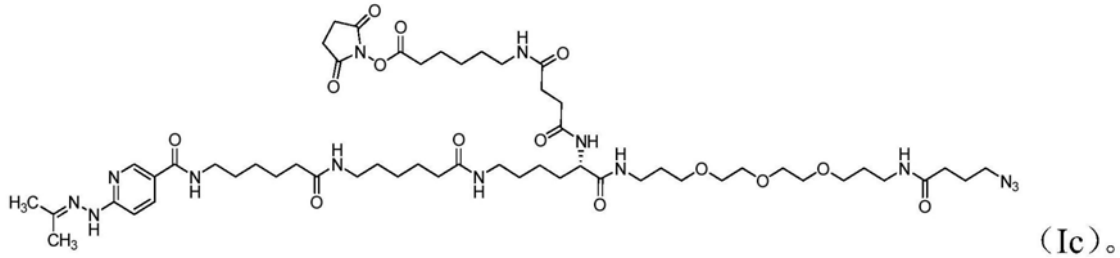
的方法。本发明另提供了在这些方法中的催化剂的新用途。

(57) 摘要

本发明涉及三官能交联试剂,其携带(i)配体反应性基团,用于与在靶糖蛋白受体上具有至少一个结合位点的目标配体缀合,(ii)胺基团,用于捕获氧化的受体-糖蛋白以及(iii)选自叠氮基和炔基的亲水性基团,用于检测、分离和纯化捕获的糖蛋白;以及其制备。本发明另提供了检测、鉴定和表征配体与活细胞上以及生物流体中它们相应的靶糖蛋白之间的相互作用的改进

CN 108368051 B

1. 一种式 (Ic) 的化合物:



2. 根据权利要求1所述的式 (Ic) 的化合物用于表征和分析配体和靶标之间相互作用的用途,所述靶标选自糖蛋白受体的组。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中

- 所述靶糖蛋白受体是细胞表面或分泌的糖蛋白受体;和/或
- 配体是选自由蛋白质、肽、小分子和病毒组成的组的孤儿配体。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述小分子为药物。

5. 鉴定配体 (II) 与样品中靶标 (III) 之间特异性相互作用的方法,其中

- 所述靶标 (III) 是糖蛋白受体;以及
- 所述配体 (II) 识别在所述靶标 (III) 上的配体特异性结构域;

其特征在于

形成靶标-配体-试剂复合物 (VI),所述复合物 (VI) 包括根据权利要求1所述的式 (Ic) 的化合物、配体 (II) 和靶标 (III),其中,配体 (II) 与所述式 (Ic) 的化合物的羟基琥珀酰亚胺酯基团共价结合,并且靶标 (III) 与所述式 (Ic) 的化合物中存在的胺基团共价结合。

6. 根据权利要求5所述的方法,所述方法包括以下步骤:

i) 提供包含所述靶标 (III) 的样品,

ii) 使所述靶标 (III) 经历氧化处理以在至少一个碳水化合物残基上产生醛官能,从而获得氧化的靶标 (IV),

iii) 提供根据权利要求1所述的式 (Ic) 的化合物,并且允许其羟基琥珀酰亚胺酯基团与所述配体 (II) 缀合以获得配体-试剂复合物 (V),

iv) 在 (a) 所述复合物 (V) 能够结合所述氧化的靶标 (IV) 上的配体特异性结构域并且 (b) 所述复合物 (V) 的所述胺基团 ((CH₃)₂C=N-NH-) 被转化为其游离形式并允许共价结合所述氧化的碳水化合物靶标 (IV) 的条件下,使步骤 (ii) 的所述样品与步骤 (iii) 的复合物 (V) 接触,以获得包括共价结合配体和共价结合靶标的靶标-配体-试剂复合物 (VI),

v) 裂解步骤 (iv) 的所述样品使得膜嵌入的细胞表面蛋白以及所述复合物 (VI) 可用并且与基质 (VII) 反应,以获得基质结合复合物 (VIII),

vi) 通过使用亲和性基质 (VII) 从所述样品中富集所述复合物,以获得基质结合复合物 (VIII),

vii) 消化所述基质结合复合物 (VIII) 以获得 (a) 释放的肽 (IX) 和 (b) 结合在基质 (X) 上的糖肽,

viii) 从所述基质 (X) 中释放结合的糖肽以获得释放的糖肽 (XI),

ix) 分析并定量所述释放的肽 (IX)、(XI),以及

x) 鉴定所述配体与所述靶糖蛋白受体之间的所述相互作用。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述分析并定量所述释放的肽(IX)、(XI)是通过高质量精度质谱实现的。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述鉴定所述配体与所述靶糖蛋白受体之间的所述相互作用是通过与对照反应的定量比较实现的。

9. 根据权利要求5-8中的任一项所述的方法,其中,所述靶标(III)是在溶液中或是在细胞的表面上。

10. 根据权利要求6-8中的任一项所述的方法,

其中,在步骤(iv)中

- (a) 的反应条件是pH 6.5-7.4;温度是0-10°C;10-240min;

- 步骤(b) 的反应条件包括提供有效量的选自氨基苯甲酸类的组的催化剂,以及pH 6.5-7.4;

其中,在步骤(v)中,通过裂解细胞和膜从所述样品中释放双结合的靶标-配体-试剂复合物(VI)和随机糖蛋白-试剂复合物;

其中,在步骤(vi)中,使用蛋白质相容性缓冲液实现纯化,所述蛋白质相容性缓冲液包含1%十二烷基硫酸钠、8M尿素、20%乙腈、5M氯化钠、80%异丙醇、100mM碳酸氢钠,pH 11

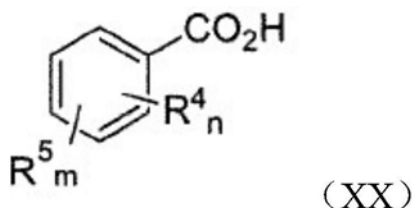


其中,

n代表1或2;m代表0、1或2;

R⁴代表NH₂;R⁵代表C(1-6)烷基或C(1-6)烷氧基。

11. 式(XX)的化合物在根据权利要求5至10中任一项所述的方法中,作为活细胞上生化反应中的催化剂的用途



其中,

n代表1或2;m代表0、1或2;

R⁴代表NH₂;R⁵代表C(1-6)烷基或C(1-6)烷氧基。

12. 一种试剂盒,包括根据权利要求1所述的式(Ic)的化合物。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括根据权利要求11所述的式(XX)的化合物。

三官能交联试剂

[0001] 本发明涉及三官能交联试剂、其产生方法以及其在用于检测、鉴定和表征配体与活细胞上以及生物流体 (biological fluid) 中的其相应糖蛋白靶受体之间的相互作用的方法中的用途, 该三官能交联试剂携带 (i) 用于与在靶糖蛋白受体上具有至少一个结合位点的目标配体缀合的配体反应性基团, (ii) 用于捕获氧化的或含醛受体-糖蛋白的胺基团和 (iii) 用于检测、分离和纯化所捕获的糖蛋白的亲合性基团。

[0002] 糖基化是最突出的蛋白修饰之一并且许多 (如果不是大部分的话) 由哺乳动物细胞产生的分泌性和膜结合的蛋白质包含共价连接的聚糖。在复杂生物体的装配中, 此类寡糖部分对于分泌的和细胞表面蛋白的折叠、亚细胞定位、周转 (turnover)、活性和相互作用起着多种结构和功能作用。

[0003] 分泌的糖蛋白包括例如细胞因子、激素、生长和分化因子、酶、神经肽、血管介导物 (vasomediators)、抗原识别分子、免疫调节分子、结构糖蛋白及其它生物活性分子。那些蛋白质在许多识别事件例如细胞与细胞信号转导、免疫应答、细胞凋亡、宿主-病原体相互作用以及许多疾病的发病机制中是重要的。由此, 此类糖蛋白对于某些靶受体的特异性在调节细胞与细胞的通讯中是关键性的。因此, 对分泌的糖蛋白与其靶标的配体结合相互作用的鉴定和表征对于生物信息传递的分子理解是关键性的。

[0004] 类似地, 配体例如蛋白质、肽、激素、化学分子、药物或毒素与细胞表面糖蛋白受体 (CSR) 的接合使得信息能够从细胞微环境传递至细胞内。尽管事实上该细胞表面信号转导途径 (signaling gateway) 对于细胞应答是至关重要的, 许多功能性配体的受体仍是未知的。这主要是由于疏水性膜受体蛋白质的鉴定方面的技术限制以及由于配体与其相应的 CSR 的瞬时低亲和性相互作用。因此, 许多信号转导蛋白 (signaling protein) 和分子仍然是不具有已知主要分子靶标的孤儿 (orphan) 配体-对于关于信号转导、药物作用、脱靶效应或疾病相关信号转导网络的相应机制的详细分子理解, 目前缺少宝贵的信息。

[0005] EP2670755 公开了特定三官能交联试剂以及鉴定 (孤儿) 配体和糖蛋白靶受体之间的相互作用的方法。尽管该文公开的化合物和 workflows 适合于成功鉴定配体-受体相互作用, 但是化合物以及相关的样品处理 workflows 具有某些约束: 第一, 该文公开的方法受限于 pH 6.5 或甚至更加酸性。如果 pH 不是生理性的, 则在配体-受体相互作用受损的情况下, 这可能是有问题的。第二, 靶受体的鉴定完全基于靶标的 N-糖基化肽。接收关于糖蛋白靶受体的未糖基化肽的信息还能够鉴定未被 N-糖基化的其它靶受体; 它将提供关于靶受体的精确蛋白质形式 (proteoform) 的信息, 并且总体上能够更可靠的定量靶受体候选物。

[0006] 这凸显了对确定配体与靶糖蛋白受体之间相互作用的改进方法的需要, 以及提供适合这些方法的新型化合物的需要。

[0007] 本发明主要通过如本发明所限定的化合物以及如本发明所限定的方法很大程度上克服了上文所述的限制。在说明书和独立权利要求中公开了本发明的另一些方面, 在说明书和从属权利要求中公开了优选实施方式。

[0008] 下面将更详细的描述本发明。应该理解, 本说明书中提供/公开的各种实施方式、优选和范围可以任意组合。另外, 取决于具体实施方式, 选定的定义、实施方式或范围可能

不适用。

[0009] 在第一方面,本发明涉及本发明涉及式(I)的三官能交联试剂。

[0010] 在第二方面,本发明涉及本发明的交联试剂用于表征和分析配体-靶糖蛋白受体相互作用的用途。

[0011] 在第三方面,本发明涉及鉴定配体与样品中具有至少一个碳水化合物残基的靶糖蛋白受体之间特定相互作用的方法。

[0012] 在第四方面,本发明涉及特定有机化合物在活细胞生化反应中作为无毒催化剂的用途,尤其在本文所述的方法中(第三方面)。

[0013] 在第五方面,本发明涉及包括本文所述的交联试剂(第一方面)以及本文所述的任选地有机化合物(第四方面)的试剂盒。

[0014] 为了更详细的理解,本发明在以下附图中可视化。

[0015] 图1:提供了细胞表面靶糖蛋白受体的基于配体的受体捕获(LRC-)工作流程的示意图。该图具体说明了本发明的各方面以及尤其是在本发明的第三方面中概述的步骤。在该图中,化学实体(I)至(XX)和方法步骤(i)至(xi)被示意性示出;左:工作流程;右:对照实验。该图概述了本发明的在A=叠氮基的情况下的实施方式。

[0016] 图2:示出了在pH 7.4时用模型配体表皮生长因子(EGF)进行基于配体的受体捕获的相对定量评估。用EGF-HATRIC缀合物在H358支气管细胞系上进行受体捕获。该绘图示出了y轴上的负log₂变换的假发现率(FDR)调整的p值与x轴上EGF/对照比率的log₂变换的倍数变化。在整个两种条件下量化的所有蛋白质都显示为点。糖蛋白靶受体候选物被限定为具有小于或等于0.001的FDR调节的p值和四倍或更大的富集因子的受体。左上角限定了对照中的糖蛋白靶受体候选物,而右上框限定了目标配体的糖蛋白靶受体候选物,即EGF。鉴定的糖蛋白靶受体候选物显示为黑点。已知的糖蛋白靶受体表皮生长因子受体(EGFR)在右上方靶框中被鉴定为EGF的靶受体。

[0017] 图3:提供了替代的LRC-工作流程的示意图,并且为图1补充了A=炔烃时的实施方式。

[0018] 除非另外定义,否则在整个说明书中使用下列定义:

[0019] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则如本文中所示,本发明(尤其是权利要求的上下文中)的上下文中使用的术语“一个,”“一种,”“所述(the)”和相似的术语应被解释为涵盖单数和复数两者。术语“多个”是指两个或更多个的数目。

[0020] 如本文中所示,术语“包括(including)”、“包含(containing)”以及“包括(comprising)”在本文中使用时开放的、非限制性意义。

[0021] 术语“三官能”意指“携带三官能团”。因此,三官能(交联)试剂是指具有三官能团的(交联)试剂。术语“异三官能”意指“携带三种不同的官能团”。

[0022] 如本文中所示,术语“烷基”是指包含1-24,优选1至12个碳原子的直链或支链烃。烷基基团的实例包括但不限于,甲基、乙基、正-丙基、异-丙基、正-丁基、异-丁基以及叔-丁基、戊基、己基。术语“烷氧基”是指-O-烷基基团。

[0023] 如本文中所示,术语“亚烷基”,也称为“烷二基”是指来源于烃的二价基,例如-CHR-(CHR)_n-,其中R为H或所选的取代基。通常,亚烷基基团将具有1至24个碳原子(即n=24),优选10至24个碳原子。如本文中所示,术语“杂亚烷基”是指具有一个或多个插入烷基

内的杂原子例如O、N或S,优选O或N的亚烷基。

[0024] 术语“环烷基”是指具有3至12个碳的饱和的和部分不饱和的环状烃基。环烷基基团的实例包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基以及环辛基。

[0025] 术语“杂环烷基”是指具有一个或多个杂原子(诸如O、N或S)的非芳香族5-8元单环、8-12元双环或11-14元三环系统。杂环烷基的实例包括但不限于,哌嗪基、吡咯烷基、二氧杂环己基(dioxanyl)、吗啉基以及四氢呋喃基、葡糖基。

[0026] 如本文中所用,术语“芳基”是指6碳单环、10碳双环、14碳三环芳香环系统,其中每个环都可以未被取代,或具有1至4个取代基。芳基基团的实例包括但不限于,苯基、萘基和蒽基。亚苯基,如本发明的上下文中所用,优选是指1,2-、1,3-或1,4-亚苯基基团,其任选地被取代。

[0027] 术语“杂芳基”是指具有一个或多个杂原子(诸如O、N或S)的芳香族5-8元单环、8-12元双环或11-14元三环系统。杂芳基基团的实例包括吡啶基、呋喃基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、噻吩基、喹啉基、吲哚基以及噻唑基。吡啶基包括2-吡啶基、3-吡啶基和4-吡啶基,优选2-吡啶基。术语“杂芳烷基”是指被杂芳基基团取代的烷基基团。

[0028] 如本文中所述的,术语“任选取代的”包括未取代的和取代的。这些任选的取代基优选地选自自由Hal、-OR、-CN、-NO₂、-COOR、C(1-8)烷基、C(1-8)亚烷基、以及C(1-8)烷氧基组成的组中,其中R是1至8个碳原子。

[0029] 另外,基团环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基可以是由1至4个取代基任选取代的。取代基的实例包括但不限于,至少一个卤素、羟基、氨基、氰基、硝基、巯基、羧基或选自具有一至六个碳原子的烷基、烯基、烷氨基、二烷氨基或烷氧基基团的烃基基团。

[0030] 示例性的烃基取代的环烷基基团包括2-甲基环丙基、2-乙基环丙基、2-甲基环丁基、3-甲基环丁基、2-甲基环戊基、2,3-二甲基环戊基、3-异丙基环戊基、2,6-二甲基环己基、4-(叔丁基)环己基、2-乙烯基环己基、3-烯丙基环戊基、3,4-二烯丙基环戊基、1-(4-吡啶基)哌啶基、1-(4-吡啶基甲基)哌啶基、4-(4-吡啶基)哌啶基、4-(4-吡啶基)哌嗪-1-基和二环己基基团。

[0031] 示例性的烃基取代的环烯基基团包括3-甲基-3-环戊烯-1-基、3,4-二甲基-3-环戊烯-1-基、2-异丙基-2-环戊烯-1-基、2,3-二乙基-2-环戊烯-1-基、4-乙烯基-1-环己烯-1-基、3,4-二乙基-3-环戊烯-1-基和3,4-二烯丙基-3-环戊烯-1-基基团。

