(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112088168 B
(45)授权公告日 2025.02.14

(21)申请号 201980030827.8
(22)申请日 2019.03.06
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112088168 A
(43)申请公布日 2020.12.15
(30)优先权数据
18160384.6 2018.03.07 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/055509 2019.03.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/170710 EN 2019.09.12
(73)专利权人 柏林合作研究学会
地址 德国柏林
专利权人 路德维希-马克西米利安慕尼黑大学
(72)发明人 C·克里斯蒂安 A·L·鲍曼 M-A·卡斯帕 S·拜恩 J·赫尔马-斯梅茨 H·莱昂哈特 T·斯托切克 M·格拉克 D·舒马赫
(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理事务所(普通合伙) 11382
专利代理师 曹津燕 丁磊
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07F 9/40(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
(56)对比文件
WO 2009051025 A1,2009.04.23
Feng Gao et al..Synthesis of a phosphonate-linked aminoglycoside-coenzyme A bisubstrate and use in mechanistic studies of an enzyme involved in aminoglycoside resistance.《Chemistry》.2009,第15卷(第9期),2064-2070.
G.D.Kolomnikova et al..The vinyl esters of phosphorus acids. 32. Phosphorus-containing isothiuronium salts.Russ Chem Bull .1992,(第41期),337-341.
(续)
审查员 张若曦

权利要求书9页 说明书84页
序列表8页 附图22页

(54)发明名称

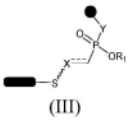
与烯烃-或炔烃-硫代膦酸酯和-膦酸酯的化学选择性巯基偶联

(57)摘要

本发明公开了新的偶联物及其制备方法。一种用于制备烯烃-或炔烃-硫代膦酸酯和-膦酸酯的方法,包括如下步骤:使式(I)的化合物与式(II)的含巯基的分子反应,其中[redacted]代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;得到式(III)的化合物。


(I)


(II)


(III)

CN 112088168 B

[转续页]

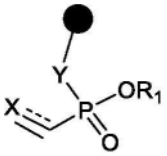
[接上页]

(56)对比文件

Qun Dang et al..Fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors. 1. Purine Phosphonic Acids as Novel AMP Mimics.Journal of Medicinal Chemistry.2009,第52卷(第9期),2880-2898.

1.用于制备硫代膦酸酯或膦酸酯的方法,其包括如下步骤:

使式(I)的化合物



(I)

其中,

代表双键或三键;

当为三键时,X代表R_3-C;

当为双键时,X代表(R_3 R_4)C;

Y代表S;

R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基;

R_3代表H;

R_4代表H;和

●代表脂肪族或芳族残基;

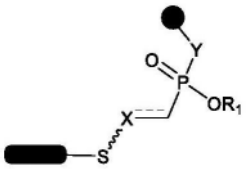
与式(II)的含巯基的分子反应



(II)

其中代表氨基酸、肽、蛋白质、寡核苷酸、糖、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;

得到式(III)的化合物



(III)

其中,若式(I)的化合物中代表双键,则代表单键;或

若式(I)的化合物中代表三键,则代表双键;和

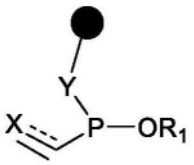
、●、R_1、X和Y如上定义。

2.根据权利要求1所述的方法,其中代表双键,X代表(R_3 R_4)C,R_3和R_4独立地代表H以及代表单键。

3.根据权利要求1所述的方法,其中代表三键,X代表R_3-C,R_3代表H以及代表双键。

4.根据权利要求1、2或3所述的方法,其进一步包括式(I)的化合物的制备,所述制备包括:

使式(IV)的化合物



(IV)

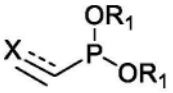
其中R_1、X、Y、和●如前述权利要求中任一项所定义;

与氧化剂反应,以生成式(I)的化合物。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述氧化剂是叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)、间氯过氧苯甲酸(mCPBA)、过氧化氢(H_2O_2)、碘(I_2)、过氧化一硫酸钾或氧气(O_2)。

6.根据权利要求1所述的方法,其进一步包括式(I)的化合物的制备,所述制备包括:

使式(V)的化合物



(V)

与式(VIa)或(VIb)的化合物反应以生成式(I)的化合物;



(VIa) (VIb)

其中EWG代表吸电子基团;Hal代表选自Cl、Br和I的卤素;和

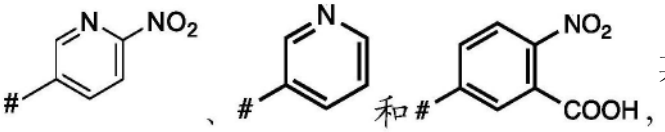
其中R_1代表任选取代的脂族或芳族残基;

代表双键或三键;

当是双键时,X代表(R_3 R_4)C,当是三键时,X代表R_3-C,以及●代表脂族和芳族残基。

7.根据权利要求5所述的方法,其中为双键,和X代表(R_3 R_4)C,其中R_3代表H,和R_4代表H。

8.根据权利要求6所述的方法,其中所述吸电子基团EWG选自

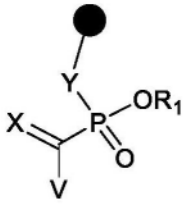


其中#表示S的位置。

9.根据权利要求6所述的方法,其中Hal代表Cl。

10.用于制备硫代膦酸酯的方法,其包括如下步骤:

使式(I*)的化合物



(I*)

其中,

V代表C_1-C_8-烷基;

X代表$(R_3\ R_4)C$;

其中●、Y、R_1、R_3和R_4如权利要求1中所定义;

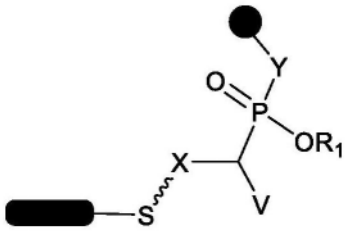
与式(II)的含巯基的分子反应



(II)

其中如权利要求1中所定义;

得到式(III*)的化合物



(III*)

其中V代表C_1-C_8烷基;

X代表$(R_3\ R_4)C$;和

、●、R_1、R_3、R_4和Y如权利要求1所定义。

11.根据权利要求10所述的方法,其中式(I*)和式(III*)中的V代表甲基、乙基或丙基。

12.根据权利要求10所述的方法,其中式(I*)和式(III*)中的V代表甲基。

13.根据权利要求1所述的方法,其中R_1代表任选地被如下的至少一个取代的C_1-C_8-烷基:其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、F、Cl、Br、I、-NO_2、-N(C_1-C_8-烷基)H、-NH_2、-N_3、-N(C_1-C_8-烷基$)_2$、=O、C_3-C_8-环烷基、-S-S-(C_1-C_8-烷基)、其中n为1、2、3、4、5或6的羟基-$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、C_2-C_8-烯基、C_2-C_8-炔基;或

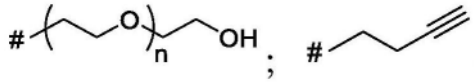
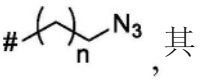
R_1代表任选独立地被如下的至少一个取代的苯基:C_1-C_8-烷基、其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、F、Cl、I、Br、-NO_2、-N(C_1-C_8-烷基)H、-NH_2或-N(C_1-C_8-烷基$)_2$;或

R_1代表5-或6-元杂芳族系统。

14.根据权利要求1所述的方法,其中R_1代表甲基、乙基、丙基或丁基。

15.根据权利要求1所述的方法,其中R_1代表甲基或乙基;吡啶基;被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的C_1-C_8-烷基;被$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$取代的C_1-C_8-烷基,其中n是1、2、3、4、5或6;被任选取代的苯基取代的C_1-C_8烷基;苯基;或被-NO_2取代的苯基。

16.根据权利要求1所述的方法,其中R_1代表其中n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的

；；或其中n＝0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的，其中#代表O的位置。

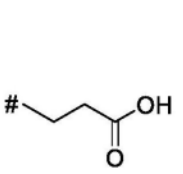
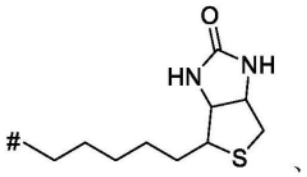
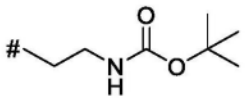
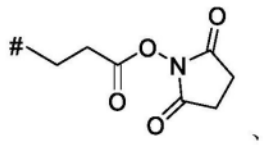
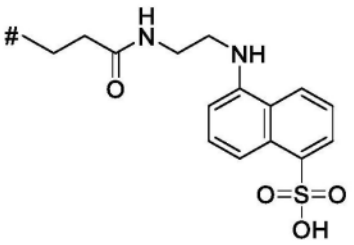
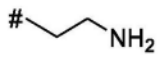
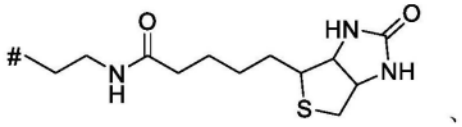
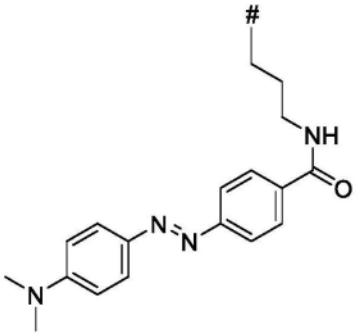
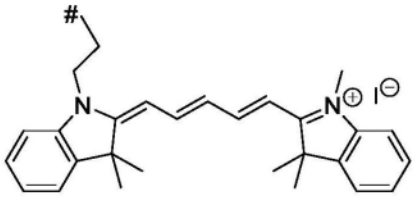
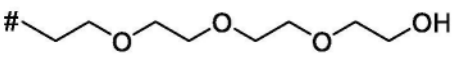
17.根据权利要求1所述的方法，其中●代表小分子；或

●代表任选取代的苯基；或

●代表放射性或非放射性核素、生物素、报告酶、寡核苷酸、荧光团、氨基酸、肽或任选取代的5-或6-元杂芳族系统；其中任选地，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

18.根据权利要求17所述的方法，其中●代表任选取代的C_1-C_8-烷基。

19.根据权利要求17所述的方法，其中·代表乙基、-CH_2-苯基、

、、、、、、、、或，其中#表示Y的位置。

20.根据权利要求1所述的方法，其中·代表：

生物素；或

·代表CY_5或EDANS；或

·代表苯基，所述苯基任选地被独立地选自未取代或被选自C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2的1个取代基取代的C_1-C_8-烷基、C_1-C_8-烷氧基、卤素、-CN、-NO_2、-NH_2、-N(C_1-C_8-烷基)、-N(C_1-C_8-烷基)$_2$、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)、-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基)、-C(O)N-(C_1-C_8-烷基)、-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基)的1、2、3、4或5个取代基取代；或

●代表C_1-C_8-烷基，所述C_1-C_8-烷基任选地被选自如下的至少一个第1代取代基取代，所述第1代取代基选自：C_3-C_8-环烷基；具有3至8个环成员的杂环基，其中杂原子选自N、O、S；C_1-C_8-烷氧基；卤素；-CN；-NO_2；-NH_2；-N(C_1-C_8-烷基)；-N(C_1-C_8-烷基)$_2$；-COOH；-COO(C_1-C_8-