[0032] 示例性的烃基取代的芳基基团包括甲苯基、均三甲苯基、二甲苯基、异丙苯基、伞花基、3,5-二(叔丁基)苯基、2-甲基萘基、2-乙烯基苯基、2-乙烯基苄基、2-乙烯基萘基、4-环己基苯基、联苯基、4-(4-哌啶基)吡啶基和对三联苯基基团。

[0033] 示例性的烃基取代的杂芳基基团包括2-甲基吡啶-1-基、2-乙基吡啶-1-基、3-乙烯基咪唑-1-基、2-甲基咪唑-1-基、2-甲基喹啉-1-基、1-烯丙基苯并三唑基、2,2'-二吡啶基、4,4'-二吡啶基、4-甲基吡嗪基、4-(吡啶基甲基)-吡啶基、4-苄基吡嗪基、烟酰胺基、2-甲基呋喃基、5-甲基糠基氨基、2-甲基噻吩基、4-甲基噁唑基、2,5-二苯基-4-甲基噁唑基和4-甲基噻唑基基团。

[0034] 术语“卤素”是指氯、氟、溴或碘取代基,优选氯或氟取代基。

[0035] 术语“(相互作用的)结合”或“相互作用”是指显示相互的亲合力或结合能力的一

对相应分子(例如,配体/靶糖蛋白受体)之间的任何类型的相互作用缔合。相互作用缔合可发生在例如显示相互的反应性的一对相应的化学反应性基团(供体/受体,酸/碱等)之间。示例性的结合事件包括但不限于,疏水性相互作用、亲水性相互作用、氢键、范德华力、离子相互作用、非离子相互作用、静电相互作用、共价键等。应当理解,取决于结合事件的性质,相互作用可以为不同的水平,即瞬时的或永久性的、弱或强的结合。

[0036] 如本文中所示,术语“糖蛋白”(或“糖肽”)是指包含一个或多个共价连接的碳水化合物或寡糖基团的蛋白质(或肽)。碳水化合物基团通常通过通常是天冬酰胺氨基酸的胺基侧链基团(以产生N-连接的碳水化合物)或通过通常是丝氨酸或苏氨酸的羟基侧链基团(以产生O-连接的碳水化合物)或通过通常是色氨酸残基的吲哚基侧链基团(以产生C-连接的碳水化合物)连接。氧化的糖蛋白或糖肽是指下述糖蛋白或糖肽,其已经用适当的氧化剂进行处理,从而切割连接的碳水化合物的邻位二醇部分,以产生醛基。碳水化合物的这种氧化(以产生二醛碳水化合物)可按照常规过程(例如使用高碘酸或高碘酸盐、铅(IV)盐或高锰酸盐,优选(偏)高碘酸钠)来进行。替换地,化学途径可利用细胞的代谢标记,其使用携带生物正交基团(例如叠氮基、炔、酮或醛)的聚糖前体的类似物以在糖蛋白受体上产生用于交联试剂的连接位点(Current opinion in chemical biology(2007)第11卷(1)pp.52-8)。

[0037] 如本文中所述,术语“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”具有相同的含义并且是指具有任何长度的氨基酸聚合物(通常肽被称作蛋白质的片段)。该聚合物可以是直链、支链或环状链。氨基酸可以是天然存在或非天然存在的氨基酸,或变体氨基酸。关于多肽或多核苷酸的术语“片段”是指相对于参照多肽或多核苷酸的全长(具有长度n)具有范围为1至n-1的序列长度的多肽或多核苷酸。取决于目的,片段的长度可适当地改变。

[0038] 对于本发明,糖蛋白可以是天然存在的糖蛋白,或可替代地具有合成工程化的序列(前提是工程化的糖蛋白包含用作糖基化位点的至少一个肽序列)。糖蛋白可以是细胞内糖蛋白、细胞表面糖蛋白(即结合至细胞表面的糖蛋白)或溶液中的糖蛋白(即被分泌至培养基中的糖蛋白)。

[0039] 用于本发明的方法的糖蛋白可以是具有吸引人的或有用的生物或化学活性的任何药学上或商业上相关的糖蛋白,诸如受体、抗体、酶、激素、调节因子、抗原、结合剂等。可用于本发明的方法的糖蛋白的下列列表仅仅是示例性的,而无意是限定性的叙述。本领域技术人员将理解,任何糖蛋白都可用于本方法,并且将能够基于他的或她的特定需要选择特定的糖蛋白。

[0040] 术语“靶糖蛋白受体”或“糖蛋白受体”,也显示为本文中(III),是指一种或多种特定种类的配体或信号转导分子可与其结合的糖蛋白。这种(靶)糖蛋白受体可存在于生物流体中或存在于来源于任何受试者(优选哺乳动物受试者,例如人或动物)的细胞上。因此,当与术语“细胞表面”(即细胞表面糖蛋白受体)组合使用时,其是指与细胞的质膜缔合的,并且有时会有至少一种氨基酸暴露于细胞外空间,一种或多种特定种类的配体或信号转导分子可与其结合的糖蛋白。当与术语“氧化的”组合使用时,其是指其碳水化合物部分已通过适当的氧化处理被氧化以形成醛基基团或通过代谢标记引入醛基基团的糖蛋白。

[0041] 糖蛋白受体包括任何细胞表面受体或任何分泌的受体,诸如那些在Varki,A.等人的Essentials of Glycobiology,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2009和www.uniprot.org中公开的那些。糖蛋白受体的非限制性实例包括例如包括成纤维细胞生

长因子受体1 (FGFR1) (Swiss-Prot登录号:Q9QZM7、Q99AW7、Q9UD50、Q63827)、成纤维细胞生长因子受体2 (FGFR2) (Swiss-Prot登录号:Q96KM2、P21802、Q63241)、成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR3) (Swiss-Prot登录号:Q95M13、AF487554、Q99052)、成纤维细胞生长因子受体4 (FGFR4) (Swiss-Prot登录号:Q91742)、神经营养因子酪氨酸激酶2型 (NTRKT-2) (Swiss-Prot登录号:Q8WXJ5)、白细胞抗原相关蛋白-酪氨酸磷酸酶 (LAR-PTPRF) (Swiss-Prot登录号:Q9EQ17、Q64605、Q64604、Q9QW67、Q9VIS8P10586)、去氧肾上腺素 (Swiss-Prot登录号:Q925S5、Q9JIX2、Q9ET59、Q9R044、Q9QZS7、Q06500)、蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体S型 (PTPRS) (Swiss-Prot登录号:Q64699、Q13332、075870)、蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体 κ 型 (R-PTP-kappa) (Swiss-Prot登录号:Q15262)、蛋白质-酪氨酸磷酸酶受体D型 (PTPRD) (Swiss-Prot登录号:QBWX65、Q9IAJ1、P23468、Q64487)、肝配蛋白A型受体8 (EPHA8/酪氨酸-蛋白激酶受体EEK) (Swiss-Prot登录号:009127、P29322)、肝配蛋白A型受体3 (EPHA8/酪氨酸-蛋白激酶受体ETK-1/GEK4) (Swiss-Prot登录号:P29318)、肝配蛋白A型受体2 (Swiss-Prot登录号:Q8N3Z2)、胰岛素受体 (IR) (Swiss-Prot登录号:Q9PWN6)、胰岛素样生长因子-1受体 (IGF-1) (Swiss-Prot登录号:Q9QVW4、P08069、P24062、Q60751、P15127、P15208)、胰岛素相关受体 (IRR) (Swiss-Prot登录号:P14616)、酪氨酸蛋白激酶受体Tie-1 (Swiss-Prot登录号:06805、P35590、Q06806)、Roundabout受体-1 (robo-1) (Swiss-Prot登录号:044924、AF041082、Q9Y6N7)、神经元烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha 3$ 亚基 (CHRNA3) (Swiss-Prot登录号:Q8VHH6、P04757、Q8R4G9、P32297)、神经元乙酰胆碱受体 $\alpha 6$ 亚基 (Swiss-Prot登录号:Q15825、Q9R0W9)、血小板衍生生长因子受体 β (PDGFRB) (Swiss-Prot登录号:Q8R406、Q05030)、白细胞介素-6受体 (IL-6R) (Swiss-Prot登录号:Q00560)、白细胞介素-23受体 (IL-23R) (Swiss-Prot登录号:AF461422)、IL-3、IL5和GmCsf的 β -共同细胞因子受体 (Swiss-Prot登录号:P32927)、细胞因子受体样分子3 (CRLF1) (Swiss-Prot登录号:Q9JM58)、I类细胞因子受体 (ZCYTOR5) (Swiss-Prot登录号:Q9UHH5)、神经生长因子-1受体 DCC (Swiss-Prot登录号:P43146)、白细胞Fc受体样蛋白质 (IFGP2) (Swiss-Prot登录号:Q96PJ6、Q96KM2)、巨噬细胞消除受体2 (MSR2) (Swiss-Prot登录号:Q91YK7) 或粒细胞集落刺激因子受体 (G-CSF-R) (Swiss-Prot登录号:Q99062), 或其片段或变体。

[0042] 在其它实施方式中,糖蛋白受体选自蛋白聚糖的组。更优选地,该蛋白聚糖选自包括硫酸肝素蛋白聚糖的组。在最优选的实施方式中,所述蛋白聚糖是基底膜聚糖 (perlecan) (Swiss-Prot登录号:P98160), 或其片段或变体。

[0043] 在其它的实施方式中,该糖蛋白受体是选自膜锚定细胞表面酶的组的受体。例如,细胞表面受体选自包括金属蛋白酶的溶加压素 (pitrilysin) 家族或去整合素和金属蛋白酶 (ADAM) 的家族的组,其包括ADAM-8 (Swiss-Prot登录号:Q05910)、ADAM-19 (Swiss-Prot登录号:Q9H013、035674)、ADAM-8 (Swiss-Prot登录号:P78325)、ADAM-12 (Swiss-Prot登录号:043184、Q61824)、ADAM-28 (Swiss-Prot登录号:Q9JLN6、Q61824、Q9XSL6、Q9UKQ2)、ADAM-33 前体 (Swiss-Prot登录号:Q8R533、Q923W9)、ADAM-9 (Swiss-Prot登录号:Q13433、Q61072)、ADAM-7 (Swiss-Prot登录号:Q9H2U9、035227、Q63180)、ADAM-1A致育素 α (Swiss-Prot登录号:Q8R533)、ADAM-15 (Swiss-Prot登录号:Q9QYV0、088839、Q13444)、含金属蛋白酶-去整合素结构域的蛋白质 (TECAM) (Swiss-Prot登录号:AF163291)、金属蛋白酶1 (Swiss-Prot登录号:095204、Q9BSI6), 或其片段或变体。

[0044] 在一些实施方式中,糖蛋白受体可以是酶诸如例如水解酶、转移酶、异构酶、裂解酶、连接酶、转移酶和氧化还原酶。水解酶的实例包括脂酶、胆碱酯酶、碱性磷酸酶、 β -淀粉酶、脱氧核糖核酸酶、葡糖淀粉酶A和B、 α -半乳糖苷酶I和II、 β -呋喃果糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酐酶、N-乙酰基- β -氨基葡萄糖苷酶、透明质酸酶、催产素酶、激肽释放酶、菠萝蛋白酶、肠激酶、蛋白酶a、b和c、胃蛋白酶原和胃蛋白酶。氧化还原酶的实例包括葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和氯化物过氧化物酶。转移酶的实例包括 γ -谷氨酰转肽酶和核糖核酸酶。本领域技术人员将知晓可根据本发明的方法使用的酶的其它已知的实例。

[0045] 在另一些实施方式中,糖蛋白受体可以是生长因子或其它信号转导分子。生长因子通常是由细胞分泌的并且结合以及激活其它细胞上的受体、在受体细胞中引发代谢或发育变化的糖蛋白。哺乳动物生长因子和其它信号转导分子的非限制性实例包括细胞因子;表皮生长因子(EGF);血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子(FGF),诸如FGF-5;胰岛素样生长因子I和II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白诸如CD-3、CD-4、CD-8和CD-19;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素例如干扰素- α 、 β 和 γ ;集落刺激因子(CSF)诸如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;大多数白细胞介素;肿瘤坏死因子(TNF) β ;滤泡刺激激素;降钙素;黄体激素;抗凝因子例如蛋白C;心房利钠因子(atrial natriuretic factor);肺表面活性物质(lung surfactant);纤溶酶原激活剂诸如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);造生长因子;和脑啡肽酶。本领域技术人员将知晓可根据本发明的方法使用的其它生长因子或信号转导分子。

[0046] 在其它实施方式中,糖蛋白受体可以是质膜转运蛋白。质膜转运蛋白通常是通过质膜的脂质双层介导溶质转运的糖蛋白,诸如例如通过通道、溶质载体超家族、活性转运蛋白,辅助转运蛋白质或其它转运蛋白。通道的实例包括钠通道亚基 β -1(Swiss-Prot登录号:Q07699)。溶质载体超家族的实例包括溶质载体家族2、易化葡萄糖转运蛋白成员1(Swiss-Prot登录号:P11166)、溶质载体家族22成员1(Swiss-Prot登录号:O15245)以及溶质载体家族22成员6(Swiss-Prot登录号:Q4U2R8)。主动转运蛋白的实例包括钠/钾-转运ATP酶亚基 α -2(Swiss-Prot登录号:P50993)。本领域技术人员将知晓可根据本发明的方法使用的质膜转运蛋白的其它已知的实例。

[0047] 术语“配体”,也显示为本文中(II),特异于广泛用于本发明的上下文中的特定靶糖蛋白受体。具体而言,该术语是指能够与靶糖蛋白受体相互作用或结合的任何化合物,其中靶糖蛋白受体是膜结合的并且位于细胞表面上,或以分泌的形式存在。每种靶糖蛋白受体可具有一个或多个特异性配体结合位点,该结合位点对于不同的配体可以是相同的或不同的或交叠的,并且是发生配体结合的完整靶糖蛋白受体内的特异性肽结构域(即蛋白质的特异性部分)。配体与肽结构域之间的识别可以是由于配体或靶糖蛋白受体的序列特异性、三维结构或翻译后修饰。配体的实例包括但不限于,肽(包括糖肽)、多肽、蛋白质(包括糖蛋白或磷蛋白)、碳水化合物、糖脂、磷脂、寡核苷酸、多核苷酸、适体、维生素、抗原及其片段、半抗原、受体激动剂、部分激动剂、混合激动剂、拮抗剂、药物、趋化因子、激素(例如LH、FSH、TRH、TSH、ACTH、CRH、PRH、MRH、MSH、胰高血糖素和催乳素;转铁蛋白;乳铁蛋白;血管紧张素;组胺;胰岛素;凝集素)、递质、自分泌物、成长因子(例如PDGF、VEGF、EGF、TGF α 、TGF β 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、FGF、IGF、铃蟾肽、促血小板生成素、红细胞生成素、制瘤素和内皮素1)、

细胞因子包括白细胞介素(例如白细胞介素1至15)、淋巴因子和细胞信号分子例如肿瘤坏死因子(例如肿瘤坏死因子 α 和 β)和干扰素(例如干扰素 α 、 β 和 γ)、辅基、辅酶、辅因子、调节因子或可特异性结合受体的任何其它天然存在的或合成的有机分子,包括保持相同结合性质的其片段、类似物和其它衍生物。特异于特定细胞表面靶糖蛋白受体的配体可靶向广泛的细胞类型或特定的细胞类型。

[0048] 在一些实施方式中,配体选自包括肽、碳水化合物、脂类或核苷酸的组。术语核苷酸包括天然核苷酸、核苷酸类似物、核苷酸衍生物、二核苷酸、寡核苷酸或多核苷酸或包含核苷酸的物质。核苷酸类似物被定义为包括核苷酸碱基或经修饰的核苷酸碱基、糖残基或经修饰的糖残基以及单、二、三、四或五酯基团的分子。如果使用例如蛋白质的片段,即肽,其可具有任何适当的长度。应当理解,肽的(最小)长度和组成,即氨基酸的数目和类型,由结合相互作用的性质决定。肽通常可包括例如3-100个氨基酸残基。

[0049] 在一些实施方式中,配体可以是抗体。抗体是具有添加到一些它的氨基酸残基的寡糖的重链($\sim 150\text{kDa}$)球状血浆蛋白。它们具有与特定抗原特异性结合的能力。鉴于目前作为药物或其它商业剂使用的或处于研究的大量抗体,根据本发明的方法进行的与特定配体的结合相互作用的分析是特别吸引人的。在一些实施方式中,抗体可以是单克隆抗体诸如治疗性抗体曲妥珠单抗(Trastuzumab)和贝伐珠单抗(Bevacizumab)。在一些实施方式中,单克隆抗体是人源化抗体。在其它实施方式中,抗体可以是多克隆抗体。

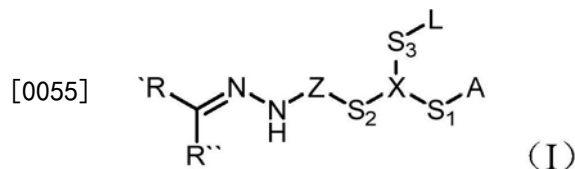
[0050] 在一些实施方式中,可采用工程化亲和结合剂诸如锚蛋白重复结合剂、通过噬菌体展示产生的亲和结合剂、或者寡核苷酸或肽适体。

[0051] 在一些实施方式中,配体可以是糖蛋白诸如上文中提及的糖蛋白受体。在一些实施方式中,配体可以是细胞表面蛋白(诸如上文中提及的细胞表面糖蛋白受体)的结构域。

[0052] 在一些实施方式中,配体可以是微生物或病毒。

[0053] 根据本发明,配体与其靶糖蛋白受体通过其结合位点相互作用,该结合位点是靶糖蛋白受体的特定肽片段,诸如被称作结合位点的靶糖蛋白受体的该片段的特定氨基酸序列或三维结构。关于配体与其(细胞表面或分泌的)靶糖蛋白受体结合位点的结合的术语“相互作用(interact)”或“相互作用(interaction)”包括(细胞表面或分泌的)靶糖蛋白受体与配体之间的瞬时或永久性直接或间接接触,并且可通过其结合亲和力,即其解离平衡常数 K_d 来表征。配体对于其靶糖蛋白受体的典型结合亲和力可以为至少 10^{-5}M ,优选 10^{-7}M 以及更大,例如,约 10^{-8}M 至约 10^{-12}M 。本发明的方法允许检测(细胞表面或分泌的)靶糖蛋白受体与配体之间的典型的结合亲和力以及较低亲和力相互作用,其通过具有例如小于 10^{-5}M 的值的 K_d 表征。

[0054] 因此在第一方面中,本发明涉及三官能交联试剂。这些试剂由式(I)表示



[0056] 其中

[0057] X代表核心结构;

[0058] S_1 、 S_2 、 S_3 彼此独立地代表间隔基团;

[0059] L代表配体反应性基团；

[0060] A代表亲和性基团；

[0061] Z代表芳基或杂芳基；

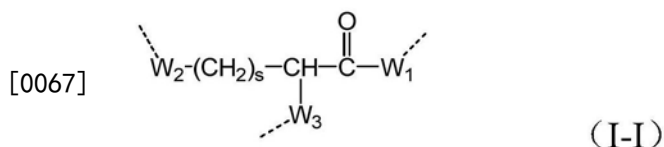
[0062] R'代表H或烷基基团且R''代表烷基基团,或者R'、R''一起代表链烷二基以形成环烷基基团。

[0063] 式(I)的这些三官能交联试剂显示了有益效果,并且特别适于直接定量质谱工作流程以用于无偏检测配体与靶蛋白受体的相互作用,包括活细胞上的质膜糖蛋白(特别是在没有遗传操作的其天然相互作用微环境中)或分泌的糖蛋白。还可以发现这些三官能交联试剂在分析生物流体方面的应用。

[0064] 以下将进一步详细解释本发明的第一方面,即式(I)的化合物。

[0065] 核心结构X:从上文可以明显看出,本发明的化合物(I)具有携带三个分支的核心结构X,其中每个分支包扩不同的官能团(并且因此该交联试剂还可以被称为异三官能的)。第一分支包扩能够与经氧化的糖蛋白反应的脞基团(R''R'C=N-NH-)。第二分支包扩可缀合至所选配体的配体反应性基团。第三分支包含用于由第一和第二官能团捕获的蛋白质的纯化目的(优选亲和纯化目的)的亲和性基团。此类试剂特别吸引人,因为这三种不同的官能团在一个分子中的组合是独特的并且发现可用于各种生物医学应用,诸如配体(II)与靶糖蛋白受体(III)之间的相互作用的检测和表征。核心结构X可以是允许在由间隔基团S₁、S₂、S₃和官能团亲和性基团,L以及脞基团组成的3个分支上建立的任何结构。因此,核心结构优选携带本文所限定的三个反应性官能基团。一般而言,设计核心结构和间隔基团使得三个分支之间(且因此在三个官能团-L、-亲和性基团和脞基团之间)的位阻可被忽略或不存在。

[0066] 在一种实施方式中,核心结构X可以是取代的烃,诸如取代的烷基基团,例如三或四取代的碳原子,例如α氨基酸H₂N-CHR_{AA}-COOH(其中R_{AA}是氨基酸侧链)的α碳。因此,X可以是具有含有反应性基团的侧链R_{AA}的天然或非天然氨基酸。天然氨基酸的实例包括例如,赖氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸等。非天然氨基酸的实例包括例如相应的D-氨基酸、高丝氨酸等)。在这些实施方式中,可将三个间隔基团S₁、S₂、S₃连接至氨基基团和羧基基团以及反应性侧链基团R_{AA}。在有利的实施方式中,X可以是式(I-I)的基团



[0068] 其中虚线代表W₁、W₂、W₃至基团S₁、S₂、S₃的连接,

[0069] W₁代表-NH-、-O-、-S-;

[0070] W₂代表-COO-、-OOC-、-CONH-、-NHCO-、-NH-、-O-、-S-;

[0071] W₃代表-COO-、-OOC-、-CONH-、-NHCO-、-NH-、-O-、-S-;

[0072] s代表1至12的整数。

[0073] 应当理解,可将式IV的组中的三个官能团的任一个偶联至三个连接基团S₁、S₂、S₃中的任一个。在有利的实施方式中,将W₁偶联至S₁,将W₂偶联至S₂,将W₃偶联至S₃。

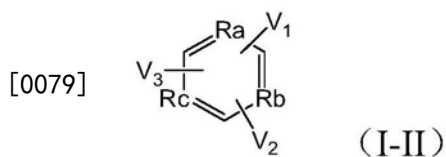
[0074] 有利地,W₁代表-NH-。

[0075] 有利地,W₂代表-CONH-。

[0076] 有利地, W_3 代表-NHCO-。

[0077] 有利地, s 代表4。

[0078] 在另一个实施方式中, 核心结构X可以是取代的芳基或杂芳基基团, 其至少是三取代的, 优选为式 (I-II) 的三官能6元芳基或杂芳基基团



[0080] 其中 V_1 、 V_2 、 V_3 彼此独立是官能团诸如羧基、胺、羟基、巯基并且 R_a 、 R_b 、 R_c 彼此独立地是O或N。

[0081] 在又一个实施方式中, 核心结构X可来源于线性或环状甘油或糖部分。可获得具有选择性(且特别是可移除的)保护基团的多种糖, 其可被用于制备本文所描述的三官能交联试剂。

[0082] 本领域技术人员将知晓, 多种其它的核心结构X可以为间隔基团和官能团提供所需的支架。

[0083] 官能团L: 三官能交联试剂(I)的该官能团是配体反应性基团, 诸如反应性官能团或活化的官能团。该基团为将间隔基团耦接至选定的配体(II)而服务, 并因此将三官能交联试剂指向特异性靶糖蛋白受体(III)。反应性官能团或活化的官能团能够与存在于配体上的其反应性对应基团反应。

[0084] 如本文中所示, 术语“反应性官能团”是指未被保护的游离官能团(除非另有所指)。在具体的实施方式中, 反应性官能团选自自由-COOH、-NH₂、-OH、-SH、-CH=CH-以及-CH=CH-COOH组成的组。

[0085] 用于活化反应性官能团的活化试剂的实例包括但不限于, 1-羟基苯并三唑(HOBT)、3-羟基-3,4-二氢-1,2,3-苯并三唑-4-酮(HOObt)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDAC)、2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HATU)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HBTU)、3,4-二氢-1,2,3-苯并三唑-4-酮-3-氧基四甲基脒鎓六氟磷酸酯(HDTU)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、苯并三唑-1-基氧基三(吡咯烷基)-磷鎓六氟磷酸盐(PyBop)、磷酸(3,4-二氢-1,2,3-苯并三唑-4-酮-3-氧基)二乙酯(DEPBt)、3,4-二氢-1,2,3-苯并三唑-4-酮-3-氧基三-吡咯烷基)-磷鎓六氟磷酸盐(PDOP)、2-(苯并三唑-1-基氧基)-1,3-二甲基-2-吡咯烷基-1-基-1,3,2-二氮杂磷啶鎓(diazaphosph-olidinium)六氟磷酸盐(BOMP)、5-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)-3,4-二氢-1-甲基-2H-吡咯鎓六氟磷酸盐(AOMP)、(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三(二甲氨基)磷鎓六氟磷酸盐(AOP)、5-(1H-苯并三唑-1-基)-3,4-二氢-1-甲基-2H-吡咯鎓六氟磷酸盐:N-氧化物(BDMP)、2-溴-3-乙基-4-甲基噻唑鎓四氟硼酸盐(BEMT)、2-溴-1-乙基吡啶鎓四氟硼酸盐(BEP)、2-溴-1-乙基吡啶鎓六氟磷酸盐(BEPH)、N-(1H-苯并三唑-1-基亚甲基)-N-甲基甲铵六氟磷酸盐N-氧化物(BOMI)、N,N'-双(2-氧代-3-噁唑烷基)次膦酰氯(BOP-C1)、1-(1H-苯并三唑-1-基氧基)苯基亚甲基吡咯鎓六氟磷酸盐(BPMP)、1,1,3,3-双(四亚甲基)氟代脒鎓六氟磷酸盐(BTFFH)、氯(4-吗啉基)亚甲基吗啉鎓

六氟磷酸盐 (CMMM)、2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑鎓六氟磷酸盐 (CMBI)、2-氟-1-乙基吡啶鎓四氟硼酸盐 (FEP)、2-氟-1-乙基吡啶鎓六氟磷酸盐 (FEPH)、1-(1-吡咯烷基-1H-1,2,3-三唑[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基)吡咯烷鎓六氟磷酸盐N-氧化物 (HAPyU)、0-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-双(五亚甲基)脲鎓六氟磷酸盐 (HBPIP)、0-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-双(四亚甲基)脲鎓六氟磷酸盐 (HBPYU)、(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基氧)三(吡咯烷)鎓六氟磷酸盐 (PYAOP)、溴三吡咯烷基鎓六氟磷酸盐 (PYBROp)、氯三吡咯烷基鎓六氟磷酸盐 (PYCLOP)、1,1,3,3-双(四亚甲基)氯脲鎓六氟磷酸盐 (PYCLU)、四甲基氟代甲脒鎓六氟磷酸盐 (TFFH)、三光气、基于三嗪的试剂[氰尿酸氯、氰尿酸氟、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓盐酸盐 (DMT-MM)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (CDMT)]、双(2-氯苯基)磷酸氯、磷酸氯酸二苯酯、叠氮磷酸二苯酯 (DPPA) 及其任何组合。

[0086] 如本文中所示,术语“活化的官能团”是指已使用偶联剂通过标准化学技术活化以获得相应活化的官能团的反应性官能团。

[0087] 可按照它们的特定反应性将活化的官能团分为亚组。因此,在具体的实施方式中,活化的官能团选自自由胺反应性基团、羟基反应性基团、巯基反应性基团、醛基或酮基反应性基团以及羧基反应性基团组成的组。

[0088] “胺反应性基团”是与(伯或仲)胺反应的活化的官能团。典型的胺反应性基团包括芳基或烷基活化的羧酸酯-COOR,诸如N-羟基琥珀酰亚胺酯或其衍生物(例如磺基-N-琥珀酰亚胺酯)、酚酸酯或其衍生物(例如其中R是苯酚、对-硝基酚、四氟酚)。其它胺反应性基团包括酰氯(-COCl)、芳基和烷基亚氨酸酯(-C(NH)OMe)以及烷基或芳基异氰酸酯(-NCO)或异硫氰酸酯(-NCS)。

[0089] “羟基反应性基团”是与羟基反应的活化的官能团。典型的羟基反应性基团包括例如烷基或芳基异氰酸酯-NCO,以及芳基或烷基活化的羧酸酯-COOR。

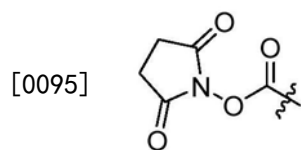
[0090] “巯基反应性基团”是与巯基反应的活化的官能团。典型的巯基反应性基团包括例如马来酰亚胺或 α -卤酰胺(-NH-CO-CH₂-Hal)。

[0091] “醛基或酮基反应性基团”是与(伯或仲)醛或酮反应的活化的官能团。典型的醛基或酮基反应性基团包括例如芳基或烷基肼(-NHNH₂)、芳基或烷基酰肼(-CO-NHNH₂)、烷基或芳基羟胺(-ONH₂)。

[0092] “羧基反应性基团”是与羧酸基反应的活化的官能团。典型的羧基反应性基团包括例如卤素、烷基或芳基磺酸酯、羟基、环氧基(epoxy)、巯基、氨基、异氰酸和碳二亚胺基团。

[0093] 应当理解,配体反应性基团和存在于配体上的反应性基团的许多对是可行的,并且本领域技术人员将知晓选择哪个配体反应性基团来与所选的配体偶联。

[0094] 在有利的实施方式中,L是活化的官能团,其选自自由胺反应性基团、羟基反应性基团、巯基反应性基团、醛基或酮基反应性基团组成的组,优选胺反应性基团组成的组。特别优选的是芳基或烷基活化的羧酸酯-COOR,诸如下式的N-羟基琥珀酰亚胺酯



[0096] 在另一个有利的实施方式中,反应性官能团L选自自由-COOH、-NH₂、-OH、-SH、-CH=

CH-以及-CH=CH-COOH组成的组。

[0097] 间隔基团:如上文中显示的,可选择三种间隔基团而使得空间位阻最小化而不损害三种官能团的反应性。携带胺基团和配体反应性基团L的连接基团 S_2 和/或 S_3 的改变将允许扫描结合位点的附近和捕获可能位于目标靶受体蛋白本身上或最终甚至位于相邻分子上的不同的碳水化合物结构。

[0098] 如本文中所示,术语“间隔基”通常是单键或直链或支链的、取代的或未取代的C(1-24)亚烷基,其中一个或多个(优选非相邻的)- CH_2 -基团可彼此独立地被一个或多个桥连基团和/或未取代的或取代的环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基替代;前提是杂原子(诸如O和N)相互不直接连接。桥连基团可替代亚烷基链内的- CH_2 -基团或末端- CH_2 -基团。

[0099] 如本文中所示,“桥连基团”选自-CH(OH)-、-O-、-CO-、- CH_2 (CO)-、-SO-、- CH_2 (SO)-、- SO_2 -、- CH_2 (SO_2)-、-COO-、-OCO-、-S-CO-、-CO-S-、-SOO-、-OSO-、-SOS-、-O-CO-O-、-OCH₂-、- CH_2 O-、-NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-、-NR₁-CO-O-、-O-CO-NR₁-、-NR₁-CO-NR₁-、-CH=CH-、-C≡C-、-CH=CH-COO-、-OCO-CH=CH-、-CH=N-、-C(CH₃)=N-、-N=N-,其中R_N代表氢原子或C(1-6)烷基或其组合。优选的桥连基团包括-CH(OH)-、-O-、-CO-、- CH_2 (CO)-、-COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、- CH_2 O-、-NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-、-NR₁-CO-O-、-O-CO-NR₁-、-NR₁-CO-NR₁-、-CH=CH-、-CH=N-、-C(CH₃)=N-,其中R₁代表H或C(1-6)烷基或其组合。更优选的桥连基团包括-CH(OH)-、-O-、-CO-、- CH_2 (CO)-、-COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、- CH_2 O-、-NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-,其中R₁代表H或C(1-6)烷基或其组合。

[0100] 在具体的实施方式中,间隔基团可以是具有6至30个碳原子的取代的或未取代的杂亚烷基,优选聚乙二醇基团(在线性构型中具有2至24个乙二醇单体)、多元醇基团、聚胺基团(例如,精胺、精脒及其多聚衍生物)、聚酯基团(例如,在线性构型中具有3至15个丙烯酸乙酯单体的聚(丙烯酸乙酯))、聚氨基酸基团或其组合。

[0101] 更优选地,间隔基团可以是包括1至8个氨基酸的聚氨基酸(即氨基酸或二、三、四、五、六、七或八肽)或为二、三、四、五或六乙二醇的聚乙二醇基团或此类聚氨基酸与聚乙二醇的组合。在优选的实施方式中,间隔基团 S_1 、 S_2 、 S_3 彼此独立地代表包含式(a)和/或(b)的一个或多个重复单元的线性链