烷基)；-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基)；-$CONH_2$；-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$；-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基)；-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基)、苯基或杂芳族系统、单糖、多糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、氨基酸、荧光团,其中所述第1代取代基可未被取代或被选自以下的第2代取代基取代:C_3-C_8-环烷基;具有3至8个环成员的杂环基,其中杂原子选自N、O、S;C_1-C_8-烷氧基;卤素;-CN;-NO_2;-NH_2;-N(C_1-C_8-烷基)；-N(C_1-C_8-烷基)$_2$；-COOH;-COO(C_1-C_8-烷基)；-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基)；-$CONH_2$；-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$；-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基)；-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基)、苯基或杂芳族系统,和其中所述第2代取代基可再次被选自相同组的至少一个取代基取代,和其中此类取代可进行至3、4、5、6、7、8、9或10代;或

●代表氨基酸、肽、蛋白质、寡核苷酸、糖、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;其中任选地所述·进一步包含与Y结合的连接子;或

●代表抗体或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

21.根据权利要求1所述的方法,其中●代表药物、荧光团、生物素、蛋白质、肽或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

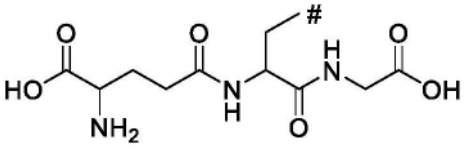
22.根据权利要求1所述的方法,其中●代表蛋白质标签、CY_5、EDANS、生物素、抗体或寡核苷酸;其中任选地,●进一步包含结合至所述Y的连接子。

23.根据权利要求1所述的方法,其中●代表连接子或连接子-药物偶联物。

24.根据权利要求1所述的方法,其中━代表氨基酸、肽、蛋白质或寡核苷酸。

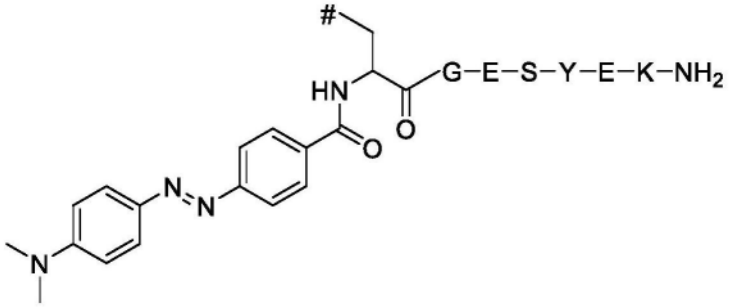
25.根据权利要求1所述的方法,其中━代表抗体,GFP蛋白或eGFP蛋白,白蛋白,或三肽。

26.根据权利要求1所述的方法,其中━代表IgG抗体或式(VIII)的肽



(VIII),

或式(IX)的肽



(IX),

其中#代表S的位置。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述IgG抗体是西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗。

28.根据权利要求1所述的方法,其中

━代表抗体,和

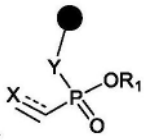
·代表荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

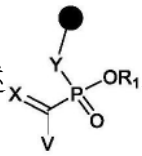
29.根据权利要求28的方法,其中:(i)所述荧光团是Cy5或EDANS;(ii)所述蛋白质是蛋白质标签。

30.根据权利要求1所述的方法,其中

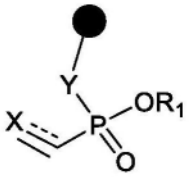
▬代表抗体,和

●代表连接子、药物或连接子-药物偶联物。

31.根据权利要求1所述的方法,其中所述和所述▬—SH在同一个分子中。

32.根据权利要求10所述的方法,其中所述和所述▬—SH在同一个分子中。

33.一种式(I)的化合物



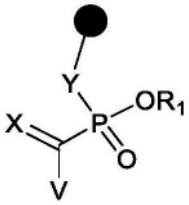
(I)

其中●、、R_1、X和Y如权利要求1所定义。

34.根据权利要求33所述的化合物,其中代表双键,X代表$(R_3R_4)C$,和R_3和R_4代表H。

35.根据权利要求33所述的化合物,其中代表三键,X代表R_3-C,和R_3代表H。

36.一种式(I*)的化合物

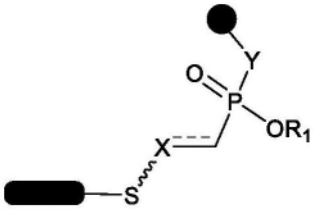


(I*)

其中X代表$(R_3\ R_4)C$,和R_1、R_3、R_4、Y和●如权利要求1所定义;以及

V代表C_1-C_8-烷基。

37.一种式(III)的化合物



(III)

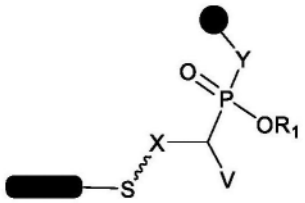
其中

代表单键,和X代表$(R_3\ R_4)C$,其中R_3和R_4代表H;或

代表双键,和X代表R_3C,R_3代表H;和

、●、R_1和Y如权利要求1所定义。

38.一种式(III*)的化合物



(III*)

其中X代表$(R_3\ R_4)C$,和、●、Y、R_1、R_3和R_4如权利要求1所定义;以及

V代表C_1-C_8-烷基。

39.根据权利要求36或38所述的化合物,其中V代表甲基、乙基或丙基。

40.根据权利要求36或38所述的化合物,其中V代表甲基。

41.根据权利要求36、37或38所述的化合物,其中R_1代表任选地被如下的至少一个取代的C_1-C_8-烷基,其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、F、Cl、Br、I、$-NO_2$、-N(C_1-C_8-烷基)H、$-NH_2$、$-N_3$、-N(C_1-C_8-烷基$)_2$、=O、C_3-C_8-环烷基、-S-S-(C_1-C_8-烷基)、其中n为1、2、3、4、5或6的羟基-$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、C_2-C_8-烯基、C_2-C_8-炔基;或

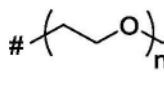
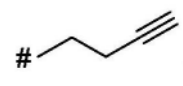
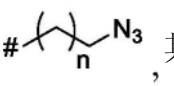
R_1代表任选独立地被如下的至少一个取代的苯基:C_1-C_8-烷基、其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、F、Cl、I、Br、$-NO_2$、-N(C_1-C_8-烷基)H、$-NH_2$或-N(C_1-C_8-烷基$)_2$;或

R_1代表5-或6-元杂芳族系统。

42.根据权利要求36、37或38所述的化合物,其中R_1代表吡啶;C_1-C_8-烷基;被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的C_1-C_8-烷基;被其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$取代的C_1-C_8-烷基;被任选取代的苯基取代的C_1-C_8-烷基;或苯基;或被$-NO_2$取代的苯基。

43.根据权利要求36、37或38所述的化合物,其中R_1代表甲基、乙基、丙基或丁基。

44.根据权利要求43所述的化合物,其中R_1代表甲基或乙基。

45.根据权利要求37所述的化合物,其中R_1代表其中n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的;;或其中n=0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的,其中#代表O的位置。

46.根据权利要求37所述的化合物,其中●代表药物、荧光团、生物素、蛋白质、肽或寡

核苷酸,其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

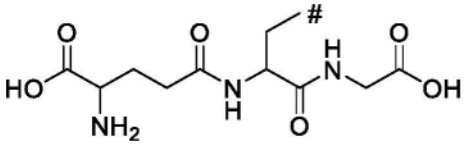
47.根据权利要求37所述的化合物,其中●代表连接子或连接子-药物偶联物。

48.根据权利要求37所述的化合物,其中▬代表氨基酸、肽、蛋白质或寡核苷酸。

49.根据权利要求48所述的化合物,其中所述蛋白质是抗体。

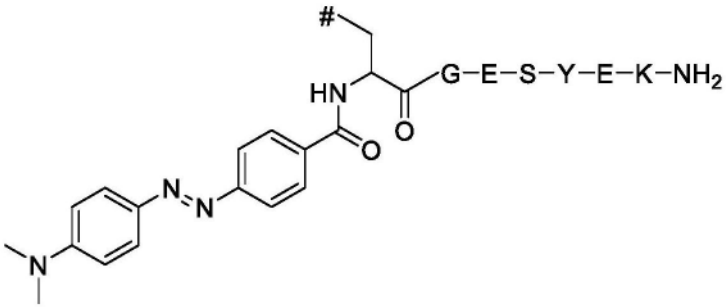
50.根据权利要求37所述的化合物,其中▬代表IgG抗体,GFP蛋白或eGFP蛋白,白蛋白,或三肽。

51.根据权利要求37所述的化合物,其中▬代表西妥昔单抗、曲妥珠单抗、本妥昔单抗或式(VIII)的肽



(VIII),

或式(IX)的肽



(IX),

其中#代表S的位置。

52.根据权利要求37所述的化合物,其中

▬代表抗体,和

●代表荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

53.根据权利要求37所述的化合物,其中

▬代表蛋白质,和

●代表荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述·进一步包含与Y结合的连接子。

54.根据权利要求37所述的化合物,其中

▬代表肽,和

●代表荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

55.根据权利要求37所述的化合物,其中

▬代表氨基酸,和

●代表荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述·进一步包含与Y结合的连接子。

56.根据权利要求37所述的化合物,其中

▬代表抗体,和

•代表连接子、药物或连接子-药物偶联物。

57.根据权利要求37所述的化合物,其中

代表寡核苷酸,和

•代表肽、蛋白质、寡核苷酸、荧光团、生物素或小分子;其中任选地所述•进一步包含与Y结合的连接子。

58.根据权利要求37所述的化合物,其中

代表寡核苷酸,和

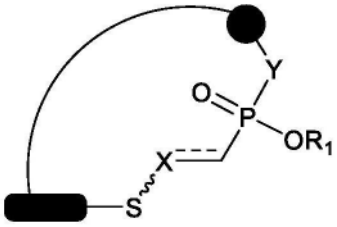
•代表连接子。

59.根据权利要求46、52-55和57中任一项所述的化合物,其中所述荧光团为Cy5或EDANS。

60.根据权利要求52或55所述的化合物,其中所述蛋白质是蛋白质标签。

61.根据权利要求46、53、54和57中任一项所述的化合物,其中所述蛋白质是蛋白质标签或抗体。

62.一种式(IIIa)的化合物



(IIIa),

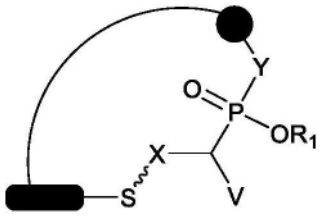
其中

代表单键,和X代表$(R_3\ R_4)C$;或

代表双键,和X代表R_3-C;和

、•、R_1、X和Y如权利要求1所定义。

63.一种式(III*a)的化合物



(III*a),

其中X代表$(R_3\ R_4)C$,和、•、Y、R_1、R_3和R_4如权利要求1所定义,以及

V代表C_1-C_8-烷基。

64.根据权利要求63所述的化合物,其中V是甲基、乙基或丙基。

65.根据权利要求63所述的化合物,其中V是甲基。

与烯烃-或炔烃-硫代膦酸酯和-膦酸酯的化学选择性巯基偶联

背景技术

[0001] 化学选择性反应和生物正交反应已经成为蛋白质位点特异性修饰的有力工具(Hackenberger,C.P.R.;Schwarzer,D.Angew.Chemie-Int.Ed.2008,47(52),10030;Spicer,C.D.;Davis,B.G.Nat.Commun.2014,5,4740)。通过这些反应,可以得到各种蛋白质-和抗体-偶联物,它们携带功能性模块,这些功能性模块如荧光团和其它光谱标记、聚合物、毒素以及类似翻译后蛋白修饰的小分子和蛋白质。因此,从蛋白质生物学功能研究和发展新的成像技术,到前景光明的新诊断医学手段、基于蛋白质的药物设计和药物的靶向递送,化学选择性的蛋白质修饰技术极大地促进了这些基础研究。

[0002] 近年来,研究人员主要关注修饰蛋白质的生物正交反应工程中的两个不同方面(Sletten,E.M.;Bertozzi,C.R.Angew.Chemie-Int.Ed.2009,48(38),6974)。一方面,很多努力致力于快速反应,此类快速反应需要高反应性起始原料用于蛋白质侧链中存在的独特功能的转化(Patterson,D.M.;Nazarova,L.A.;Prescher,J.A.ACS Chem.Biol.2014,9(3),592;Lang,K.;Chin,J.W.ACS Chem.Biol.2014,9(1),16)。伴随着这种方法出现的还有实现位点特异性标记的高级琥珀抑制技术,从而产生了许多基因编码的、高反应性的生物正交报告器(reporter)来经历各种类型的环加成反应,包括应变促进的炔烃-叠氮化物环加成或逆需求的狄尔斯-阿尔德反应(inverse-demand Diels-Alder reaction)(Nikic,I.;Plass,T.;Schraidt,O.;Szymaski,J.;Briggs,J.A.G.;Schultz,C.;Lemke,E.A.Angew.Chemie-Int.Ed.2014,53(8),2245;Agard,N.J.;Prescher,J.A.;Bertozzi,C.R.J.Am.Chem.Soc.2004,126(46),15046)。另一方面,研究人员已经专注于开发和应用高收率的蛋白修饰反应,特别是当需要大量功能性蛋白偶联物和理想的定量转化以避免繁琐的纯化步骤(1)时。为了实现这一目标,蛋白质表达方面的高收率尤为重要。由于琥珀抑制可导致低含量表达的蛋白质,标准和营养缺陷表达系统往往是优选的。结合标准蛋白表达实现位点特异性标记的常用方案是将独特的半胱氨酸(Cys)残基通过位点定向诱变放置在选择的蛋白质中,随后进行半胱氨酸修饰策略(Chalker,J.M.;Bernardes,G.J.L.;Lin,Y.A.;Davis,B.G.Chem.-An Asian J.2009,4(5),630)。或者,可以利用营养缺陷表达系统引入含叠氮-或炔烃-的氨基酸(Hoesl,M.G.;Budisa,N.Angew.Chemie-Int.Ed.2011,50(13),2896),可以使用施陶丁格(Staudinger)连接和铜催化叠氮-炔烃环加成(CuAAC)对这些氨基酸进行修饰(Artner,L.M.;Merkel,L.;Bohlke,N.;Beceren-Braun,F.;Weise,C.;Dernedde,J.;Budisa,N.;Hackenberger,C.P.R.Chem.Commun.2012,48(4),522;van Kasteren,S.I.;Kramer,H.B.;Jensen,H.H.;Campbell,S.J.;Kirkpatrick,J.;Oldham,N.J.;Anthony,D.C.;Davis,B.G.Nature 2007,446(7139),1105)。

[0003] 虽然这两个方面近年来都已经取得了显著进展,但是对于无金属的化学选择性修饰反应,高反应性和复杂功能性模块的通用和模块化可得性仍然往往是具有挑战性的。这是由于合成反应性构建模块时需要另外的基团保护操作,由于所用的功能性基团的高反应性和不稳定性,该操作可能会出现问题。例如,合成一种用于分子成像的携带Xe-隐黄素的

高反应性含环辛烷的荧光肽,需要利用操作繁琐且产率低的正交保护基团(Witte,C.;Martos,V.;Rose,H.M.;Reinke,S.;Klippel,S.;Schröder,L.;Hackenberger,C.P.R.Angew.Chemie-Int.Ed.2015,54(9),2806)。

[0004] 以往的Cys残基偶联技术主要依赖马来酰亚胺偶联。然而,马来酰亚胺偶联物往往是不稳定的,特别是在高浓度硫醇下,其往往容易水解并发生巯基交换。关于Cys偶联技术的最新综合性综述参见Gunnoo,S.B.;Madder,A.;ChemBioChem.2016,17,529-553。作为可选的偶联方法,WO 2015/169784公开了一种用于制备C2-二硫化物桥联肽和蛋白质的方法,其中桥联是通过与炔烃的巯基-炔-反应来实现的。US2535174描述了饱和脂肪族硫醇和乙烯磷酸的酯的碱催化加成反应。J.Bertran-Vicente等人,Nature Comm.2016,7,DOI:10.1038/ncomms12703描述了一种序列,其中被保护的亚磷酸首先与亲电子二硫化物反应以生成硫代磷酸酯,该硫代磷酸酯在(例如通过UV光或碱)脱保护时产生磷酸化的半胱氨酸。该方法已应用于天然存在的磷酸化半胱氨酸肽的合成。

[0005] 本发明的目的是提供制备偶联物的其他方法,并提供其它偶联物。

[0006] 发明详述

[0007] 定义

[0008] 本领域技术人员知晓,在本申请中使用的术语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可根据情况指“一(1)个/种”“一(1)个/种或多个/种”或“至少一(1)个/种”。

[0009] 卤素,除非另有定义:指第7主族元素,优选氟、氯、溴和碘,更优选氟、氯和溴,并且当与镁(Mg)组合时甚至更优选溴。

[0010] 烷基,除非别处另有定义:指具有优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-碳原子的饱和直链或支链烃基。例如:甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基,等。

[0011] 烯基,除非别处另有定义:指具有双键的不饱和直链或支链烃基。烯基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯基。例如:乙烯基、1-丙烯基、3-丁烯基,等。

[0012] 炔基,除非别处另有定义:指具有三键的不饱和直链或支链烃基。炔基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-炔基。例如:乙炔基、1-丙炔基,等。

[0013] 烷氧基(烷基自由基-O-),除非别处另有定义:指通过氧原子(-O-)连接到基本结构上的烷基自由基。烷氧基优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-烷氧基。例如:甲氧基、乙氧基、丙氧基、1-甲基乙氧基,等。

[0014] 类似地,除非别处另有定义,烯氧基和炔氧基分别是通过-O-连接到基本结构上的烯基自由基和炔基自由基。烯氧基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯氧基。炔氧基优选(C_3-C_{10})-、(C_3-C_6)-或(C_3-C_4)-炔氧基。

[0015] 烷基羰基(烷基自由基-C(=O)-),除非另有定义:烷基羰基优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-烷基羰基。此处,碳原子的数目是指烷基羰基中的烷基自由基。

[0016] 类似地,除非别处另有定义,烯基羰基和炔基羰基分别是:通过-C(=O)-连接到基本结构上的烯基自由基和炔基自由基。烯基羰基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯基羰基。炔基羰基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-炔基羰基。

[0017] 烷氧基羰基(烷基自由基-O-C(=O)-),除非别处另有定义:烷氧基羰基优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-烷氧基羰基。此处,碳原子的数目是指烷氧基羰基中的烷基自由基。

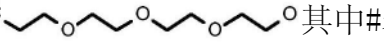
[0018] 类似地,除非别处另有定义,烯氧基羰基和炔氧基羰基分别是:通过-O-C(=O)-连接到基本结构上的烯基自由基和炔基自由基。烯氧基羰基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯氧基羰基。炔氧基羰基优选(C_3-C_8)-、(C_3-C_6)-或(C_3-C_4)-炔氧基羰基。

[0019] 烷基羰基氧基(烷基自由基-C(=O)-O-),除非别处另有定义:指通过羰基氧基(-C(=O)-O-)经氧原子连接到基本结构上的烷基自由基。烷基羰基氧基优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-烷基羰基氧基。

[0020] 类似地,除非别处另有定义,烯基羰基氧基和炔基羰基氧基分别是:通过(-C(=O)-O-)连接到基本结构上的烯基自由基和炔基自由基。烯基羰基氧基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯基羰基氧基。炔基羰基氧基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-炔基羰基氧基。

[0021] 烷基硫基,除非别处另有定义:指通过-S-连接到基本结构上的烷基自由基。烷基硫基优选(C_1-C_8)-、(C_1-C_6)-或(C_1-C_4)-烷基硫基。

[0022] 类似地,除非别处另有规定,烯基硫基和炔基硫基分别是:通过-S-连接到基本结构上的烯基自由基和炔基自由基。烯基硫基优选(C_2-C_8)-、(C_2-C_6)-或(C_2-C_4)-烯基硫基。炔基硫基优选(C_3-C_8)-、(C_3-C_6)-或(C_3-C_4)-炔基硫基。

[0023] 除非别处另有定义,所用术语“取代的”或“任选取代的”指非常广泛的取代方式。从本发明的公开中可以看出,尤其是位置R_1、和●允许用多种有机(大)分子取代。本发明认为,这些分子的结构与本发明公开的方法和由此产生的偶联物无关。因此,将这一新颖的有创造性的概念的原理仅限定在某些分子上则代表不适当的限制。虽然如此,本发明认为该术语分别是指有机取代基或其盐,其可分别被其它有机取代基或其盐多次取代。本申请中已制备并呈现了此类复杂取代基的实例(参见,如方案7、8、图4以及合成实施例)。优选地,术语“取代的”是指被一个或多个取代基取代的基团,所述取代基选自硝基、氰基、Cl、F、Cl、Br、-NH-R、NR_2、COOH、-COOR、-OC(O)R-NH_2、-OH、-$CONH_2$ CONHR、$CON(R)_2$、-S-R、-SH、-C(O)H、-C(O)R、(C_1-C_{20})-烷基、(C_1-C_{20})-烷氧基、(C_2-C_{20})-烯丙基、3至8个环成员的(杂)环(其中,若存在,则杂原子或原子独立地选自N、O和S),具有5到12个环原子的(杂)芳族系统(例如,苯基、吡啶基、萘基等),其中R可以再次代表这些取代基中的任何一个,并且所述取代可以重复多次,例如,取代可以重复1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次;参见,如下的●取代基:其中#表示Y(本文所用化合物中的硫或氧)的位置,如果●已经是如式(I)或(III)的化合物的一部分。然而,本领域技术人员将赞同,不能用一般的取代模式来简单描述被如具有40个单元的多糖取代的烷基链。

[0024] 本文所用术语“肽”是指包含两个或更多个通过肽键(酰胺键)共价连接的氨基酸的有机化合物。肽可根据组成氨基酸的数量命名,即二肽含有两个氨基酸残基,三肽含有三个氨基酸残基,等。含有十个或更少个氨基酸的肽可称为寡肽,而含有大于十个氨基酸残基(如具有多至约30个氨基酸残基)的肽为多肽。所述氨基酸可以形成至少一个环或带分支的或未带分支的链或它们的混合物。蛋白质和抗体是肽,因此涵盖在本术语范围内,但由于其重要性可单独命名。