[0102] (a) $-[Y_1-(CH_2)_n]_p-$

[0103] (b) $-[Y_2-(CH_2)_m-Y_3]_q-$,或其组合,

[0104] 其中

[0105] Y_1 、 Y_2 、 Y_3 彼此独立地为选自-O-、-CO-、COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、- CH_2 O-、NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-的基团,其中R₁代表H或C(1-6)-烷基,并且

[0106] n、m、p和q彼此独立地是1至10的整数。

[0107] 上述基团的组合(如通过用语“其组合”表示的)包括以交替或嵌段形式存在的(a)与(b)的组合,其因而可具有下式之一

[0108] $-[Y_1-(CH_2)_n]_p-[Y_2-(CH_2)_m-Y_3]_q-$

[0109] $-[Y_2-(CH_2)_m-Y_3]_q-[(CH_2)-Y_1]_p-$

[0110] $-[Y_1-(CH_2)_n]_p-[Y_1-(CH_2)_m-Y_2]_q-[(CH_2)-Y_1]_p-$

[0111] 其中 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 彼此独立地是选自-O-、-CO-、COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、- CH_2 O-、NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-的基团,其中R₁代表H或C(1-6)-烷基,

[0112] n 、 m 、 p 和 q 彼此独立地是1至10的整数。

[0113] 因此,优选的重复单元包括但不限于, $-\text{CO}-\text{NR}_1-(\text{CH}_2)_{n1}-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n2}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{n4}-\text{NR}_1-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}_1-(\text{CH}_2)_{n5}-\text{NR}_1-\text{CO}-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n6}-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{COO}-(\text{CH}_2)_{m1}-$ 、 $-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_{m2}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{m3}-\text{COO}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{m4}-\text{OCO}-$ 、 $-\text{COO}-(\text{CH}_2)_{m5}-\text{OCO}-$ 、 $-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_{m6}-\text{COO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{p1}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{O}-$,

[0114] 其中 R_1 代表H或C(1-6)-烷基,并且 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 、 $n5$ 、 $n6$ 、 $m1$ 、 $m2$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m5$ 、 $m6$ 、 $p1$ 和 $p2$ 彼此独立地是1至10的整数,优选为1、2、3、4、5或6。

[0115] 上述基团的其它组合也可包括例如具有下式的各种重复单元(a)的组合

[0116] $-\text{[Y}_1-(\text{CH}_2)_n\text{]}_p-\text{[Y}_1-(\text{CH}_2)_n\text{]}_q-\text{[Y}_1-(\text{CH}_2)_n\text{]}_q\text{---}$

[0117] 其中 Y_1 、 Y_1 、 Y_1 彼此独立地为选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 的基团,其中 R_1 代表H或C(1-6)-烷基,并且 n 、 n 、 n 彼此独立地是1至10的整数。

[0118] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中

[0119] S_1 代表C(1-24)亚烷基;

[0120] S_2 代表C(1-24)亚烷基;

[0121] S_3 代表C(1-24)亚烷基;

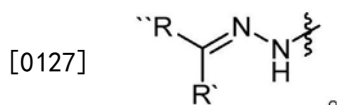
[0122] 并且其中所述的亚烷基是直链的或直链的,并且其中所述的亚烷基是取代的或未取代的,并且其中所述亚烷基的一个或多个(优选非相邻的) $-\text{CH}_2-$ 基团可彼此独立地被一个或多个桥连基团Y和/或未取代的或取代的环烷基、未取代的或取代的杂环烷基、未取代的或取代的芳基、未取代的或取代的杂芳基替代;前提是杂原子(诸如O和N)相互不直接连接。

[0123] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中Y代表基团 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CH}_2(\text{CO})-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{CH}_2(\text{SO})-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CH}_2(\text{SO}_2)-$ 、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 、 $-\text{SOO}-$ 、 $-\text{OSO}-$ 、 $-\text{SOS}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{CO}-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-$ 、 $-\text{OCO}-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{N}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{N}-$ 、 $-\text{N}=\text{N}-$,其中 R_1 彼此独立地代表氢原子或C(1-6)烷基。

[0124] 在特别有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中Y代表 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 。

[0125] 应当理解,为了在制备本发明的三官能交联试剂中使用,间隔基优选设置有末端官能团,该官能团可被选择性地保护或被活化以连接X或官能团A、L和芳香族胍基团中的一种。因此,在一些实施方式中,间隔基可通过桥连基团,优选通过选自 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}_1-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}_1-$ 、 $-\text{NR}_1-\text{COO}-$ 和 $-\text{S}-\text{S}-$ 连接的基团偶联至X和相应的官能团(A、L或芳香族胍基团)。还应理解,对于装配核心结构、间隔基和三种官能团A、L和芳香族胍基团之一没有优选的顺序。本领域技术人员将知晓,取决于不同基团的性质,可优选一种装配顺序。

[0126] 脞基团:本发明的三官能交联试剂的其它官能团是下式的脞基团



[0128] 该基团能够与细胞表面上的糖蛋白或分泌的糖蛋白的氧化的碳水化合物基团选

择性地形成共价键。所述氧化的糖蛋白可位于细胞表面或分泌的糖蛋白本身上,或者其可位于与靶糖蛋白受体相互作用的空间上接近的分子上。间隔基 S_2 和 S_3 的长度决定配体结合位点与所述氧化的糖蛋白之间的距离。因此,改变间隔基 S_2 和 S_3 的长度允许扫描或探测配体结合位点的即时环境或扩展环境。术语“胺基团”包括具有选自氢、取代的(C1-C6)烷基、取代的芳基和取代的杂芳基的取代基的醛或酮胺。应当理解,用于本发明的取代基 R' 、 R'' 的选择可取决于该交联试剂的预期用途。

[0129] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中 R' 代表C(1-6)-烷基;且 R'' 代表C(1-6)-烷基。

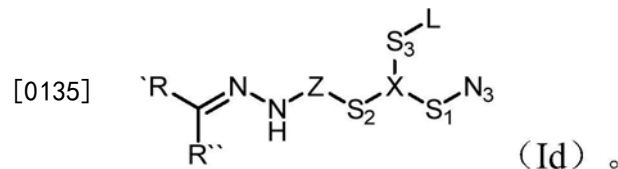
[0130] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中 R' 和 R'' 代表甲基。

[0131] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中Z代表选自未取代的或取代的苯基、萘基和蒽基的芳基基团。

[0132] 在有利的实施方式中,本发明涉及本文所述的式(I)的化合物,其中Z代表选自未取代的或取代的吡啶基、咪唑基、咪唑基、苯并咪唑基、嘧啶基、噻吩基、喹啉基、吲哚基以及噻唑基的杂芳基基团;特别优选Z是吡啶基。

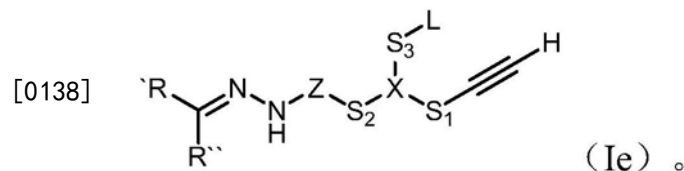
[0133] 亲和性基团:如本文中所示,术语“亲和性基团”是指任何可鉴别的标签、基团或部分,其能够被另一种组合物(任选地附连或连接至固体载体诸如珠、滤器、板、膜、层析树脂等)特异性结合而用于检测、鉴定和纯化目的。应当理解,许多不同类的亲和性基团在本领域中是已知的并且可单独地或与一种或多种不同的亲和性基团组合而用于本发明的方法。特别合适的亲和性基团允许与固体载体形成共价键。这种共价结合有助于从裂解物中分离氧化的糖蛋白受体。

[0134] 特别优选的亲和性基团是叠氮基($-N_3$)以及由此的式(Id)的化合物



[0136] 因为该亲和性基团允许式(I)的化合物直接合成和纯化,所以该亲和性基团(即叠氮基团)特别有用。

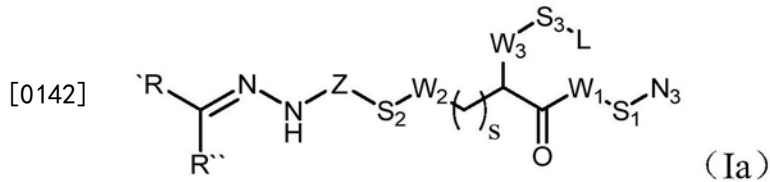
[0137] 还特别优选的亲和性基团是炔基团-CCH以及由此的式(Ie)的化合物



[0139] 因为该亲和性基团允许从式(I)的化合物中的各种各样的配体反应性基团L中选择,所以该亲和性基团(即炔基团)特别有用。

[0140] 鉴于上述论述,当用于表征和分析配体-靶糖蛋白相互作用时,发现式(I)的特定化合物特别有用。该化合物由下文的式(Ia)、(Ib)和(Ic)限定。

[0141] 在另一实施方式中,本发明涉及式(Ia)的化合物



[0143] 其中

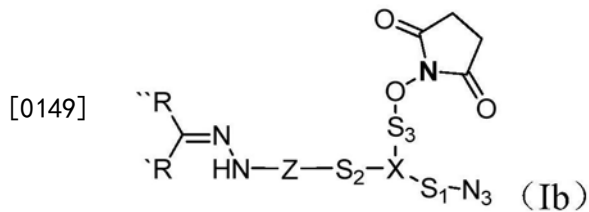
[0144] L、S₁、S₂、S₃、Z、R'、R''、s如本文限定的，

[0145] W₁是-NH-、-O-、-S-，

[0146] W₂选自-COO-、-OOC-、-CONH-、-NHCO-、-NH-、-O-和-S-的基团，

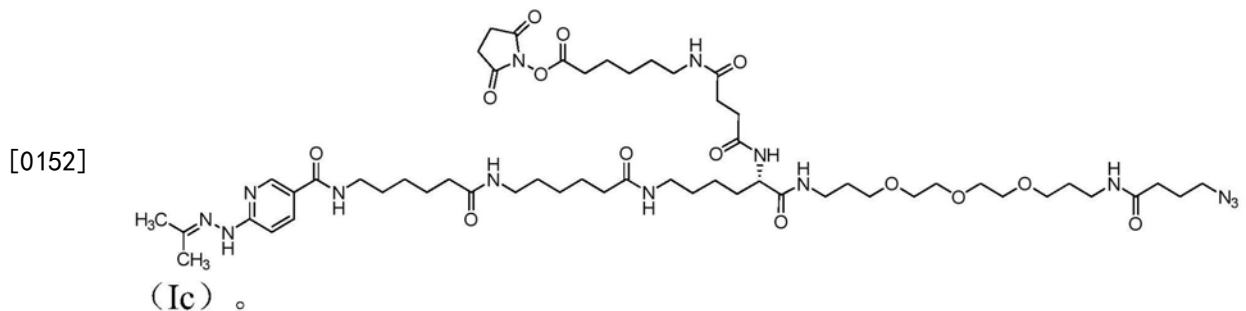
[0147] W₃选自-COO-、-OOC-、-CONH-、-NHCO-、-NH-、-O-、-S-的基团。

[0148] 在另一实施方式中，本发明涉及式 (Ib) 的化合物



[0150] 其中该取代基如式 (I) 所限定的。

[0151] 在另一实施方式中，本发明涉及式 (Ic) 的化合物，该化合物以其昵称“HATRIC”为人所知，



[0153] 在另一有利的实施方式中，交联试剂是水溶性的和/或生物相容性的。术语“水溶性的”通常是指材料在水中的溶解度大于1wt% (基于24°C时材料和水的总重量)。应当了解，水溶性由本发明的交联剂的亲水性质赋予，更具体地由A、L、X、Z、S₁、S₂、S₃和R_N的一个或多个基团的亲水性质赋予。本领域技术人员将知道选择什么化学基团来获得足够亲水的交联剂。在优选实施方式中，间隔基团S₁、S₂和S₃中的一个或多个可包含更具亲水特性的官能团来增加所产生的交联试剂的亲水性。术语“生物相容的”是指相对于人细胞、组织或体液呈化学惰性并且交联试剂对这类生命体呈最小毒性作用。

[0154] 在第二方面中，本发明涉及使用本发明的三官能交联试剂来表征和分析配体 (II) 与靶糖蛋白 (III) 之间的相互作用，参见图1和图3。

[0155] 简而言之，如上文所示，本发明的交联剂将两种不同的化学反应性基团与亲和性基团在三官能分子中结合。第一化学反应性基团是配体反应性基团，优选N-羟基琥珀酰亚胺，用于将交联剂与目标配体 (II) 偶联，其然后结合至 (细胞表面或分泌的) 目标靶糖蛋白受体 (III)。第二化学反应性基团是用于捕获氧化的靶糖蛋白的芳香族胺，优选丙酮保护的胍基烟酸酯基团。缀合至目标配体，本发明的带有亲和性标签的交联剂允许对氧化的活细

胞上或溶液中的相互作用的靶糖蛋白受体进行碳水化合物引导的捕获,以及随后通过亲和性基团,优选叠氮基对全序列捕获的糖蛋白亲和富集,用于随后的质谱分析。通过与未引导的对照样品的定量比较,源自配体与其相应靶糖蛋白受体的相互作用的亲和性标记事件(例如叠氮化)可与随机(细胞表面或分泌的)蛋白质的非特异性随机亲和标记事件(例如叠氮化)清楚地区分开。这允许检测甚至低亲和性的和瞬时的配体-靶糖蛋白受体相互作用以及配体对于以膜结合形式存在于其原始细胞环境中或以分泌的形式存在于生物流体中的低丰度糖蛋白的脱靶效应。

[0156] 在细胞表面靶糖蛋白受体的情况下,这在图1中进行了示意性说明:使目标配体(II)与三官能交联剂在配体相容性缓冲液中偶联。在单独的对照反应中,将等摩尔量的交联剂与对照蛋白质偶联,或使其在纯缓冲液中淬灭(图1(iii))。为了在细胞表面碳水化合物产生醛基团,氧化了活细胞(图1(ii))。随后将先前偶联的配体添加至氧化的细胞中以允许捕获氧化的细胞表面碳水化合物结构(图1(iv a))。从而,随机细胞表面糖蛋白通过随机事件而被标记,并且目标配体的靶细胞表面糖蛋白受体通过直接配体-受体相互作用被更高效地捕获。并行地,将对照探针添加至等数目的氧化的细胞中,从而仅产生随机标记事件。对于所有以下步骤,并行地加工两个探针。在标记反应后,细胞被裂解(v)。清洁剩下的部分,并且通过铜催化的叠氮-炔环加成反应,用炔基质捕获叠氮基标记的细胞表面糖蛋白(图1(vi))。当共价捕获全序列糖蛋白时,这些被还原并烷基化。基质和糖蛋白之间的共价键允许强烈洗涤以移除非共价结合的化合物。洗涤之后,全序列捕获的糖蛋白被蛋白酶(通常是丝氨酸蛋白酶胰蛋白酶)消化,其将C末端切割为精氨酸或赖氨酸,但不在或较低频率在脯氨酸之前(图1(vii a))。产生的胰蛋白酶水解肽与仍然通过HATRIC与基质共价结合的糖基化肽(X)以及与没有糖基化的或与HATRIC不相相互作用的基质中释放的肽(IX)不同。释放的肽(IX)是脱盐的并且经过高质量精度质谱以检测细胞表面糖蛋白(图1(viii))。细胞表面糖蛋白的胰蛋白酶水解糖肽与基质保持共价连接(图1(vii b))。洗涤完蛋白酶之后,通过用肽-N-糖苷酶F的酶促步骤从珠上特异性释放N-糖肽(XI),其在寡糖结构的最内部组分与肽的N-X-S/T糖基化基序(其中N代表天冬酰胺,X代表除脯氨酸外的任何氨基酸,且S/T分别代表丝氨酸或苏氨酸)中糖肽的天冬酰胺之间切割。通过这样做,肽-N-糖苷酶F使天冬酰胺去酰胺化并且将特异性的N115-X-S/T标记引入先前糖基化的肽中(图1(ix))。使释放的肽脱盐,重悬于适当的缓冲液中以利用高质量精度质谱仪进行分析。为了分析两种不同的肽段(IX和XI),以数据依赖性模式操作质谱仪,其中高于预定阈值的离子信号自动地触发仪器从MS模式转换至MS/MS模式以产生肽的碰撞诱导解离(CID)谱或更高能量碰撞解离(HCD)谱。所有MS/MS谱都针对标准蛋白质数据库进行搜索。额外过滤来自N-糖肽段的MS/MS谱,以确定N115-X-S/T基序的存在。基于两种不同的肽段(IX和XI),将配体样品中细胞表面肽的浓度与对照样品定量比较,以检测细胞表面受体的特异性富集。对于来自细胞表面蛋白的随机标记的肽,比率应当约为1,而被以基于配体的方式特异性捕获的糖蛋白受体肽在配体样品中相对于对照获得更高的值。如果用多于一种肽鉴定蛋白质,则可从两种不同肽段中组合丰度信息。