[0025] 本文所用术语“氨基酸”是指具有-CH(NH_3)-COOH基团的有机化合物。在一个实施方案中,术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸:精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、丙氨酸、异亮

氨酸、亮氨酸(leicine)、苯丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甘氨酸。然而,该术语广义上也涵盖非天然存在的氨基酸。

[0026] 根据本发明的氨基酸和肽也可以用官能团进行修饰。非限制性实例是如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的糖类,或如芴基甲氧基羰基(Fmoc)-修饰或酯的保护基团。

[0027] 术语"蛋白质"是指包含一条或多条氨基酸残基长链的肽,如具有大于约30个氨基酸残基的肽。蛋白质在体内和体外发挥着广泛的功能,此类功能包括催化代谢反应、DNA复制、对刺激的应答,以及转运分子、催化反应。蛋白质被折叠成特定的三维结构。蛋白质中的残基通常是化学修饰的,例如通过翻译后修饰,从而改变蛋白质的物理和化学性质、折叠、稳定性、活性以及最终改变蛋白质的功能。有时蛋白质会附着非肽基团,可称为辅基或辅因子。包括酶和辅酶的多种蛋白质也可以协同工作以发挥一个特定的功能,且它们往往联合形成稳定的蛋白质复合物。所有这些形式都涵盖在所述术语"蛋白质"中。

[0028] 本文所用术语"蛋白质标签"指用于各种目的根据本发明可通过连接子连接到蛋白质或其它包含巯基的化合物上的肽序列。蛋白质标签的非限制性实例为亲和标签、增溶标签、色谱标签、表位标签和报告酶。

[0029] 亲和标签根据本发明通过连接子附加到蛋白质和其它包含巯基的化合物上,以便可以如利用亲和技术纯化它们。这些标签包括例如几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或聚(组氨酸)标签。

[0030] 增溶标签可以用于帮助蛋白质正确折叠,防止蛋白质沉淀。这些标签包括硫氧化还原蛋白(TRX)和聚(NANP)。一些亲和标签作为增溶剂具有双重作用,比如MBP和GST。

[0031] 色谱标签用于改变蛋白质的色谱性质,以在特定的分离技术中提供不同的分辨率。通常,这些标签由聚阴离子氨基酸组成,如FLAG-标签。

[0032] 表位标签是短肽序列,选择它们是因为可以在许多不同的种群中可靠地产生高亲和力抗体。这些标签通常来源于病毒基因。表位标签包括V5-标签、Myc-标签、HA-标签和NE-标签。这些标签对于蛋白质印迹、免疫荧光和免疫沉淀实验以及抗体纯化特别有用。

[0033] 本文所用术语"报告酶"是指使生化检测中的信号增强的任何已知的酶。此类酶的非限制性实例是,着色剂形成酶,比如碱性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶(HRP)或葡萄糖氧化酶(GOX);荧光蛋白,比如绿色荧光蛋白(GFP)、氧化还原敏感性GFP(RoGFP)、蓝色荧光蛋白(Azurite)或祖母绿荧光蛋白(Emerald);荧光素酶,即产生生物发光的一类氧化酶(例如萤火虫荧光素酶(EC 1.13.12.7));氯霉素乙酰转移酶(CAT);β-半乳糖苷酶;或β-葡萄糖醛酸酶。

[0034] 蛋白质标签的非限制性实例为:AviTag,一种允许蛋白质被BirA酶生物素化并由此可以通过链霉亲和素分离该蛋白质的肽(GLNDIFEAQKIEWHE);钙调蛋白-标签,一种被钙调蛋白结合的肽(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL);聚谷氨酸标签,一种有效结合到阴离子交换树脂(如Mono-Q)的肽(EEEEEE);E-标签,一种被抗体识别的肽(GAPVPYPDPLEPR);FLAG-标签,一种被抗体识别的肽(DYKDDDDK);HA-标签,一种被抗体识别的、来源于血凝素的肽(YPYDVPDYA);His-标签,被镍或钴螯合物结合的5-10个组氨酸(HHHHHH);Myc-标签,一种被抗体识别的、源于c-myc的肽(EQKLISEEDL);NE-标签,一种被单克隆IgG1抗体识别的、新型18个氨基酸合成肽(TKENPRSNQEESYDDNES),其可用于包括蛋白质印迹、ELISA、流式细胞术、免疫细胞化学、免疫沉淀和重组蛋白亲和纯化在内的广泛应用范围内;S-标签,一种来源于

核糖核酸酶A的肽(KETAAAKFERQHMDS);SBP-标签,一种与链霉亲和素结合的肽(MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLE HHPQGQREP);Softag 1,用于哺乳动物表达(SLAELLNAGLGGS);Softag 3,用于原核表达(TQDPSRVG);Strep-tag,一种与链霉亲和素或被称为链球菌素(streptactin)的改良链霉亲和素结合的肽(Strep-tag II:WSHPQFEK);TC标签,一种被FIAsH和ReAsH双砷化合物识别的四半胱氨酸标签(CCPGCC);V5标签,一种由抗体识别的肽(GKPIPNPLLGLDST);VSV-tag,一种被抗体识别的肽(YTDIEMNRLGK);Xpress标签(DLYDDDDK);Isopeptag,一种共价结合至pilin-C蛋白的肽(TDKDMTITFTNKKDAE);SpyTag,一种共价结合至SpyCatcher蛋白的肽(AHIVMVDAYKPTK);SnoopTag,一种共价结合至SnoopCatcher蛋白的肽(KLGDIEFIKVNK);BCCP(生物素羧基载体蛋白),一种被BirA生物化从而能够被链霉亲和素识别的蛋白结构域;谷胱甘肽-S-转移酶-标签,一种结合至固定化谷胱甘肽的蛋白;绿色荧光蛋白-标签,一种自发荧光的且可被纳米体结合的蛋白质;Halo-tag,一种共价结合至HaloLink™树脂(Promega)的突变水解酶;麦芽糖结合蛋白-标签,一种结合至直链淀粉琼脂糖的蛋白质;Nus-tag;硫氧化还原蛋白-标签;Fc-标签,源自免疫球蛋白Fc结构域,允许二聚化和增溶。可用于在蛋白质-A琼脂糖凝胶上的纯化,设计的固有无序标签含有促进无序的氨基酸(P、E、S、T、A、Q、G、……),碱性磷酸酶(AP),辣根过氧化物酶(HRP),葡萄糖氧化酶(GOX),绿色荧光蛋白(GFP),氧化还原敏感性GFP(RoGFP),蓝色荧光蛋白(Azurite),祖母绿荧光蛋白(Emerald),萤火虫荧光素酶(EC 1.13.12.7)),氯霉素乙酰转移酶(CAT),β-半乳糖苷酶,β-葡萄糖醛酸酶,微管蛋白-酪氨酸连接酶(TTL)。

[0035] 如本文所用,术语“抗体”意在指免疫球蛋白分子,优选由四条多肽链组成,其中两条重(H)链和两条轻(L)链,它们通常由二硫键相互连接。每条重链由重链可变区(本文简称VH)和重链恒定区组成。重链恒定区域可以包括例如三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链由一个轻链可变区(本文简称VL)和一个轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域(CL)组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其中穿插更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL通常由三个CDR和最多四个FR组成,它们按如以下顺序从氨基端排列到羧基端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0036] 如本文所用,术语“互补决定区”(CDR;如,CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变结构域的氨基酸残基,其存在对于抗原结合是必要的。每个可变结构域通常有三个CDR区,分别标识为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可包含来自Kabat所定义的“互补决定区”的氨基酸残基(如,轻链可变结构域中的约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3),重链可变结构域中的约残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);和/或来自“高度可变环”的那些残基(如,轻链可变结构域中的约残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中约残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3))。在某些情况下,互补决定区可以同时包括来自根据Kabat所定义的CDR区和高度可变环的氨基酸。

[0037] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整的抗体分为不同的“类”。完整抗体分为五大类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些大类可进一步分为“亚类”(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。在本发明中使用的免疫球蛋白的优选类别是IgG。

[0038] 对应于不同类抗体的重链恒定结构域分别称为[α]、[δ]、[ε]、[γ]和[μ]。不同种类免疫球蛋白的亚单位结构和三维结构是众所周知的。本文所用的抗体为常规已知的抗体及其功能性片段。

[0039] 抗体/免疫球蛋白的“功能性片段”或“抗原结合抗体片段”在本文定义为保留抗原结合区的抗体/免疫球蛋白的片段(如,IgG的可变区)。抗体的“抗原结合区”通常位于抗体的一个或多个高度可变区中,例如,CDR1、-2和/或-3区;然而,可变“框架”区也可以比如通过为CDRs提供骨架从而在抗原结合中起重要作用。优选地,“抗原结合区”至少包含可变轻(VL)链的氨基酸残基4至103和可变重(VH)链的氨基酸残基5至109,更优选包含VL的氨基酸残基3至107和VH的氨基酸残基4至111,尤其优选完整的VL和VH链(VL的氨基酸位点1至109和VH的氨基酸位点1至113;氨基酸根据WO 97/08320编号)。

[0040] 本发明的“功能性片段”、“抗原结合抗体片段”或“抗体片段”包括但不限于Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)$_2$及Fv片段;双体;单域抗体(DAb)、线性抗体;单链抗体分子(scFv);及由抗体片段构成的多特异性例如双特异性及三特异性抗体。将除“多特异性”或“多功能性”抗体外的抗体理解为具有相同的结合位点。F(ab’)$_2$或Fab可以通过工程化来减小或完全移除CH1和CL结构域之间存在的的分子间二硫的相互作用。

[0041] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区域,该区域至少包含恒定区的一部分。该术语包括原生序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸到重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可能存在,也可能不存在。除非本文另有规定,否则Fc区或恒定区氨基酸残基依据EU编号系统(也称为EU索引)编号。

[0042] 本发明所涵盖的抗体变体或抗原结合抗体片段变体是指保持了抗体或抗原结合抗体片段结合活性的分子。

[0043] 本发明中所涵盖的“结合蛋白”是例如抗体模拟物,比如亲和体(Affibody)、Adnectin、抗运载蛋白(Anticalin)、预设计锚蛋白重复蛋白(DARPin)、高亲和性多聚体(Avimer)和纳米体(Nanobody)。

[0044] 在本文中将“人”抗体或其抗原结合片段定义为非嵌合的(例如,非“人源化的”)且非(全部或部分)源于非人类物种的那些。人抗体或其抗原结合片段可以源自人或可以为合成的人抗体。本文将“合成的人抗体”定义为一种抗体,其具有的序列全部或部分源自基于已知人抗体序列分析的计算机模拟的合成序列。例如可通过分析人抗体或抗体片段序列的数据库并利用从中获得的数据设计多肽序列,从而实现计算机模拟设计人抗体序列或其片段。人抗体或其抗原结合片段的另一实例是由分离自人源抗体序列库(如,此类库基于从人的天然来源中获取的抗体)核酸编码的那些。

[0045] 在本文中将“人源化抗体”或其人源化抗原结合片段定义为一种抗体:(i)源自非人源的(如,具有异源免疫系统的转基因小鼠),该抗体基于人种系序列;(ii)其中非人抗体的框架区的氨基酸通过基因工程部分替换为人的氨基酸序列;或(iii)CDR移植的,其中可变结构域的CDR来自非人源,而可变结构域的一个或多个框架为人源的,且恒定结构域(如果有的话)为人源的。