[0157] 可以考虑用其它的分析方法替代MS分析。本方法包括这些其它方法作为其一部分。

[0158] 因此,在第三方面,本发明涉及通过使用式(I)的化合物鉴定样品中配体(II)和靶

糖蛋白受体 (III) 特异性相互作用的方法。具体而言,本发明规定了这种方法,其中靶标 (III) 是糖蛋白受体;且其中配体 (II) 识别靶标 (III) 上的配体特异性结构域;且其中形成靶标-配体-试剂-复合物 (VI),所述复合物 (VI) 包括本文所述的式 (I) 的化合物、配体 (II) 以及靶标 (III),其中配体 (II) 与式 (I) 的基团L共价结合,且靶标 (III) 与式 (I) 中存在的胺基团共价结合。

[0159] 以下将进一步详细解释本发明的这一方面。

[0160] 如上文所显示的,应当理解,靶糖蛋白受体 (III) 可在溶液中或在细胞表面上 (图1 中所示)。

[0161] 如上文所显示的,应当理解,化合物 (I) 包括许多衍生物,如本发明的第一方面中所概述的。因此,在优选的实施方式中,使用根据式 (Ia)、(Ib) 或 (Ic) 的化合物进行本发明的上述方法。

[0162] 根据该方面,本发明涉及鉴定配体 (II) 与包含细胞群的样品中具有至少一个醛基官能团 (III) 的细胞表面受体之间的特异性相互作用的方法,其中该配体 (II) 识别靶糖蛋白受体 (III) 上的配体特异性肽结构域。这些醛基官能团可以如本文所述的被化学诱导、代谢工程化或酶促产生。

[0163] 在有利的实施方式中,本发明方法包括以下步骤i) 提供包含所述靶标 (III) 的样品,

[0164] ii) 使靶标 (III) 经历氧化处理以在至少一个碳水化合物残基上产生醛官能,从而获得氧化的靶标 (III),

[0165] iii) 提供如本文所述的式 (I) 的三官能交联试剂并且允许其配体反应性基团L与所述配体 (II) 缀合以获得配体-试剂-复合物 (V),

[0166] iv) 在 (a) 复合物 (V) 能够与氧化的靶标 (IV) 上的配体特异性结构域结合以及 (b) 所述复合物 (V) 的胺基团 ($R^1R^2C=N-NH-$) 被转化为其游离形式并允许与氧化的碳水化合物靶标 (IV) 共价结合的条件下,使步骤 (ii) 的样品与步骤 (iii) 的复合物 (V) 接触,以获得包括共价结合配体和共价结合靶标的靶标-配体-试剂复合物 (VI),

[0167] v) 裂解步骤 (iv) 的样品使得膜嵌入的细胞表面蛋白以及所述复合物 (VI) 可用并且与基质 (VII) 反应,以获得基质结合复合物 (VIII)

[0168] vi) 通过使用亲和性基质 (VIII) 从样品中富集所述复合物 (VI) 以获得基质结合复合物 (VIII),

[0169] vii) 消化所述基质结合复合物 (VIII) 以获得 (a) 释放的肽 (IX) 和 (b) 结合在基质 (X) 上的糖肽以及

[0170] viii) 从所述基质 (VIII) 中任选地释放结合的糖肽 (X) 以获得释放的糖肽 (XI)

[0171] ix) 分析并定量释放的肽 (IX) 和 (XI),优选通过高质量精度质谱,以及

[0172] x) 优选通过与对照反应的定量比较鉴定配体与靶糖蛋白受体之间的相互作用。

[0173] 因此,在本发明的典型方法中,进行了步骤 (i) 至 (x)。这些方法步骤也被称为“基于HATRIC的LRC工作流程”并且在下文中更详细描述:

[0174] 步骤 (i): 在上文中限定的细胞表面糖蛋白受体的情形中,样品包含细胞群或组织,其中至少一个表达这种细胞表面糖蛋白受体。在上文中限定的分泌的糖蛋白的情形中,样品包含含有至少一个分泌的糖蛋白的生物流体。

[0175] 如本文中所示,术语“样品”或“生物学样品”是指从任何活细胞或生物体获得的,由其排泄或由其分泌的任何固体或流体样品,其中所述活细胞或生物体包括但不限于组织培养物、生物反应器、人或动物组织、植物、水果、蔬菜、单细胞微生物体(例如细菌和酵母)以及多细胞生物体。例如,生物学样品可以是例如血液、血浆、血清、尿、胆汁、精液、脑脊髓液、房水或玻璃体液获得的生物流体或任何身体分泌物、渗出液、渗出物(例如,获得自脓疮或者感染或炎症的任何其它位点的流体)或获得自关节(例如,正常关节或受疾病例如类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风或脓毒性关节炎影响的关节)的流体。生物学样品还可以是例如,获得自任何器官或组织的样品(包括活检组织检查或尸体剖检样品),可包括细胞(无论是原代细胞还是培养的细胞)、由任何细胞、组织或器官调节的培养基、组织培养物。

[0176] 术语“靶标”是指糖蛋白受体(III)且如上文限定的。

[0177] 步骤(ii):在该步骤中,使样品经受氧化处理以在存在于靶糖蛋白受体上的碳水化合物上产生醛基基团。这可以通过使用例如高碘酸盐(例如1-2mM NaIO_4)来实现。

[0178] 图1通过显示空的菱形结构来概述该步骤。

[0179] 步骤(iii):在该步骤中,交联剂(I)的配体反应性基团L,优选活化的官能团,更优选N-羧基琥珀酰亚胺基团,能够在配体相容性条件下通过伯胺高效地偶联至配体,而不损失官能,以获得配体-交联剂复合物(V)。

[0180] 图1通过包括共价结合配体(灰色圈)的化合物(VI)概述该步骤。

[0181] 在单独的对照反应中,将等摩尔量的交联剂(I)偶联至对照蛋白质或在纯缓冲液中温育以水解活化的官能团,例如NHS酯或配体反应性基团,即胺反应性基团,用另一种限定的化合物淬灭。

[0182] 图1通过包含左列中的共价结合配体(灰色圈)的化合物(VI)或右列中的淬灭残余(黑色斜线)来概述该步骤。

[0183] 步骤(iv)(a):在该步骤中,配体-交联剂复合物(V)与包括含有氧化的靶糖蛋白受体(IV)的一种或多种细胞、组织或溶液的样品结合,使配体-交联剂复合物与(IV)的氧化的碳水化合物基团反应。

[0184] 当配体-交联剂复合物与氧化的靶糖蛋白受体反应时,交联剂(I)的胺基团将与这些氧化的位点反应并形成共价键(参照图1、2:实心菱形)尽管糖蛋白上的碳水化合物结构的氧化通常产生若干潜在的氧化的连接位点(如图1所示),然而通过配体-交联试剂-复合物的胺基团捕获的糖蛋白保持不变。

[0185] 随机糖蛋白通过随机事件捕获。不受理论限制,应该相信,由于由直接配体-靶糖蛋白受体相互作用引起的局部富集,邻近受体上配体结合位点的醛基基团可以更有效的被捕获。每个三官能交联试剂的双标记事件导致双结合的靶标-配体-试剂复合物(VI)。该复合物的形成是本文所述的整个方法的关键。

[0186] 类似地,将对照探针(诸如淬灭的交联剂、或与非特异性分子缀合的交联剂、或与具有独特受体特异性的配体分子缀合的交联剂)添加到等数量的细胞中,仅导致随机标记事件。有利地,对于所有以下步骤,可并行地加工对照探针。

[0187] 典型的反应条件包括pH 6.5-7.4,诸如6.5;温度为0-10°C,诸如4°C;10-240分钟,诸如90分钟。在这种条件下,保护的胺基团($\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{N}-\text{NH}-$)被转化为其游离形式,并允许与糖蛋白靶受体(以及其它糖蛋白受体)的氧化的碳水化合物基团共价结合。

[0188] 步骤(iv) (b):在任选的该步骤中,将催化剂(XX)添加至配体-交联剂复合物(V)与样品的组合物中,其中样品包括包含氧化的靶糖蛋白受体(IV)的一种或多种细胞、组织或溶液。这允许配体-交联剂复合物的胺基团与(IV)的氧化的碳水化合物基团在生理性pH下反应。

[0189] 适合的催化剂(XX)在下文中确定。

[0190] 有利地,提供了来自允许配体和糖蛋白靶受体之间生理反应的缓冲液组的适当的缓冲液,即磷酸盐缓冲盐水。有利地,催化剂的量在5mM的范围内。有利地,pH为6.5至7.4,其类似于生理条件。

[0191] 在生理pH下进行本发明方法被认为是一个主要的优势。催化剂(XX)的细节在下文中第4方面提供。

[0192] 步骤(v):因此,在该步骤中,可通过裂解细胞和膜从样品中释放双结合的靶标-配体-试剂复合物(VI)和随机糖蛋白-试剂复合物(VI_R)。裂解步骤(iv)的样品使得膜嵌入的细胞表面蛋白以及所述复合物(VI)可用并且与基质(VII)反应,以获得基质结合复合物(VIII)。

[0193] 在鉴定配体与靶糖蛋白受体之间的特异性相互作用的方法的情形下,其中靶糖蛋白受体是细胞表面糖蛋白(诸如细胞表面受体),首先使包含细胞的样品经历裂解步骤,以获得包含双蛋白结合的复合物的处理的细胞样品。

[0194] 随后使用为亲和性基团的其第三官能团来亲和纯化双结合的靶标-配体-试剂复合物。如果例如叠氮基被用作亲和性基团,则使用炔珠在与含炔基质(即炔琼脂糖或炔磁珠)进行铜催化的环加成反应中使双结合的靶标-配体-试剂复合物亲和纯化。这产生与基质共价结合的三结合的靶标-配体-试剂复合物。例如在酮催化的环加成反应中适合的是炔琼脂糖珠。典型的反应条件是已知的并包括1mM CuSO₄、6.25mM THPTA和2mM抗坏血酸钠,6-24hrs,例如18hrs,在10-30℃下,例如室温。

[0195] 步骤(vi):在该步骤中,靶标-配体-试剂复合物(VI)与亲和性基质共价结合并从样品中纯化。

[0196] 用蛋白质相容性缓冲液洗涤来自裂解的样品(主要来自细胞内空间)中的其它蛋白质。适合的缓冲液不会修饰糖蛋白的一级氨基酸序列。这种缓冲液是已知的并包括1%十二烷基硫酸钠、8M尿素、20%乙腈、5M氯化钠、80%异丙醇、100mM碳酸氢钠的组合,pH为11。

[0197] 步骤(vii) a:在该步骤中,加工样品并使其经受酶促或化学消化,其释放未通过标记的糖蛋白共价结合至基质的糖基化蛋白质的肽。

[0198] 在该方法的实施方式中,蛋白酶例如通过暴露于胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、内切蛋白酶AspN、内切蛋白酶LysC等的组合物的剂而被使用,优选使用胰蛋白酶。胰蛋白酶将蛋白质C末端切割为精氨酸或赖氨酸,但不在或较低频率在脯氨酸之前。

[0199] 步骤(vii) b:在该步骤中,洗涤与步骤(vi)中的基质保持共价结合的N-糖肽以移除来自步骤(vii) a的残余的蛋白酶。

[0200] 如果步骤(vii) a的蛋白酶没有被相应地移除,随后用内切糖苷酶和外切糖苷酶的消化步骤可能受到后者的蛋白水解的阻碍。

[0201] 步骤(viii):在该步骤中,分析如此获得的释放的肽(IX)。可以使用本领域可用的用于分析这种化合物的任何方法,优选的方法是质谱。质谱分析的方法对于本领域技术人

员来说是公知的(参见,例如,Yates,J.Mass Spect.33:1-19(1998);Kinter和Sherman,Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry,John Wiley和Sons,New York(2000);Aebersold和Goodlett,Chem.Rev.101:269-295(2001))。为了进行高分辨率多肽片段分离,可使用液相色谱ESI-MS/MS或自动化LC-MS/MS(其利用毛细管反相色谱作为分离法)(Yates等人,Methods Mol.Biol.112:553-569(1999))。优选地,将具有动态排除的数据依赖性碰撞诱导解离(CID)或更高能量碰撞解离(HCD)用作所选的质谱方法(Goodlett等人,Anal.Chem.72:1112-1118(2000))。对于这种分析,以数据依赖性模式操作质谱仪,在该数据依赖性模式中,高于预定阈值的离子信号自动地触发仪器从MS转换至MS/MS模式,以产生肽的碰撞诱导的解离(CID)谱或更高能量碰撞解离(HCD)谱。

[0202] 有利地,使用标准算法(诸如SEQUEST,Mascot,X!tandem,OMSSA)针对标准蛋白质数据库搜索了所有的MS/MS谱,并通常将其过滤以将假阳性蛋白质鉴定率限制为低于1%。

[0203] 此外,过滤所有推断的糖蛋白以进行细胞表面注释。

[0204] 有利地,步骤(viii)包括通过定量质谱法分析(vii)(a)中获得的释放的肽,并由此鉴定配体(II)与靶标(III)之间的相互作用的步骤。

[0205] 有利地,可将配体样品中的糖蛋白的浓度与对照样品进行定量比较。

[0206] 这允许检测靶糖蛋白受体的特异件富集。为了进行这种无标记质谱定量,可将紧临质谱分析之前的反相色谱展示为MS特征图,其中将特征的保留时间相对于其质/荷比作图。如通过质谱仪所检测的,这种图中的肽根据其在样品中的丰度在确定的时间中以确定的离子流强度以不同的同位素模式出现。一旦通过片段化和MS/MS分析鉴别了该肽,就可利用开放源或商业算法如Superhlm(Mueller et al.Proteomics(2007)vol.7(19)pp.3470-3480)或Progenesis LC-MS(非线性动力学)将该信息分配给MS图中的特定肽特征,并使其与半定量数据相结合。随后可叠加不同样品(例如样品与对照)的MS特征图,并将其进行比较以获得肽丰度的比率。对于来自糖蛋白的随机标记的肽,这些比率应当约为1,而以基于配体的方式被特异性捕获的糖蛋白受体肽在配体样品中相对于对照获得更高的值。如果蛋白质被鉴定为具有超过一种肽,可将丰度信息进行组合。

[0207] 在其它实施方式中,可使用替换的基于质谱的定量方法诸如

[0208] • 单反应监测(SRM);

[0209] • 在细胞培养物中用氨基酸进行的稳定同位素标记(SILAC;参见Nilsson等人Mass spectrometry in high-throughput proteomics:ready for the big time.Nat Methods(2010)和第7卷(9)pp.681-5);

[0210] • 质谱的数据非依赖采集(SWATH MS;参见例如:Gillet等人Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition:A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis)

[0211] • 串联质谱标签(Tandem Mass Tag)(TMT;参见例如:Dayon等人Relative Quantification of Proteins in Human Cerebrospinal Fluids by MS/MS using 6-Plex Isobaric Tags)

[0212] 步骤(ix):在此,与步骤(vi)b中的基质保持结合的N-糖肽通过切割碳水化合物结构从珠特异性释放。

[0213] 在该方法的实施方式中,聚糖酶通过例如暴露于剂使用,诸如肽-N-糖苷酶

(PNGase) F和肽-N-糖苷酶A等, 优选使用肽-N-糖苷酶F。肽-N-糖苷酶F处理在寡糖结构的最内部组分与肽的N-X-S/T糖基化基序(其中N代表天冬酰胺,X代表除脯氨酸外的任何氨基酸,以及S/T分别代表丝氨酸或苏氨酸)中糖肽的天冬酰胺之间切割,由此影响肽释放(并伴随天冬酰胺去酰胺化)。

[0214] 虽然本文中用N-连接的糖基化位点进行了示例,应当理解,本发明的方法也可以与其它类型的经真实鉴定的糖基化位点,诸如O-连接的糖基化位点,或可能与其它类型的翻译后修饰(例如糖基磷脂酰肌醇至肽的C末端的连接)或除蛋白质外的糖基化的有机化合物,诸如糖脂等一起使用。

[0215] 因此,上述方法的步骤(v) 优选包括通过使步骤(iv) 中获得的纯化的双肽结合的复合物经历糖苷酶处理(优选不同的内切糖苷酶和外切糖苷酶的处理)而将所捕获的肽与所述复合物从其分离,以获得释放的肽。可替代地,可使用可切割的连接基,例如可分别用还原剂或高碘酸盐切割的含二硫键或顺式二醇的连接基。