[0046] 本文将“嵌合抗体”或其抗原结合片段定义为一种抗体,其中可变结构域源自非人源,而部分或全部恒定结构域源自人源。

[0047] 本文所用术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,即,除可能少量存在的可能的突变例如自然发生的突变外,组成该群的单个抗体都是相同的。因此,术语“单克隆的”表明抗体的特征为并非是离散抗体的混合物。与通常包括针对不同决定簇

(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每一个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除其特异性外,单克隆抗体制剂的优势在于它们通常不被其他免疫球蛋白污染。术语“单克隆的”不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。术语“单克隆抗体”具体包括嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

[0048] 一种“分离的”抗体是一种已经被识别出来并从表达它的细胞的成分中分离出来的抗体。细胞的污染物成分是会干扰抗体诊断或治疗用途的物质,此类物质可能包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶解物。

[0049] 如本文所用,抗体“特异性地结合至”是指“特异性结合至/针对”或“特异性地识别”目标抗原,例如肿瘤相关多肽抗原靶点,是一种以足够亲和力结合抗原的抗体,使得抗体可用作靶向表达所述抗原的细胞或组织的治疗剂,且不与其他蛋白质发生明显的交叉反应或者也不与除上述抗原靶点的直系同源物和变体(如突变型、剪接变体或蛋白水解截短型)以外的蛋白质发生显著的交叉反应。本文所用的术语“特异性识别”或“特异性地结合至”或“特异性结合至/针对”特定多肽或特定多肽靶点上的表位例如可以通过抗体或其抗原结合片段来表现,所述抗体或抗原结合片段对抗原的单价K_D小于约10^{-4}M,或小于约10^{-5}M,或小于约10^{-6}M,或小于约10^{-7}M,或小于约10^{-8}M,或小于约10^{-9}M,或小于约10^{-10}M,或小于约10^{-11}M,或小于约10^{-12}M,或更小。如果抗体能够将抗原和一个或多个参考抗原区分开,则该抗体“特异性地结合至”、“特异性结合至/针对”或“特异性识别”该抗原。在其最常见的形式中,“特异性结合”、“特异性地结合至”、“特异性结合至/针对”或“特异性识别”是指抗体区分目标抗原和不相关抗原的能力,例如,根据以下方法之一确定。这些方法包括但不限于表面等离子体共振(SPR)、蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、RMA-实验和肽扫描。例如,可以进行标准的ELISA测定。可以通过标准显色法进行评分(如第二抗体与辣根过氧化物酶和双氧水与四甲基联苯胺)。某些孔中的反应由例如450nm处的光密度来评分。典型的背景(=阴性反应)可以是0.1OD;典型的阳性反应可以是1OD。这意味着阳性/阴性差异大于5倍、10倍、50倍,优选大于100倍。通常,不是使用单一参考抗原,而是使用一组大约三到五个不相关的抗原,比如奶粉、BSA、转铁蛋白等进行结合特异性的测定。

[0050] “结合亲和力”或“亲和力”是指分子的单个结合位点与其结合配偶体之间总的非共价相互作用的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对成员(如抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。离解常数“K_D”通常用于描述分子(比如抗体)与其结合配偶体(比如抗原)之间的亲和力,即配体与特定蛋白质结合的紧密程度。配体-蛋白亲和力受这两个分子间的非共价分子间相互作用的影响。亲和力可通过本领域已知的常用方法,包括本文所述的那些方法来测定。在一个实施方案中,根据本发明的“K_D”或“K_D值”通过使用合适的设备利用表面等离子体共振分析来测定,所述合适的设备包括但不限于如Biacore T100、Biacore T200、Biacore 2000、Biacore 4000、Biacore 3000的Biacore仪器(GE Healthcare Biacore,Inc.)或ProteOn XPR36仪器(Bio-Rad Laboratories,Inc.)。

[0051] 本文所用术语“核苷”和“核苷部分”是指包含糖基和杂环碱基的核酸亚单位,以及该亚单位的类似物,比如经修饰或自然产生的脱氧核糖核苷或核糖核苷或其任何化学修饰。其他基团(如,保护基团)可以附加到核苷的任何组分上。核苷的修饰包括但不限于2′-、3′-和5′-位的糖修饰,5-和6-位的嘧啶修饰,2-、6-和8-位的嘌呤修饰,外向环胺

(exocyclic amine)处的修饰,5-溴尿嘧啶的取代,等等。可以通过本领域已知的方法适当地保护和衍生核苷从而实现寡核苷酸的合成,所述方法比如使用核苷亚磷酰胺单体的固相自动合成法、H-膦酸酯偶联或磷酸三酯偶联。

[0052] “核苷酸”或“核苷酸部分”指的是包含磷酸基、糖基和杂环碱基的核酸亚单元,以及该亚单元的类似物。可将其他基团(如,保护基团)附加到核苷酸的任何组分上。术语“核苷酸”可以指经修饰或自然产生的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。在一些情况中,核苷酸包含嘌呤类和嘧啶类,包括胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤和尿嘧啶。术语“核苷酸”意在包括那些部分,其不仅含有已知的嘌呤和嘧啶碱基,如腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或尿嘧啶(U),而且也含有其他经修饰的杂环碱基。此类修饰包括甲基化嘌呤或嘧啶,酰基化嘌呤或嘧啶,烷基化核糖或其它杂环。这样的修饰包括,如,二氨基嘌呤及其衍生物、肌苷及其衍生物、烷基化嘌呤或嘧啶、酰基化嘌呤或嘧啶、巯基化嘌呤或嘧啶,等等,或加保护基,如乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-芴甲氧羰基、苯氧乙酰基、二甲基甲酰胺、二丁基甲酰胺、二甲基乙酰胺、N,N-二苯基氨基甲酸酯,等等。嘌呤或嘧啶碱基也可以是前述基团的类似物;适合的类似物是本领域技术人员已知的,且记载在有关的教科书和文献中。常见的类似物包括但不限于:1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊基腺嘌呤、2-甲硫基-N6-异戊基腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、2-硫代胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-巯基鸟嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-(甲基氨基甲基)尿嘧啶、5-(羧基甲基氨基甲基)-尿嘧啶、2-巯基尿嘧啶、5-甲基-2-巯基尿嘧啶、5-(2-溴乙烯基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟乙酸、尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、肌苷、1-甲基肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、2-氨基嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、6-巯基嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。

[0053] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指由多个如上文所定义的连接的核苷酸单元形成的多核苷酸。所述核苷酸单元各自包括通过磷酸连接基团或其类似物连接在一起的核苷单元。术语“寡核苷酸”还指通过除磷酸连接基团(linkage)以外的连接基团(例如硫代磷酸酯连接基团或方酰胺连接基团)连接在一起的多个核苷。所述寡核苷酸可以是天然存在的,也可以是非天然存在的。在某些情况下,所述寡核苷酸可能包含核糖核苷酸单体(即,可以是寡核糖核苷酸)和/或脱氧核糖核苷酸单体。作为示例性实例,寡核苷酸可包含2至50个核苷酸单元,如包含2至40个核苷酸单元,如包含5至35个核苷酸单元,如包含10至35个核苷酸单元,如包含15至30个核苷酸单元。

[0054] 本文所用术语“单糖”指通式为$C_m(H_2O)_n$的开链或环状化合物,其中m是3、4、5、6、7或8且n是2、3、4、5、6、7或8。然而,该术语还涵盖这些基本化合物的衍生物,其中一个羟基(OH)被一个氨基(NH_2)替换(例如氨基葡萄糖),脱氧糖,其中至少一个羟基(OH)被氢原子(H)替换(例如脱氧核糖)。单糖的优选实例为D-(+)-甘油醛;D-(-)-赤藓糖;D-(-)-苏糖;D-(-)-核糖;D-(-)-阿拉伯糖;D-(+)-木糖;D-(-)-来苏糖;D-(+)-阿洛糖;D-(+)-阿卓糖;D-(+)-葡萄糖;D-(+)-甘露糖;D-(-)-葡萄糖;D-(-)-艾杜糖;D-(+)-半乳糖;D-(+)-塔罗糖;二羟基丙酮;D-赤鲜酮糖;D-核酮糖;D-木酮糖;D-阿洛酮糖;D-果糖;D-山梨糖;D-塔格糖。

所述术语“单糖”还包括1个、2个、3个或4个羟基被取代的单糖。

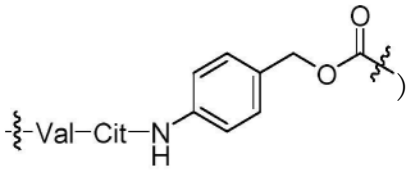
[0055] 术语“多糖”是指包含至少2个、优选至少5个、更优选至少10个单糖的分子，这些单糖通过糖苷键连接。

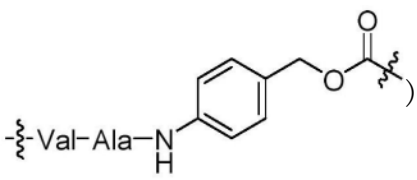
[0056] 本文所用的碳水化合物涵盖单糖和多糖以及它们的衍生物。

[0057] 本文所用的聚合物是指由许多重复的有机亚单元组成的大分子，但这些亚单元不是多糖、寡核苷酸或肽。聚合物的实例是聚乙二醇(PEG)、聚氧乙烯(PEO)或聚甘油(例如聚甘油-聚蓖麻酸酯(PGPR))。

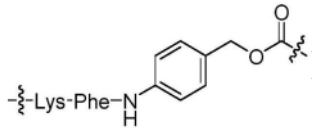
[0058] 术语“荧光团”为本领域技术人员所熟知，是指在经光激发时重新发光的化学化合物。非限制性实例为CY_5、EDANS、黄嘌呤衍生物(如荧光素、罗丹明、俄勒冈绿、伊红、德克萨斯红)、菁衍生物(如吲哚羰花青(indocarbocyanine)、杂羰花青(oxacarbocyanine)、部花青(merocyanine))、方酰胺衍生物(如Seta染料、Se Tau染料、Square染料)、萘衍生物(如丹磺酰或prodan衍生物)、香豆素衍生物、噁二唑衍生物、蒽衍生物(如，蒽醌类比如DRAQ5、DRAQ7、CyTRAK橙)、芘衍生物(如，级联蓝)、噻嗪衍生物(如，尼罗红、尼罗蓝、甲酚紫)、吖啶衍生物(如，二氨基吖啶、吖啶橙、吖啶黄)、芳基次甲基衍生物(如，金胺、结晶紫、孔雀绿)或四吡咯衍生物(例如，卟吩、酞菁、胆红素)。

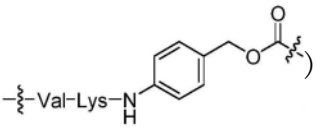
[0059] 本文所用术语“脂肪族或芳族残基”是指脂肪族取代基，如烷基残基，然而该烷基残基可任选地进一步被脂肪族和/或芳族取代基取代，如脂肪族残基可以是核酸、肽、蛋白质、酶、同工酶、抗体、核苷酸、寡核苷酸、单糖、多糖、聚合物、荧光团、任意取代的苯等，只要该分子与核心结构的直接连接(在R_1的情况下，例如与如式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的相应氧的直接连接)是脂肪族的。芳族残基是指其中与核心结构的直接连接是芳族系统的一部分的取代基，例如被任意取代的苯基或吡啶基或肽(如果肽与核心结构的直接连接例如是经由苯基残基的)。

[0060] 术语“抗体药物偶联物”或缩写ADC为本领域技术人员所熟知，并且，如本文所用，是指抗体或其抗原结合片段与药物(例如化疗药剂、毒素、免疫治疗剂、成像探针，等)的连接。如本文所用，“连接子”是将抗体或其抗原结合片段共价连接到药物的任何化学部分。所述连接子可以是本领域技术人员已知的任何连接子。如本文所用，术语“连接子药物偶联物”是指包含如前文所定义的连接子以及药物或由前文所定义的连接子以及药物组成的分子或化学基团。在这方面，术语“连接子药物偶联物”一般是指抗体-药物偶联物的不是抗体或其抗原结合片段的那部分。通常，在连接子-药物偶联物中，所述连接子与所述药物共价连接。作为示例性实例，本发明所用的连接子可包括自裂解肽，其可被如组织蛋白酶B的酶裂解。特别地，本发明所用的包含自裂解肽的连接子可包括缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧羰基(VC-PAB，

)、缬氨酸-丙氨酸-p-氨基苄氧羰基(VA-PAB，

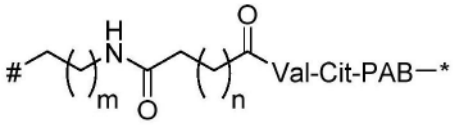
)、赖氨酸-苯丙氨酸-p-氨基苄氧羰基(KF-PAB，

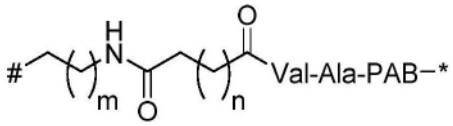


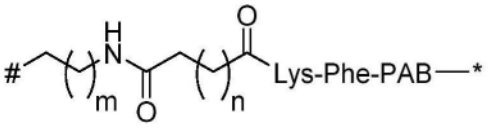
)或缬氨酸-赖氨酸-p-氨基苄氧羰基(VK-PAB,


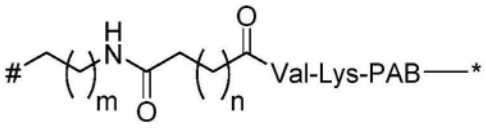
)。

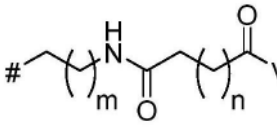
例如,所述包含自裂解肽的连接子可以是



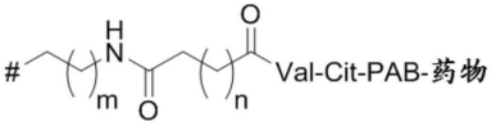
、


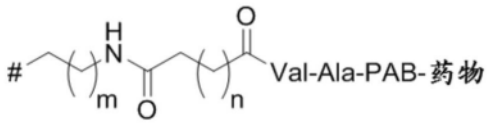
、


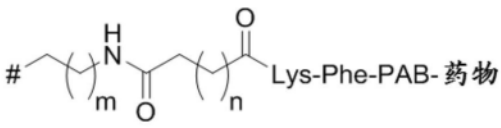
或


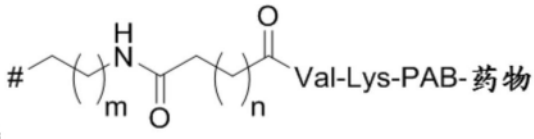
优选


其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,*表示药物的位置,m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。具有自裂解肽的连接子公开于例如美国专利申请公开文本US 2006/0074008;G.M.Dubowchik等人,Bioconjuate Chem.2002,13,855-869或S.O.Doronina等人,Nature Biotechnology,vol.21,778-784(2003)中,这些文献的全部内容以引用的方式并入本文。连接子-药物偶联物可以是

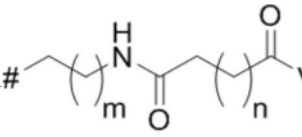


、


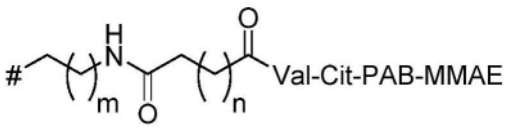
、


或


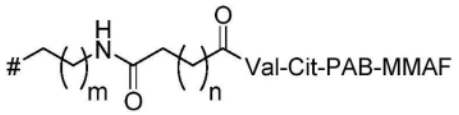
,

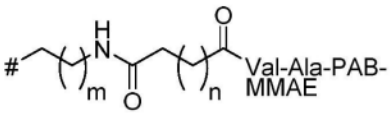
优选


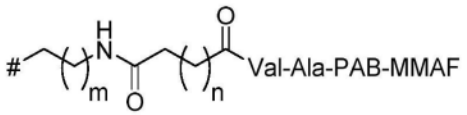
其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。作为示例性实例,在本发明中使用的药物可以是澳瑞他汀(auristatin),优选一甲基澳瑞他汀E(MMAE)或一甲基澳瑞他汀F(MMAF)。优选地,瑞他汀类,特别是MMAE或MMAF可以与诸如如VC-PAB、VA-PAB、KF-PAB或VK-PAB的自裂解肽组合使用。因此,本文所用的连接子药物偶联物可包含VC-PAB-MMAE、VC-PAB-MMAF、VA-PAB-MMAE、VA-PAB-MMAF、KF-PAB-MMAE、KF-PAB-MMAF、VK-PAB-MMAE或VK-PAB-MMAF。特别地,所述连接子药物偶联物可以是

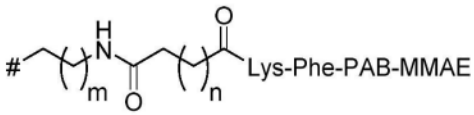


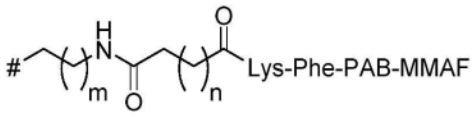
、

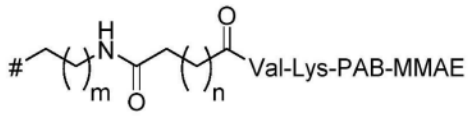


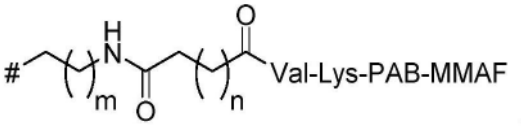
、


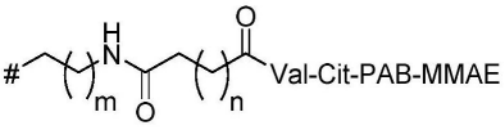
、


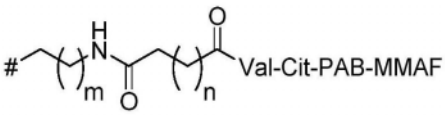
、


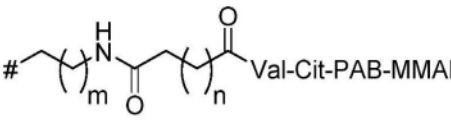
、


、


或


优选地为


，
或


更优选地为


，其中#表示Y(O(氧)或S(硫)，优选S)的位置，m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选m为1且n为1。

[0061] 本文亦描述“抗体荧光团偶联物”或简称AFC，其是指抗体或其抗原结合片段与荧光团(如，例如Cy5)的连接物。荧光团可通过连接子连接到抗体或其抗原结合片段。所述连接子可以是本领域技术人员已知的任何连接子。所述抗体荧光团偶联物可以包含“连接子荧光团偶联物”。如本文所用，术语“连接子荧光团偶联物”是指包含如前文所定义的连接子以及荧光团或由如前文所定义的连接子以及荧光团组成的分子或化学基团。在这方面，术语“连接子荧光团偶联物”一般是指抗体荧光团偶联物的不是抗体或其抗原结合片段的那部分。通常，在连接子荧光团偶联物中，连接子与荧光团共价连接。

[0062] 本文所用术语“小分子”表示一种有机分子，该种有机分子包含至少两个碳原子，但优选包含不大于7、12、15或20个可旋转碳键，更优选包含不大于7、12或15个可旋转碳键，甚至更优选包含不大于7或12个可旋转碳键，其分子量为100至2000道尔顿，优选为100至1000道尔顿，并且任选地包括一个或两个金属原子。仅作为小分子的示例性实例，可以提及生物素和荧光团EDANS和Cy5。

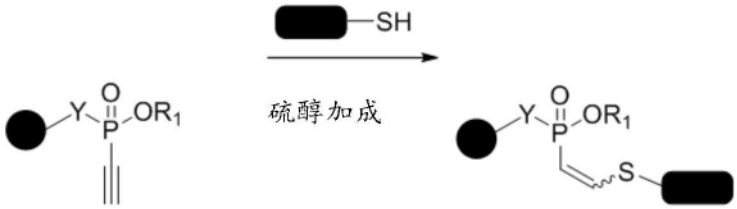
[0063] 方法

[0064] 本发明提供一种包含巯基的化合物与烯烃或炔烃硫代膦酸酯(phosphonothiolate)和膦酸酯(phosphonate)的新型反应。方案1描述了根据本发明的一般反应并通过说明性实例的方式使用了乙烯基和乙炔基硫代膦酸酯和膦酸酯。

[0065] 方案1：



[0066]



[0067] ●＝脂肪族或芳族残基:例如,生物素、荧光团、小分子、氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸;

[0068] ■=含巯基的分子:例如,氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸;

[0069] R_1＝脂肪族或芳族残基;

[0070] Y＝S(硫)、O(氧)。

[0071] 本发明提出了本文所述的方法允许在位置R_1、●和■处结合大量不同的有机残基。特别地,当■为氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸时,根据本发明的方法适于生成偶联物。有利的是,存在于此类氨基酸、肽、蛋白质或抗体中的巯基基团(比如如半胱氨酸残基的巯基基团)或存在于核苷酸或寡核苷酸中的巯基基团化学选择性地与烯烃或炔烃硫代膦酸酯或膦酸酯发生反应,从而提供了化学选择性修饰方法。由于该种化学选择性,含巯基的化合物,特别是氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸可以是未保护的,这意味着无需保护基团。烯烃或炔烃硫代膦酸酯或膦酸酯可以是缺电子烯烃或炔烃硫代膦酸酯或膦酸酯。

[0072] 此外,根据本发明的方法允许两个复杂分子的偶联。例如,蛋白质可以与抗体或另一蛋白质偶联。

[0073] 本文已证明:

[0074] ●亲电子烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯和膦酸酯的合成;

[0075] ●缺电子烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯和膦酸酯与含巯基的分子的偶联反应,所述含巯基的分子包括氨基酸、肽、蛋白质和抗体;

[0076] ●这些偶联物在生理相关条件下的稳定性;

[0077] ●所述偶联在生理相关条件,比如生理pH下发生。

[0078] 本发明的特征在于几个创新方面,其通过新的偶联化学进一步简化了诸如抗体或蛋白质偶联物的偶联物的可及性:

[0079] ●一种用于修饰如小分子、蛋白质和抗体的多种化合物中的巯基的反应;

[0080] ●通过直接偶联可将两个复杂分子(如荧光团和蛋白质或抗体)连接,对于肽、蛋白质和抗体而言,这种连接是半胱氨酸选择性的;

[0081] ●与常规马来酰亚胺试剂相比,偶联物的稳定性高;快速偶联反应;

[0082] ●与其他修饰或偶联肽、蛋白质和抗体的方法不同,由于半胱氨酸的选择性,在制备烯烃硫代膦酸酯或炔烃硫代膦酸酯之后,或在制备烯烃或炔烃膦酸酯后和/或在化学选

择性偶联后不需要保护基团的操作;

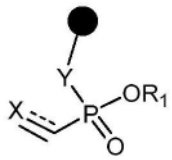
[0083] ●不饱和的硫代膦酸酯显示出重要的优势,因为它们在硫醇加成中的反应比相应的膦酸酯要快得多。对于生物偶联反应,非常需要快速的反应速率,由此可以提高转化率和产率。所得的巯基-硫代膦酸酯-偶联物在生理相关条件下显示出良好的稳定性。

[0084] ●通常将硫代膦酸酯在酸性条件下的高稳定性用于固相合成后从固体支持物中裂解肽。

[0085] 已经报道了一些硫代膦酸酯和向膦酸酯中硫醇加成的实例,参见如专利文件US3904710A、GB917085、GB863434、DE1064512,以及公开文献Gao等人,Chemistry Eur.J.2009,15(9),2064-2070;Khusinova等人,Russian Chemical Bulletin,International Edition,2004,vol.53,no.10,pp.2253-2256和Acheson等人,Journal of Chemical Research,Synopses,1986。然而,这些文献中并未报道将硫醇加成至硫代膦酸酯中。此外,这些文献不涉及诸如如肽、蛋白质、抗体或寡核苷酸的生物分子的修饰,并且这些文献也没有提及生理相关条件下反应速率和稳定性的问题。

[0086] 通常,可以实施根据本发明的方法以偶联不同的化合物,比如小分子(如任选取代的烷基、苯基或杂环)、肽、蛋白质、抗体、寡核苷酸或具有标签的多糖、蛋白质寡核苷酸等。因此,本发明涉及一种用于制备式(III)的化合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0087] 使式(I)的化合物

[0088] 

(I)

[0089] 其中,

[0090] ⫽代表双键或三键;

[0091] 当⫽为三键时,X代表R_3-C;

[0092] 当⫽为双键时,X代表(R_3R_4)C;

[0093] Y代表S或O;

[0094] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基;

[0095] R_3代表H或C_1-C_8-烷基;

[0096] R_4代表H或C_1-C_8-烷基;和

[0097] ●代表脂肪族或芳族残基;

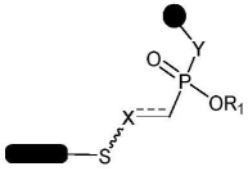
[0098] 与式(II)的含巯基的分子反应

[0099] 

(II)

[0100] 其中●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;

[0101] 得到式(III)的化合物

[0102] 

(III)

[0103] 其中,若式(I)的化合物中 代表双键,则 代表单键;或

[0104] 若式(I)的化合物中 代表三键,则 代表双键;和

[0105] 、●、R_1、X和Y如上对式(I)和(II)的化合物的定义。

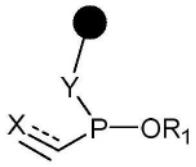
[0106] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中,所述方法中式(I)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(III)的化合物, 代表双键,X代表$(R_3R_4)C$,R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_8-烷基,和 代表单键。优选地,R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_6-烷基,更优选地代表H或C_1-C_4-烷基,再更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中,R_3和R_4相同。在优选的实施方案中,R_3和R_4均为H。

[0107] 可选地,在本发明的任意一种方法的一些实施方案中,所述方法中式(I)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(III)的化合物, 代表三键,X代表R_3-C,R_3代表H或C_1-C_8-烷基,和 代表双键。优选地,R_3表H或C_1-C_6-烷基,更优选地代表H或C_1-C_4-烷基,再更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中,R_3为H。

[0108] 在本发明的任意一种方法中,所述方法中式(I)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(Ⅲ)的化合物,Y可以为S(硫)或O(氧)。当Y为S时,化合物(I)和(III)代表硫代膦酸酯。当Y为O时,化合物(I)和(III)代表膦酸酯。因此,在一些实施方案中,Y为S。在一些实施方案中,Y为O。在任意一种方法的优选实施方案中,所述方法中式(I)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(III)的化合物,Y为S。本发明人发现,将式(II)的硫醇加成到硫代膦酸酯(即Y为S时)的三键或双键上,比加成到相应的膦酸酯(即Y为O时)上要快得多。非常需要这种更快的反应速率,因为由此提高转化率和收率。

[0109] 式(I)的化合物的制备可包括:

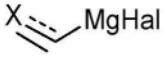
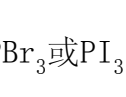
[0110] 使式(IV)的化合物

[0111] 

(IV)

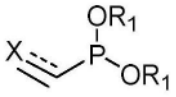
[0112] 其中R_1、X、Y、 和●如上文和下文所定义;

[0113] 与氧化剂反应以生成式(I)的化合物。所述氧化剂可选自叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)、间氯过氧苯甲酸(mCPBA)、过氧化氢(H_2O_2)、碘(I_2)、过氧硫酸钾或氧气(O_2),如来自空气的氧气。优选地,所述氧化剂为叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)。式(IV)的化合物的制备可包括:

[0114] 使三卤化磷(X),优选PCl_3依次与(i)R_1-OH(XI);(ii)(XII),其中R_2独立地代表C_1-C_8-烷基;(iii)(XIII),其中Hal代表选自Cl、Br和I的卤素,优选地为Br;和(iv)●-YH(XIV)反应以生成式(IV)的化合物;其中R_1、X、Y、和●如上文和下文所定义。所述三卤化磷可以是PCl_3、PBr_3或PI_3,优选PCl_3。(XII)中的R_2独立地代表C_1-C_8-烷基,优选C_1-C_6-烷基,更优选C_1-C_4-烷基,甚至更优选C_1-C_3-烷基。优选地,两个R_2相同。甚至更优选地,两个R_2为异丙基。优选地,步骤(iv)(其中●-YH(XIV)反应)在四唑存在下进行。所述四唑可以是未取代的四唑或取代的四唑。

[0115] 可选地,当Y为S时,式(I)的化合物的制备可包括:

[0116] 使式(V)的化合物

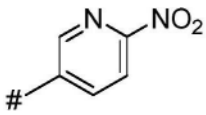
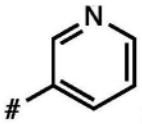
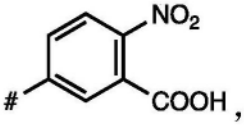
[0117] 

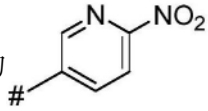
(V)

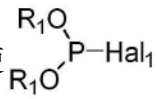
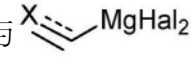
[0118] 与式(VIa)或(VIb)的化合物反应以生成式(I)的化合物;

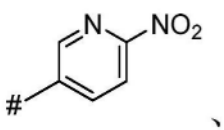
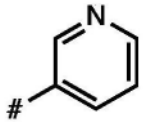
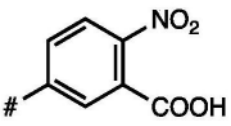
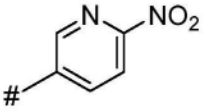
[0119] 

(VIa) (VIb)

[0120] 其中EWG代表吸电子基团,优选地,所述吸电子基团选自、和,其中#表示S的位置;Hal代表选自Cl、Br和I的卤素,优选地为Cl;和

[0121] 其中R_1、X、和●如上文和下文所定义。优选地,在式(V)的化合物中两个R_1相同。更优选地,采用式(VIa)的化合物时,EWG为可以例如通过包含如下的方法来制备式(V)的化合物:

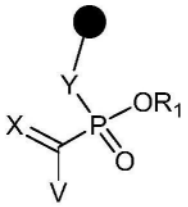
[0122] 使(XX)与(XXI)反应得到式(V)的化合物,其中R_1、X和如上文和下文所定义;Hal_1为选自Cl、Br和I的卤素,优选地为Cl;Hal_2为选自Cl、Br和I的卤

素,优选地为Br。可以制备式(VIa)的化合物,例如通过使化合物(XXX)与●-SH(XXXI)反应得到式(VIa)的化合物,其中EWG为吸电子基团,优选地为选自、和的吸电子基团,其中#表示S的位置;更优选地为;优选地,在式(XXX)的化合物中,两个EWG相同;和其中●如上文和下文所定义。式VIb的化合物可以根据文献已知的方法制备,例如通过使硫醇●-SH(XXXI)与硫酰氯(参见例如Allared,F.等人,Synthetic Metals,120(1-3),1061-1062;2001)或亚硫酰氯(参见如Masaki,Yukio等人,Chemical&Pharmaceutical Bulletin,33(5),1930-40;1985)反应制备,或通过使硫醇●-SH(XXXI)与N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)(参见如Kawamura,Takamasa等人,European Journal of Organic Chemistry,2015(4),719-722;2015)或氯(参见如E.Schneider,Chemische Berichte 84,911-916(1951))反应制备,其中●如上文和下文所定义。

[0123] 优选地,当通过使式(V)的化合物与式(VIa)或(VIb)的化合物反应来制备式(I)的化合物时,式(V)的化合物中为双键且X代表$(R_3\ R_4)C$,其中R_3和R_4如上文和下文所定义。

[0124] 本发明还涉及一种用于制备式(III*)的化合物的方法,所述方法包括如下步骤:

[0125] 使式(I*)的化合物

[0126] 

(I*)

[0127] 其中,

[0128] V代表C_1-C_8-烷基,优选地为甲基、乙基或丙基,更优选地为甲基;

[0129] X代表$(R_3\ R_4)C$;

[0130] Y代表S或O;

[0131] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基;

[0132] R_3代表H或C_1-C_8-烷基;

[0133] R_4代表H或C_1-C_8-烷基;和

[0134] ●代表脂肪族或芳族残基;

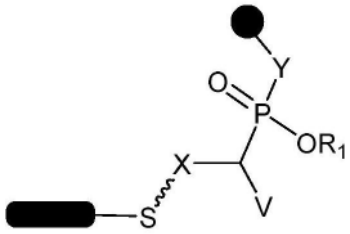
[0135] 与式(II)的含巯基的分子反应

[0136] 

(II)

[0137] 其中●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统；

[0138] 得到式(III*)的化合物

[0139] 

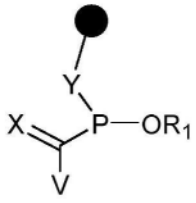
(III*)