[0216] 步骤(x): 在该步骤中,分析如此获得的释放的肽(IX)。可以使用本领域可用的用于分析这种化合物的任何方法,优选的方法是质谱。质谱分析的方法对于本领域技术人员来说是公知的(参见,例如,Yates, *J. Mass Spect.* 33:1-19 (1998); Kinter和Sherman, *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons, New York (2000); Aebersold和Goodlett, *Chem. Rev.* 101:269-295 (2001))。为了进行高分辨率多肽片段分离,可使用液相色谱ESI-MS/MS或自动化LC-MS/MS(其利用毛细管反相色谱作为分离法)(Yates等人, *Methods Mol. Biol.* 112:553-569 (1999))。优选地,将具有动态排除的数据依赖性碰撞诱导解离(CID)或更高能量碰撞解离(HCD)用作所选的质谱方法(Goodlett等人, *Anal. Chem.* 72:1112-1118 (2000))。对于这种分析,以数据依赖性模式操作质谱仪,在该数据依赖性模式中,高于预定阈值的离子信号自动地触发仪器从MS转换至MS/MS模式,以产生肽的碰撞诱导的解离(CID)或更高能量碰撞解离(HCD)谱。

[0217] 有利地,使用标准算法(例如SEQUEST, Mascot, X!tandem, OMSSA)针对标准蛋白质数据库搜索了所有的MS/MS谱,并通常将其过滤以将假阳性蛋白质鉴定率限制为低于1%。此外,过滤了所有的肽以获得先前糖基化的肽的N115-X-S/T基序。

[0218] 有利地,步骤(x)包括通过定量质谱方法(这种方法上文步骤(viii)已讨论)分析步骤(ix)中获得的释放的肽,并由此鉴定配体(II)与靶标(III)之间的相互作用。

[0219] 有利地,可将配体样品中的糖蛋白的浓度与对照样品进行定量比较,细节在上文步骤(viii)中提供。

[0220] 在其它实施方式中,可以使用上文步骤(viii)所述的替代的基于质谱的定量方法。

[0221] 对照反应:进行对照反应是在技术人员的知识范畴内的。这种对照反应可以是水解反应(其中不添加配体)或淬灭反应(其中添加具有已知受体偏好的配体)。原则上,类似于本文讨论的工作流程(步骤(i)至(x))进行这样的反应,还在图1和3中右手边示意性地示出以下偏差(如黑色斜线的淬灭残余):

[0222] 在LRC实验中,对照样品通常并行制备以能够将样品中的糖蛋白丰度与对照进行比较。通过该样品,可以估计交联剂(I)与给定细胞系、组织上的或生物流体中的随机细胞表面糖蛋白的随机结合。为此,交联剂(I)

[0223] • 或在纯缓冲溶液中温育以用于水解活化的官能团L(例如NHS酯基被水解)或

[0224] • 配体反应性基团L(例如NHS酯基与配体的伯胺反应以产生稳定的酰胺键)用具有已知结合偏好的配体淬灭。

[0225] 如果交联剂(I)的配体反应性基团被水解或用含有伯胺的化合物(例如甘氨酸)淬灭,则可能通过给定细胞系、组织上的或生物流体中随机细胞表面糖蛋白的相关丰度的手段估计交联剂(I)的背景结合。如果交联剂(I)的配体反应性基团与具有已知糖蛋白靶受体的配体偶联,则糖蛋白靶受体的鉴定可作为该实验的质量控制。

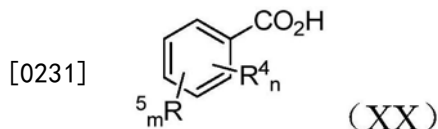
[0226] 图1和3右边显示了淬灭,其中不存在化合物(II);与化合物(I)连接的淬灭分子表示为黑色斜线。

[0227] 如果比较配体中给定糖蛋白的量与对照样品的比例,则随机标记的糖蛋白具有约1的比率。具有高于一的比率的糖蛋白靶受体肽以配体依赖性方式特异性捕获。

[0228] 反应和对照反应之间的比较允许鉴定信号 Δ ,如图1和3中可见的。

[0229] 在第四方面,本发明涉及特定有机化合物在生化反应中作为催化剂的用途,尤其在本文所述的方法中(第3方面)。以下将进一步详细解释本发明的这一方面。

[0230] 本发明的该方面的上下文中的有机化合物符合式(XX)



[0232] 其中n代表1或2;m代表0、1或2; R^4 代表 NH_2 ; R^5 代表C(1-6)烷基或C(1-6)烷氧基。

[0233] 有利地, R^4 在邻位且n=1。

[0234] 有利地, R^5 代表甲氧基且m=1。

[0235] 术语生化反应是已知的且具体指生物分子(诸如细胞表面蛋白上的碳水化合物结构)被化学转化,优选被氧化的反应。

[0236] 在优选的实施方式中,术语生化反应是指在活细胞上的生化反应。

[0237] 在优选的实施方式中,术语生化反应是指如本发明的第三方面中所描述的步骤(iv)。令人惊讶的发现,通过将式(XX)的水溶性有机化合物包括在步骤(iv)b中,在pH 7.4的条件下在三官能交联试剂的胺基团和通过氧化细胞表面蛋白产生的醛基之间发生酰肼形成,直至饱和。

[0238] 在第五方面,本发明涉及包括本文所述的三官能交联试剂(第一方面)以及任选地本文所述的有机化合物(第四方面)的试剂盒。

[0239] 通过下列非限制性实施例进一步阐释了本发明:

[0240] 通则

[0241] 除非另有注解,否则所有反应在环境气氛下进行,并且所有试剂从商业供应商处购买并且没有进一步纯化就使用。在Merck硅胶60F254TLC玻璃板上进行分析薄层色谱法(TLC)并用254nm光和对茴香醛染色溶液可视化,然后加热。反应产物的纯化通过使用Brunschwig硅胶32-63, 60\AA 在0.3-0.5bar压力下的快速色谱、通过使用Acros Organics硅胶、C18-RP、23%C、40-63 μm 的反相色谱或通过使用Aldrich Sephadex LH-20的尺寸排阻色谱进行。

[0242] 单保护的二胺7,^[1]6-(2-(叔-丁氧基羰基)肼基)烟酸^[2]和 γ -叠氮丁酸^[3]按照公

开的过程制备。

[0243] 谱在Bruker AV 600MHz质谱仪上记录¹H NMR,并且以ppm为单位报告,其中溶剂共振用作内标(DMSO在2.50ppm)。峰报告为(s=单峰、d=双峰、t=三重峰、q=四重峰、m=多重峰或未分离峰,br=宽峰信号,耦合常数以Hz表示,积分)。用¹H-去耦合在Bruker AV 151MHz质谱仪上记录¹³C NMR谱,并且以ppm为单位报告,其中溶剂共振用作内标(DMSO-d₆, 39.52ppm)。

[0244] 在Perkin-Elmer UATR Two Spectrometer上测量红外光谱。峰值报告为吸收最大值(n, cm⁻¹)。

[0245] 在Varian IonSpec光谱仪(ESI)上获得高分辨质谱数据,并报告为(m/z)。

[0246] 用Jasco P-2000旋光仪(10cm、1.0mL池)测量旋光度。

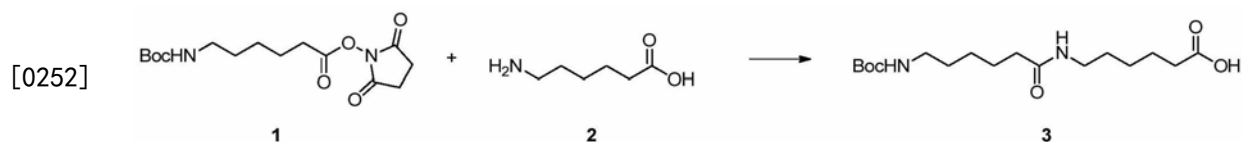
[0247] [1]W.Liu,F.Li,X.Chen,J.Hou,L.Yi,Y.-W.Wu J.Am.Chem.Soc.2014,136,4468-4471。

[0248] [2]B.Teng,Y.Bai,Y.Chang,Y.Chen,Z.Li Bioorg.&Med.Chem.Lett.2007,17,3440-3444。

[0249] [3]T.-B.Yu,J.-Z.Bai,Z.Guan Angew.Chem.Int.Ed.2009,48,1097-1101。

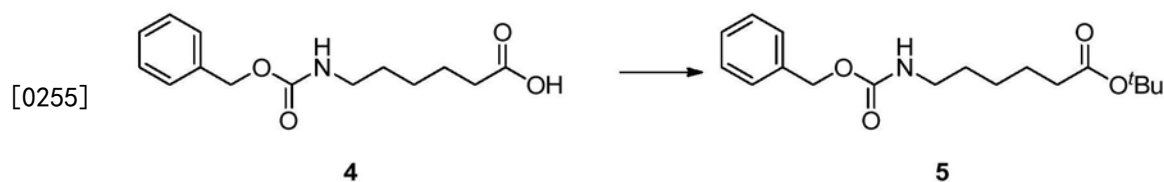
[0250] 实施例1:交联剂“HATRIC”的合成

[0251] 1.6-((叔-丁氧基羰基)氨基)己酰胺(3)的合成



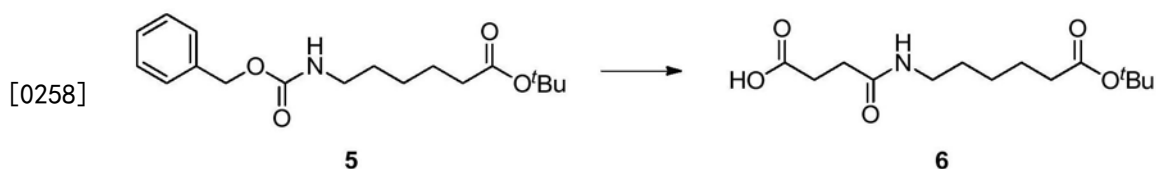
[0253] 用三乙胺(5.08g,50.2mmol,1.1当量)和1(15.0g,45.7mmol,1.0当量)处理2(6.59g,50.2mmol,1.1当量)在DMF(150mL)中的溶液。室温下3h之后,反应混合物用水(250mL)稀释并用EtOAc(3×250ml)萃取。用5%LiCl水溶液(3×250mL)洗涤合并的有机相,用MgSO₄干燥,过滤并蒸发以得到白色固体。通过用乙酸乙酯/己烷(1:1,350ml)重结晶纯化产物,以得到3(17.5g,90%),为白色晶体。

[0254] 2.6-(((苄氧基)羰基)氨基)己酸叔丁酯(5)的合成



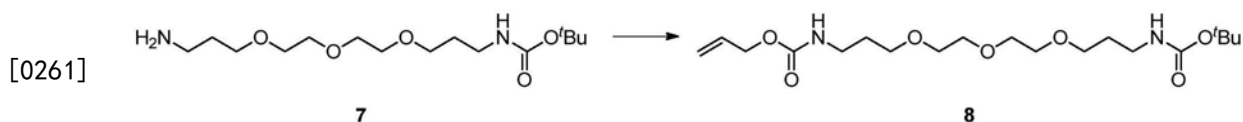
[0256] 用DMAP(2.76g,22.6mmol,0.4当量)、叔丁醇(12.6g,170mmol,3.0当量)、EDC·HCl(15.2g,79.0mmol,1.4当量)和Hünig碱(23.7mL,136mmol,2.4当量)处理4(15.0g,56.5mmol,1.0当量)在DMF(100mL)中的溶液。室温下14h之后,反应混合物用DCM(300mL)稀释并用10%柠檬酸水溶液(3×250ml)洗涤。有机相用MgSO₄干燥,过滤并减压浓缩。产物用柱色谱(200g SiO₂;乙酸乙酯/己烷5:95,然后乙酸乙酯/己烷25:75)纯化,以得到5(14.6g,81%),为无色油状物。

[0257] 3.4-((6-(叔-丁氧基)-6-氧代己基)氨基)-4-氧代丁酸(6)的合成



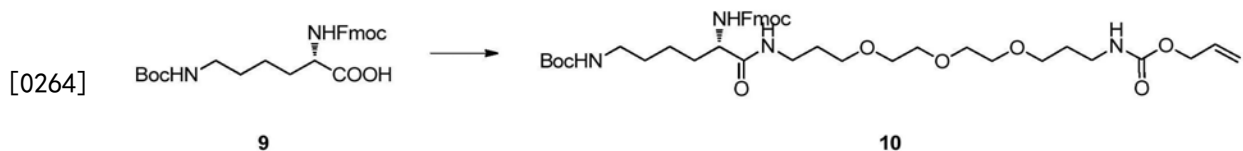
[0259] 用乙酸(2.64g,44.0mmol,1.0当量)和10wt%Pd/C(1.85g,1.74mmol,4mol%)处理5(14.0g,43.6mmol,1.0当量)在THF/水(5:1,100mL)中的溶液。混合物在H₂气氛下室温搅拌16h。然后离心反应混合物,上层清液通过硅藻土过滤,减压浓缩并在真空中干燥产生的油状物。将该油状物溶解在DCM(150mL)中并用三乙胺(15.2mL,109mmol,2.5当量)和琥珀酰(4.79g,47.9mmol,1.1当量)处理。反应混合物在室温下搅拌3h,然后用DCM(350mL)稀释并用10%柠檬酸水溶液(3×250ml)洗涤。产物用快速色谱(150g SiO₂;DCM,然后DCM/MeOH 90:10)纯化,以得到6(11.7g,94%),为白色固体。

[0260] 4.(((氧基双(乙烷-2,1-二基))双(氧基))双(丙烷-3,1-二基))二氨基甲酸烯丙基酯叔丁酯(8)的合成



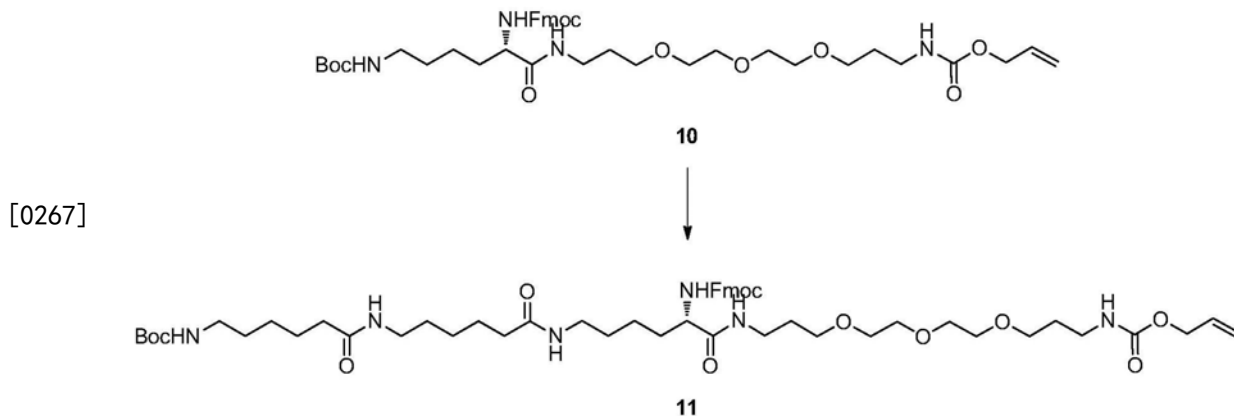
[0262] 在4℃下用三乙胺(5.29mL,37.9mmol,1.3当量)处理7(10.8g,30.3mmol,1.0当量)在DCM(400mL)中的溶液,然后用氯甲酸烯丙基酯(3.56mL,33.4mmol,1.1当量)处理。15min之后,允许反应温热至室温并搅拌2h。然后反应混合物用水(3×250mL)洗涤,并用MgSO₄干燥,过滤并减压浓缩。产物用快速色谱(200g SiO₂;乙酸乙酯/己烷1:1,然后乙酸乙酯)纯化,以得到8(11.0g,90%),为无色油状物。

[0263] 5. (S)-(15-氧代-4,7,10-三氧杂-14-氮杂二十一烷-1,16,20-三基)三氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲基酯烯丙基酯叔丁酯(10)的合成



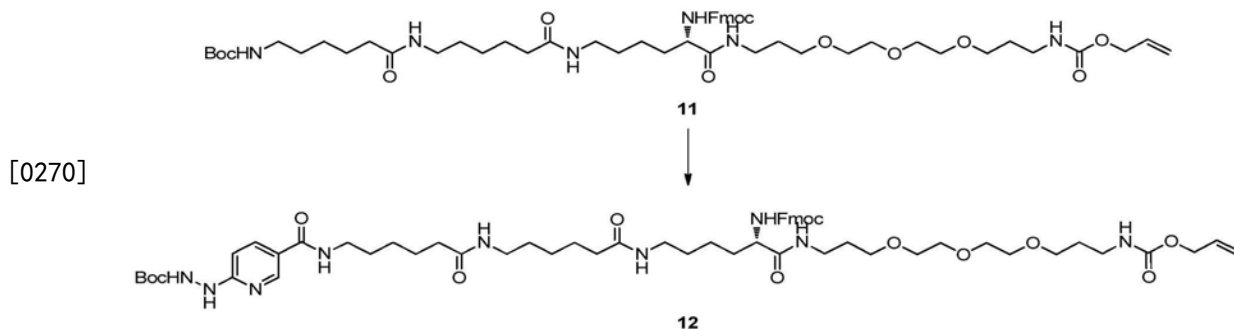
[0265] 用TFA(9mL)处理8(2.83g,7.00mmol,1.2当量)在DCM(10mL)中的溶液并在室温下搅拌30min。然后,加入甲苯(20mL)并蒸发混合物。与甲苯(3×30mL)共蒸发得到棕色油状物,将其真空干燥。残余物溶解在DMF(20mL)中,加入9(2.85g,6.09mmol,1.0当量),然后加入Hünig碱(3.40mL,24.4mmol,4.0当量)和HATU(2.55g,6.70mmol,1.1当量)。反应混合物在室温下搅拌30min,然后用乙酸乙酯(100mL)稀释,用饱和NaCl水溶液(3×100mL)洗涤,用MgSO₂干燥,过滤并减压浓缩。产物用快速色谱(100g SiO₂;DCM,然后DCM/MeOH 96:4)纯化,以得到10(4.53g,99%),为无色油状物,其在放置中凝固。

[0266] 6. (S)-(15,22,29-三氧代-4,7,10-三氧杂-14,21,28-三氮杂三十四烷-1,16,34-三基)三氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲基酯烯丙基酯叔丁酯(11)的合成



[0268] 用TFA (15mL) 处理10 (6.00g, 7.95mmol, 1.0当量) 在DCM (25mL) 中的溶液并在室温下搅拌1h。然后,加入甲苯 (30mL) 并蒸发混合物。与甲苯 (3×30mL) 共蒸发得到油状物,将其真空干燥。残余物溶解在DMF (20mL) 中并加入3 (3.01g, 8.74mmol, 1.1当量), 然后加入Hünig碱 (6.25mL, 35.8mmol, 4.5当量) 和HATU (3.32g, 8.74mmol, 1.1当量)。反应混合物在室温下搅拌30min, 然后用乙酸乙酯 (150mL) 稀释, 用水 (3×100mL)、5%LiCl水溶液 (150mL) 洗涤, 用MgSO₂干燥, 过滤并减压浓缩。产物用快速色谱 (100g SiO₂; DCM, 然后DCM/MeOH 90:10) 纯化, 以得到11 (5.90g, 76%), 为无色油状物。

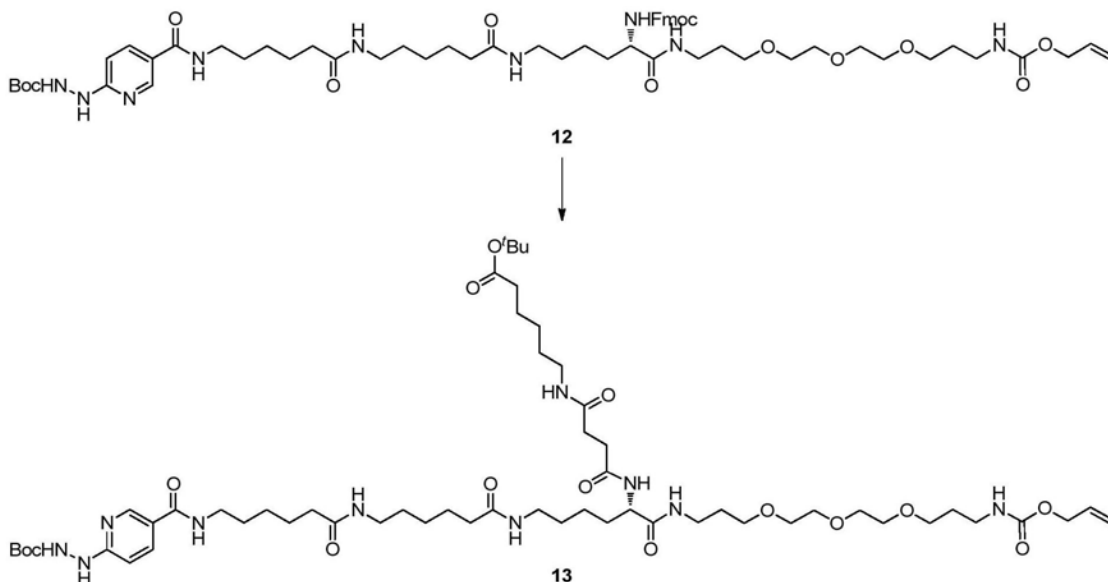
[0269] 7. (S) -2-(5-((22-(((9H-芴-9-基) 甲氧基) 羰基) 氨基) -5,21,28,35-四氧代-4,10,13,16-四氧杂-6,20,27,34-四氮杂四十烷-1-烯-40-基) 氨基甲酰基) 吡啶-2-基) 胍甲酸叔丁酯 (12) 的合成



[0271] 用TFA (9mL) 处理11 (5.85g, 5.96mmol, 1.0当量) 在DCM (12mL) 中的溶液并在室温下搅拌1h。然后,加入甲苯 (30mL) 并蒸发混合物。与甲苯 (3×30mL) 共蒸发得到油状物,将其真空干燥。残余物溶解在DMF (25mL) 中并用6-(2-(叔丁氧基羰基) 胍基) 烟酸 (1.79g, 7.06mmol, 1.2当量)、Hünig碱 (4.69mL, 26.8mmol, 4.5当量) 和HATU (2.49g, 6.56mmol, 1.1当量) 处理。室温下30min之后, 反应混合物用DCM (150mL) 稀释并用水 (3×100mL) 洗涤。

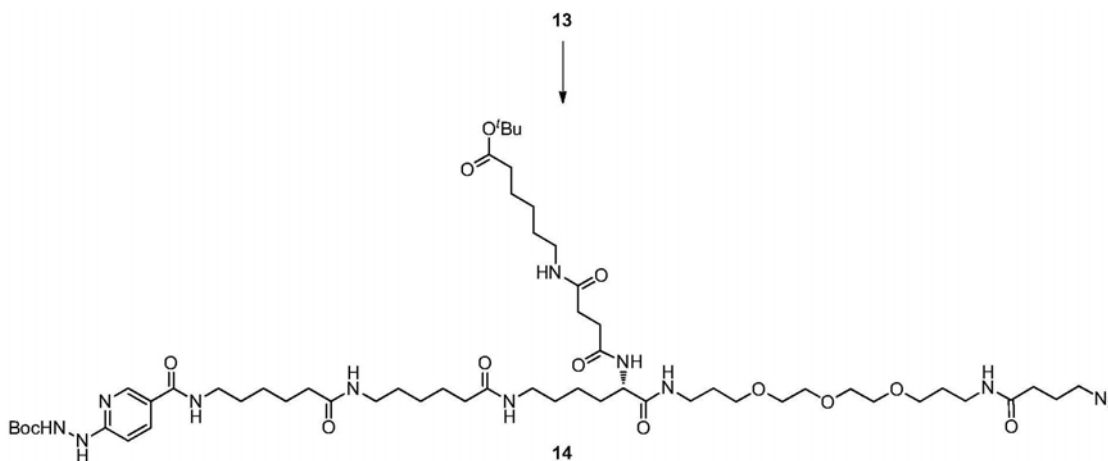
[0272] 产物用快速色谱 (100g SiO₂; DCM, 然后DCM/MeOH 90:10) 纯化, 以得到12 (5.01g, 75%), 为无色泡沫状固体。

[0273] 8. (S) -22-(4-(6-(6-(6-(2-(叔丁氧基羰基) 胍基) 烟酰胺基) 己酰胺基) 己酰胺基) 丁基) -5,21,24,27-四氧代-4,10,13,16-四氧杂-6,20,23,28-四氮杂三十四烷-1-烯-34-酸叔丁酯 (13) 的合成



[0275] 用哌啶 (2mL) 处理12 (4.99g, 4.47mmol, 1.0当量) 在DMF (15mL) 中的溶液并在室温下搅拌1h。然后,加入甲苯 (15mL) 并蒸发混合物。与甲苯 (3×15mL) 共蒸发得到油状物,将其真空干燥。残余物溶解在DMF (15mL) 中,并用6 (1.54g, 5.36mmol, 1.2当量)、三乙胺 (2.65mL, 19.0mmol, 4.3mmol) 和HATU (1.87g, 4.92mmol, 1.1当量) 处理。室温下30min之后,反应混合物用乙酸乙酯 (300mL) 稀释并用水 (3×300ml) 以及5%LiCl水溶液 (1×300mL) 洗涤。产物用快速色谱 (75g SiO₂;DCM, 然后DCM/MeOH 15:1, 然后DCM/MeOH 9:1) 纯化,以得到13 (4.69g, 90%), 为无色泡沫状固体。

[0276] 9. (S)-1-叠氮-21-(4-(6-(6-(6-(2-(叔丁氧基羰基)肼基)烟酰胺基)己酰胺基)己酰胺基)丁基)-4,20,23,26-四氧代-9,12,15-三氧杂-5,19,22,27-四氮杂三十三烷-33-酸叔丁酯(14)的合成

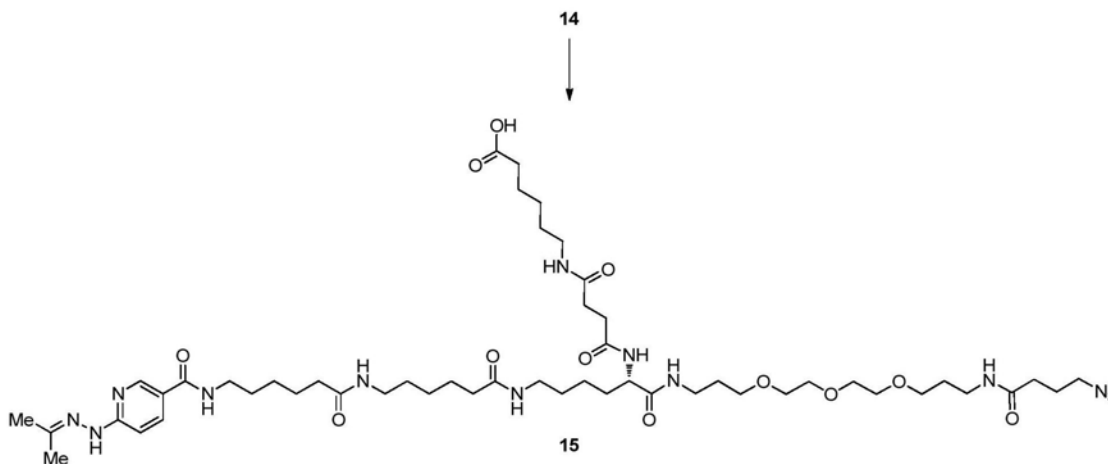


[0278] 用二乙胺 (0.54mL, 5.27mmol, 4.5当量) 处理13 (1.41g, 1.17mmol, 1.0当量) 在MeOH (4mL) 中的溶液,然后用Pd (PPh₃)₄ (67.6mg, 0.0585mmol, 5mol%) 和PPh₃ (33.8mg, 0.129mmol, 10mol%) 在DCM (8mL) 中的溶液处理。室温下30min之后,蒸发反应混合物。与甲苯 (3×15mL) 共蒸发得到油状物,将其真空干燥。残余物溶解在DMF (5mL) 中,并用γ-叠氮丁酸 (0.201g, 1.55mmol, 1.3当量)、三乙胺 (0.25mL, 1.76mmol, 4.3mmol) 和HATU (0.489g, 1.29mmol, 1.1当量) 处理。室温下1h之后,反应混合物用甲苯 (30mL) 稀释并蒸发。用甲苯 (3

×30ml) 共蒸发得到深色油状物。产物用快速色谱 (15g SiO₂;DCM, 然后DCM/MeOH90:10, 然后DCM/MeOH 80:20) 纯化。包含产物的部分用反相C-18色谱 (水/乙腈75:25, 然后70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50) 进一步纯化, 以得到14 (0.94g, 62%)。

[0279] 10. (S)-1-叠氮-4,20,23,26-四氧代-21-(4-(6-(6-(6-(2-(丙-2-亚基)胍基)烟酰胺基)己酰胺基)己酰胺基)丁基)-9,12,15-三氧杂-5,19,22,27-四氮杂-三十三烷-33-酸 (15) 的合成

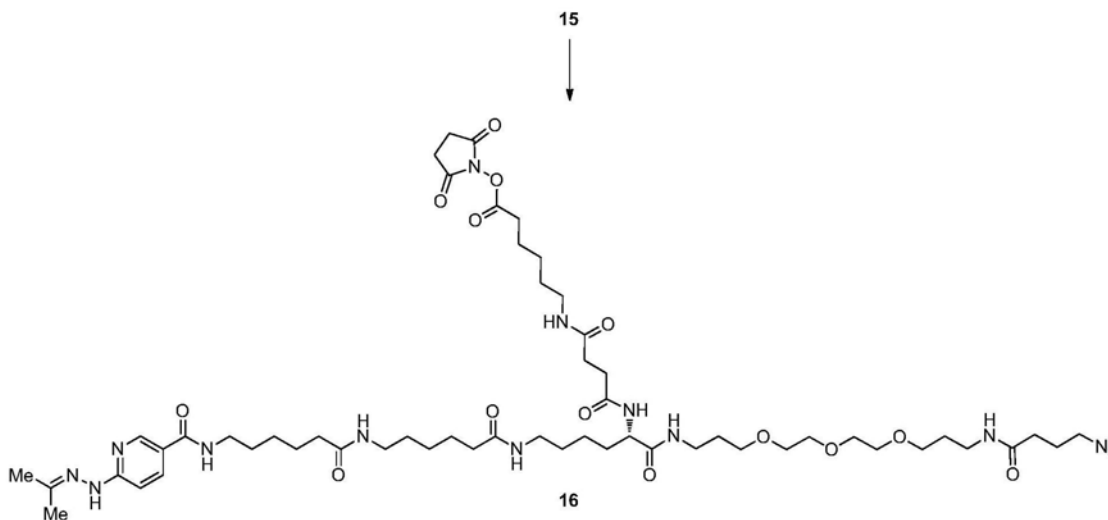
[0280]



[0281] 将6M HCl水溶液 (10mL) 加入到14 (0.85g, 0.71mmol), 并且在室温下搅拌溶液。20min之后, 清液在冰浴中冷却。加入2M NaOH水溶液 (31mL, 预先用HCl溶液滴定) 并将中和的溶液冻干。残余物在MeOH/丙酮1:1 (50ml) 中悬浮, 并且在40℃下减压蒸发挥发物。该过程再重复2次。然后, 过滤悬浮液, 固体用MeOH/丙酮1:1 (100ml) 洗涤, 并蒸发滤液。产物用反相C-18色谱 (水/丙酮/三乙胺90:10:1, 然后水/丙酮/乙腈85:10:5) 纯化, 以得到15 (0.39g, 51%), 为浅灰色固体泡沫。

[0282] 11. HATRIC (16) 的合成

[0283]



[0284] 用Hünig碱 (100μL, 0.56mmol, 2.0当量)、N-羟基琥珀酰亚胺 (65mg, 0.56mmol, 2.0当量) 以及N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (143mg, 0.56mmol, 2.0当量) 处理15 (300mg, 0.28mmol) 在DMF (15mL) 中的悬浮液并在40℃下搅拌90min。然后用甲苯 (50ml) 处理反应混合物并蒸发。与甲苯 (3×50mL) 共蒸发得到油状物, 将其真空干燥。产物通过使用Sephadex LH-20的尺寸排阻色谱 (DCM/丙酮/MeOH 8:1:1) 纯化, 以得到16 (295mg, 90%), 为橙色固体。

[0285] $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ =9.62 (br, 1H), 8.57 (dd, J =2.4, 0.8Hz, 1H), 8.25 (t, J =5.6Hz, 1H), 7.99 (dd, J =8.8, 2.4Hz, 1H), 7.95 (d, J =8.0Hz, 1H), 7.87-7.77 (m, 3H), 7.71 (t, J =5.6Hz, 2H), 7.04 (dd, J =8.8, 0.8Hz, 1H), 4.12-4.05 (m, 1H), 3.52-3.49 (m, 4H), 3.48-3.43 (m, 4H), 3.40-3.35 (m, 4H), 3.32-3.28 (m, 2H), 3.21 (q, J =7.2, 5.7Hz, 2H), 3.09-3.04 (m, 4H), 3.03-2.96 (m, 6H), 2.83-2.78 (m, 4H), 2.65 (t, J =7.3Hz, 2H), 2.39-2.26 (m, 4H), 2.13 (t, J =7.4Hz, 2H), 2.06-2.00 (m, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.73 (dq, J =7.8, 6.9Hz, 2H), 1.66-1.57 (m, 7H), 1.54-1.43 (m, 7H), 1.43-1.29 (m, 6H), 1.29-1.13 (m, 8H)

[0286] $^{13}\text{C-NMR}$ (151MHz, DMSO- d_6) δ =171.81, 171.80, 171.62, 171.60, 171.4, 171.0, 170.2, 168.9, 164.8, 159.3, 148.5, 147.7, 136.7, 120.6, 105.1, 69.8, 69.7, 69.5 (2碳), 68.1, 68.0, 52.6, 50.3, 38.9, 38.29, 38.25, 38.2, 35.9, 35.8, 35.4, 32.2, 31.5, 30.73, 30.71, 30.7, 30.1, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.6, 26.20, 26.15, 25.43, 25.42, 25.14, 25.13, 25.1, 24.5, 23.9, 23.0, 17.0

[0287] IR (纯, $\nu_{\text{最大}}/\text{cm}^{-1}$) 3287, 2930, 2858, 2099, 1738, 1631, 1603, 1538, 1364, 1256, 1206, 1121, 1068, 712, 644

[0288] ESI-MS: $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{N}_{14}\text{NaO}_{14}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 的计算值: 1193.6653; 发现值: 1193.6668

[0289] $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -4.0$ ($c=0.2$, MeOH)

[0290] 实施例2-用与HATRIC (从实施例1获得) 缀合的表皮生长因子在H358支气管细胞上在pH7.4下进行基于配体的受体捕获

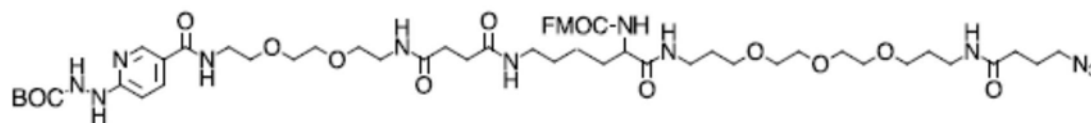
[0291] 在样品反应中, 300 μg EGF与70 μg 三官能交联剂HATRIC (从实施例1获得) 偶联。在对照反应中, 70 μg HATRIC配体反应性官能团用等摩尔量的甘氨酸淬灭。该过程对应于步骤(i)。制备3个重复用于甘氨酸淬灭的HATRIC的处理, 并且制备3个重复用于EGF淬灭的HATRIC的处理。制备意味着根据步骤(i)和(ii), 对于6个样品中的每一个, 用1.5mM NaIO_4 在pH 6.5、4 $^\circ\text{C}$ 下将H358细支气管细胞系的1500万个细胞氧化15分钟, 在细胞表面糖蛋白的碳水化合物结构上产生醛。如步骤(iv b)所述, 在5mM 2-氨基-5-甲氧基苯甲酸(XX)的存在下, 将氧化的细胞与EGF-缀合的或甘氨酸-淬灭的HATRIC在pH 7.4、4 $^\circ\text{C}$ 下孵育90分钟。随后, 根据步骤(v), 通过在含8M尿素、0.1% Rapigest的蛋白酶抑制剂中超声处理来裂解细胞。在铜催化的炔-叠氮化物环加成反应(1mM CuSO_4 , 6.25mM THPTA和2mM抗坏血酸钠在室温下18小时)中, 用炔烃琼脂糖珠捕获HATRIC标记的全序列糖蛋白。在蛋白质还原和烷基化后, 通过用1% SDS, 8M尿素, 5M NaCl, 100mM NaHCO_3 , pH11, 100mM NH_4HCO_3 和20%乙腈洗涤琼脂糖基质来除去未结合的蛋白质。这总结了该过程的步骤(vi)。最后, 通过在37 $^\circ\text{C}$ 下胰蛋白酶消化16h释放细胞表面糖蛋白的肽。脱盐后, 将肽进行MS/MS分析。根据MS1-峰强度相对量化所得质谱数据。这概括了过程的步骤(vii)和(ix)。简言之, 在整个重复中对每个糖蛋白受体总结了所鉴定的肽的丰度, 并将其与对照反应的重复中的丰度成对比较。测试该比较的统计学显著性以报告p值。使用控制实验范围内假发现率(FDR)的Benjamini-Hochberg方法调整P值来进行多重比较。糖蛋白靶受体候选物被限定为具有FDR调整的p值小于或等于0.001并且配体样品中的富集因子为四倍或更大。表皮生长因子受体(EGFR)在右上方靶框中被鉴定为EGF的糖蛋白靶受体。这一发现对应于之前公布的发现, 并证明了该方法的有效性。

[0292] 实施例3: 交联剂“TRICEPS 4.0”的合成

[0293] 1. TRICEPS中间物的合成



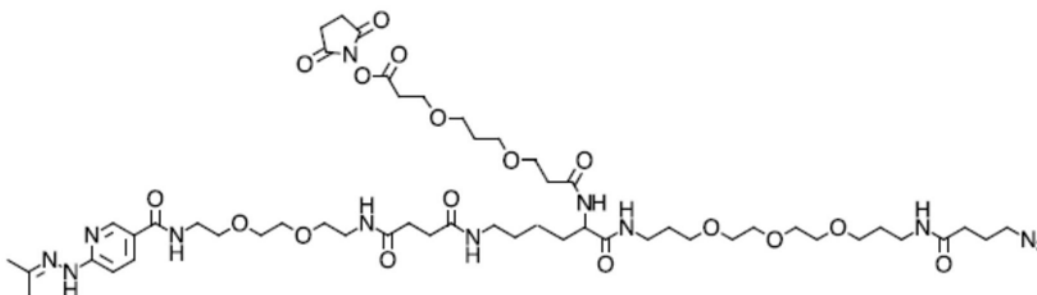
[0294]



[0295] 使用各自的起始材料,用类似于实施例1中所描述的过程获得标题化合物。

[0296] 2. TRICEPS 4.0的合成

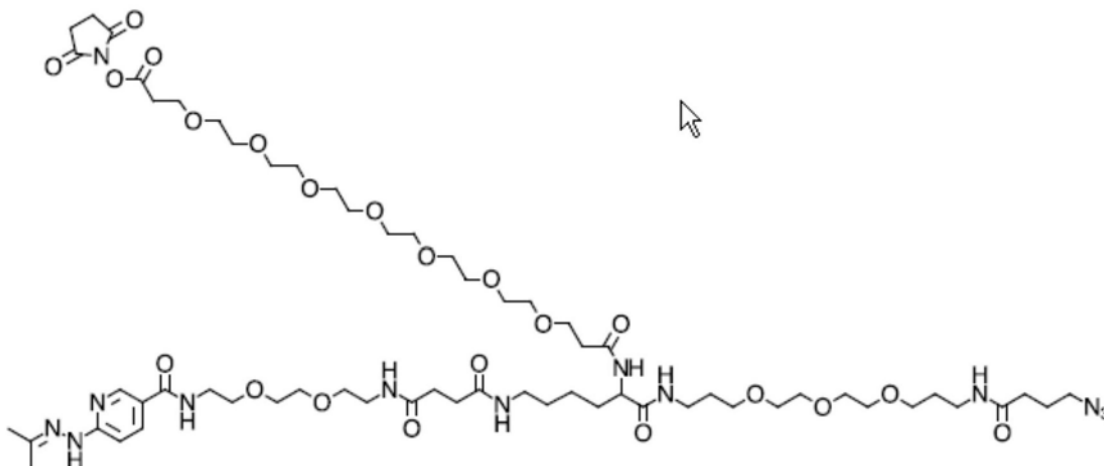
[0297]



[0298] 使用实施例3.1的化合物和各自的起始材料,用类似于实施例1中所描述的过程获得标题化合物。

[0299] 实施例4:交联剂“TRICEPS 5.0”的合成

[0300]



[0301] 使用实施例3.1的化合物和各自的起始材料,用类似于实施例1中所描述的过程获得标题化合物。

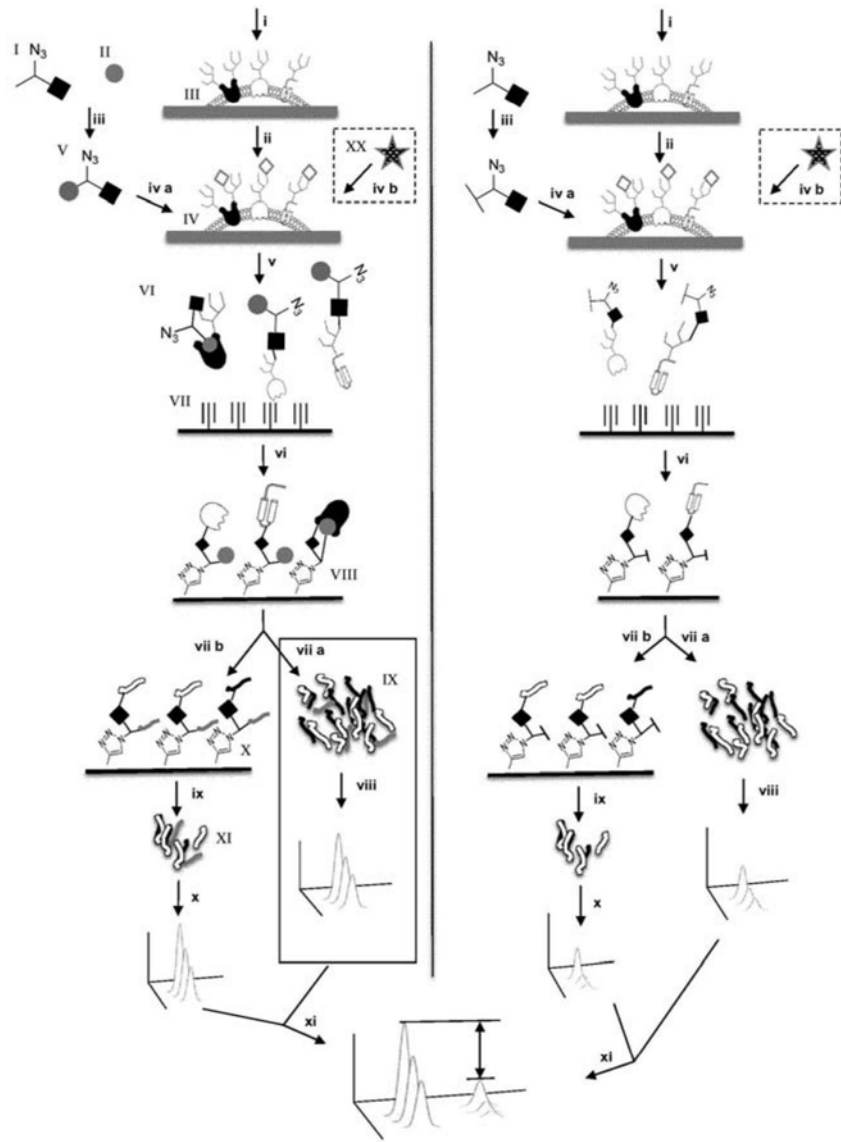


图1

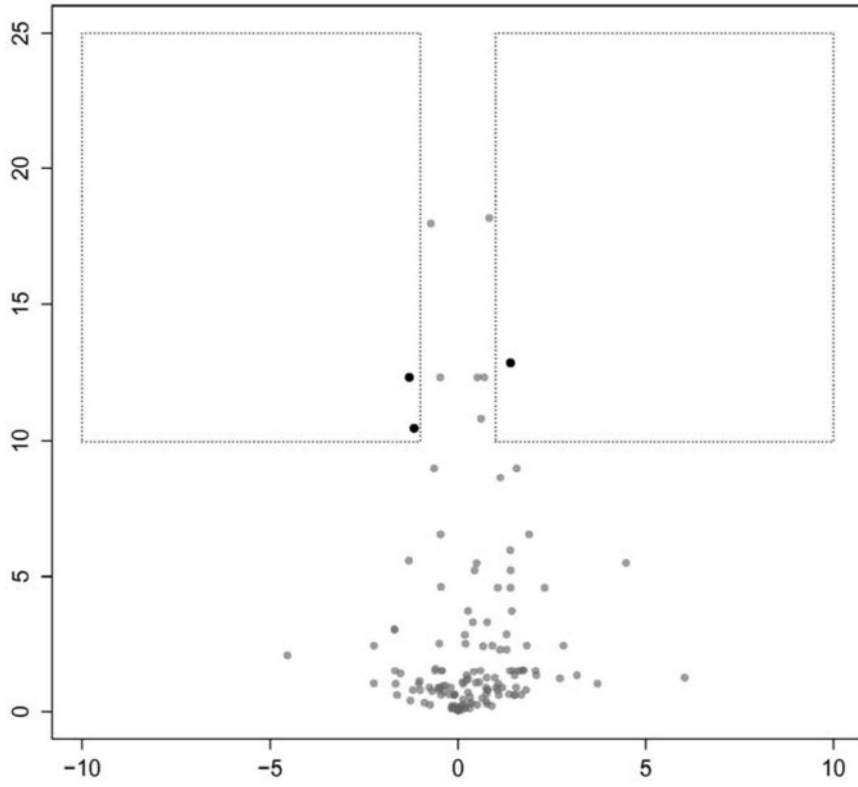


图2

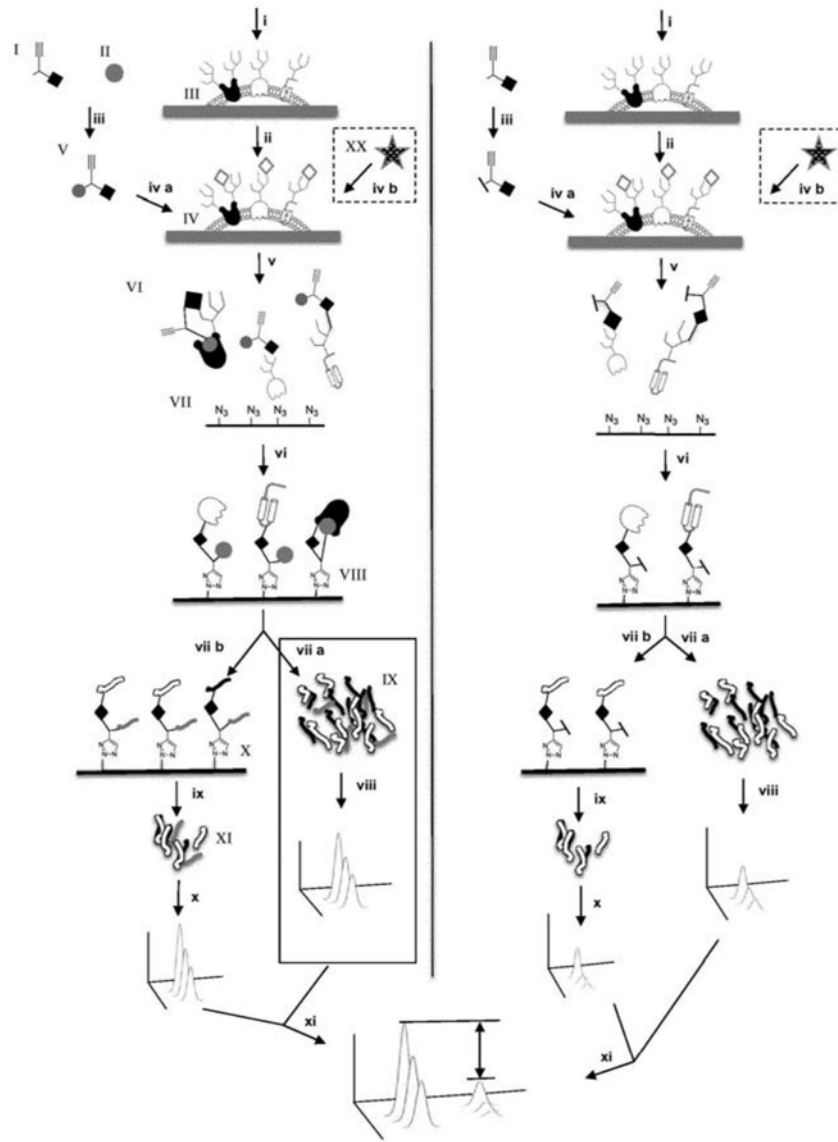


图3