[0140] 其中●、●、V、R_1、X和Y如对式(I*)和(II)的化合物中所定义。

[0141] 在本发明的任意一种方法中,所述方法中式(I*)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(III*)的化合物,Y可以是S(硫)或O(氧),即当Y为S时,化合物(I*)和(III*)代表硫代膦酸酯,和当Y为O时,化合物(I*)和(III*)代表膦酸酯。因此,在一些实施方案中,Y为S。在一些实施方案中,Y为O。在任意一种方法的优选实施方案中,所述方法中式(I*)的化合物与式(II)的化合物反应得到式(III*)的化合物,Y为S,因为本发明人发现,将硫醇加成到硫代膦酸酯(即Y为S时)的三键或双键上,比加成到相应的膦酸酯(即Y为O时)上要快得多。

[0142] 式(I*)的化合物的制备可包括：

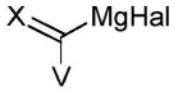
[0143] 使式(IV*)的化合物

[0144] 

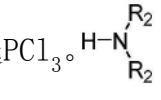
(IV*)

[0145] 其中X代表$(R_3\ R_4)C$,和Y、R_1、R_3、R_4、V和●如上文和下文所定义；

[0146] 与氧化剂反应以生成式(I*)的化合物。所述氧化剂可选自叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)、间氯过氧苯甲酸(mCPBA)、过氧化氢(H_2O_2)、碘(I_2)、过氧硫酸钾或氧气(O_2),如来自空气的氧气。优选地,所述氧化剂为叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)。式(IV*)的化合物的制备可包括：

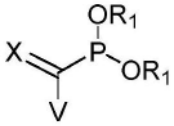
[0147] 使三卤化磷(X),优选PCl_3依次与(i)R_1-OH(XI)；(ii)  (XII), 其中R_2独立地代表C_1-C_8-烷基；(iii)  (XIII*), 其中Hal代表选自Cl、Br和I的卤素,优选地为Br,和X代表$(R_3\ R_4)C$;和(iv)●-YH(XIV)反应以生成式(IV*)的化合物；

[0148] 其中R_1、R_3、R_4、V、Y和●如上文和下文所定义。所述三卤化磷可以是PCl_3、PBr_3或

PI_3，优选PCl_3。 (XII) 中的R_2独立地代表C_1-C_8-烷基，优选C_1-C_6-烷基，更优选C_1-C_4-烷基，甚至更优选C_1-C_3-烷基。优选地，两个R_2相同。甚至更优选地，两个R_2为异丙基。优选地，步骤(iv)中(其中●-YH(XIV)反应)在四唑存在下进行。所述四唑可以是未取代的四唑或取代的四唑。

[0149] 可选地，当Y为S时，式(I*)的化合物的制备可包括：

[0150] 使式(V*)的化合物

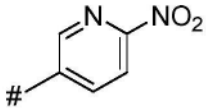
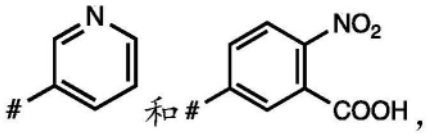
[0151] 

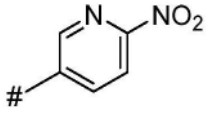
(V*)

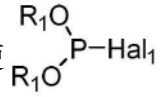
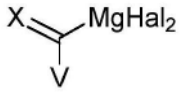
[0152] 与式(VIa)或(VIb)的化合物反应以生成式(I*)的化合物；

[0153] 

(VIa) (VIb)

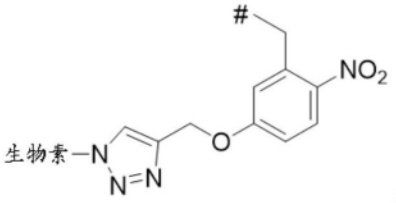
[0154] 其中EWG代表吸电子基团，优选地，所述吸电子基团选自 、，其中#表示S的位置；Hal代表选自Cl、Br和I的卤素，优选地为Cl；和

[0155] 其中X代表$(R_3\ R_4)C$，和R_1、R_3、R_4、V和●如上文和下文所定义。优选地，在式(V*)的化合物中两个R_1相同。更优选地，当采用式(VIa)的化合物时，EWG为  可以例如通过包含如下的方法来制备式(V*)的化合物：

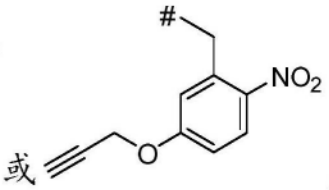
[0156] 使  (XX) 与  (XXI*) 反应得到式(V*)的化合物，其中X代表$(R_3\ R_4)C$，和R_1、R_3、R_4和V如上文和下文所定义；和Hal_1为选自Cl、Br和I的卤素，优选地为Cl；Hal_2为选自Cl、Br和I的卤素，优选地为Br。式(VIa)和(VIb)的化合物可以例如按照上文和下文所描述的制备。

[0157] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表任选地被如下的至少一个取代的C_1-C_8-烷基：其中n为1、2、3、4、5或6的$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、F、Cl、Br、I、$-NO_2$、$-N(C_1$-C_8-烷基$)H$、$-NH_2$、$-N_3$、$-N(C_1$-C_8-烷基$)_2$、=O、C_3-C_8-环烷基、-S-S-$(C_1$-C_8-烷基)、其中n为1、2、3、4、5或6的羟基-$(C_1$-C_8-烷氧基$)_n$、C_2-C_8-烯基或C_2-C_8-炔基。

[0158] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表任选取代的苯基，比如



或



，其中#代表O的位置。

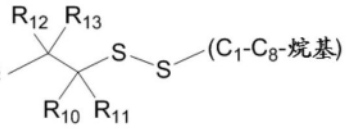
[0159] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表任选独立地被如下的至少一个取代的苯基：C_1-C_8-烷基、其中n为1、2、3、4、5或6的(C_1-C_8-烷氧基)$_n$、F、Cl、I、Br、-NO_2、-N(C_1-C_8-烷基)H、-NH_2或-N(C_1-C_8-烷基)$_2$。

[0160] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表诸如吡啶基的5-或6-元杂芳族系统。

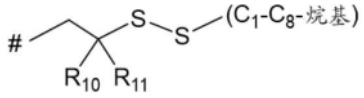
[0161] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表C_1-C_8-烷基；被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的C_1-C_8-烷基；被其中n为1、2、3、4、5或6的(C_1-C_8-烷氧基)$_n$取代的C_1-C_8-烷基；被任选取代的苯基取代的C_1-C_8-烷基；或苯基；或被-NO_2取代的苯基。

[0162] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表甲基、乙基、丙基或丁基，优选甲基或乙基。

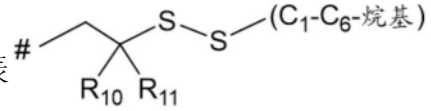
[0163] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表任选地被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的脂肪族或芳族残基。在优选的实施方案中，R_1代表



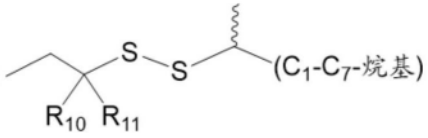
，其中R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}各自独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}各自独立地代表氢、甲基或乙基。在优选的实施方案中，R_1代表



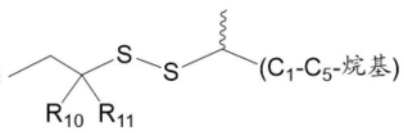
，其中R_{10}和R_{11}独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{10}和R_{11}独立地代表氢、甲基或乙基。在进一步更优选的实施方案中，R_1代表



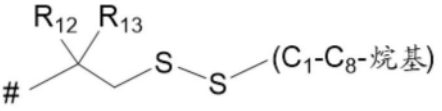
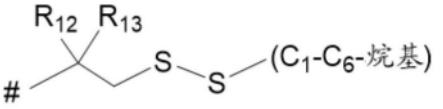
，其中R_{10}和R_{11}独立地代表氢、甲基或乙基；和#代表O的位置。在这些实施方案的一些中，R_{10}和R_{11}均为氢。在这些实施方案的一些中，R_{10}为氢，R_{11}为C_1-C_6-烷基。在这些实施方案的一些中，R_{10}为氢，R_{11}为甲基或乙基。在这些实施方案的一些中，R_{10}和R_{11}相同。在优选的实施方案中，R_1代表

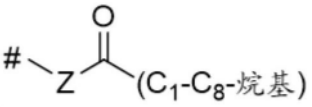
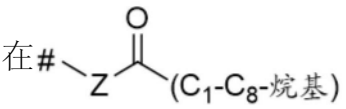
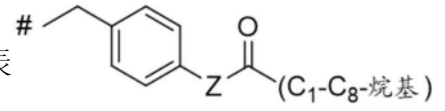
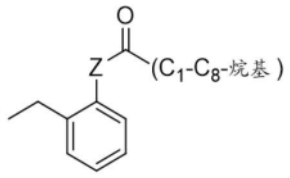


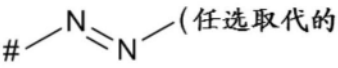
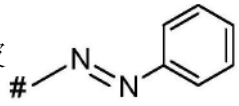
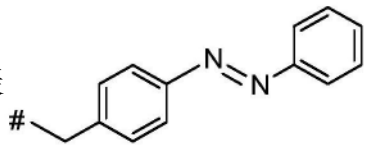
，更优选地代表

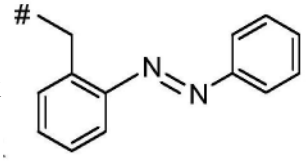


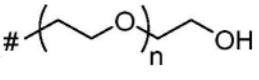
，其中R_{10}和R_{11}如上文所定义。在另一优选的实施方

案中，R_1代表其中R_{12}和R_{13}独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{12}和R_{13}独立地代表氢、甲基或乙基。在甚至更优选的实施方案中，R_1代表其中R_{12}和R_{13}独立地代表氢、甲基或乙基；和#代表O的位置。在这些实施方案的一些中，R_{12}和R_{13}均为氢。在这些实施方案的一些中，R_{12}为氢，R_{13}为C_1-C_6-烷基。在这些实施方案的一些中，R_{12}为氢，R_{13}为甲基或乙基。在这些实施方案的一些中，R_{12}和R_{13}相同。

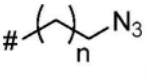
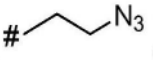
[0164] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被取代，其中Z为O或NH，和其中#代表所述苯基的位置。在一些实施方案中Z为O。在一些实施方案中Z为NH。在中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基。在优选的实施方案中，R_1代表其中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基；其中Z为O或NH，和其中#代表O的位置。在另一优选的实施方案中，R_1代表其中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基；其中Z为O或NH，和其中#代表O的位置。

[0165] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被取代，和其中#代表所述苯基的位置。在一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被取代，和其中#代表所述苯基的位置。在优选的实施方案中，R_1代表其中#，

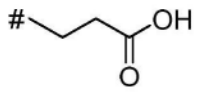
代表O的位置。在另一优选的实施方案中，R_1代表  其中#代表O的位置。

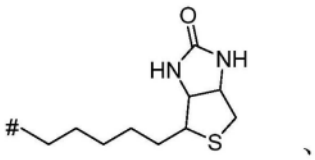
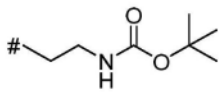
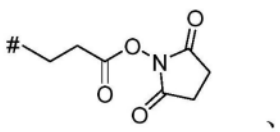
[0166] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表  ，其中#代表O的位置并且n＝0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地n＝0、1、2、3、4、5、6；更优选地n＝0、1、2、3、4；甚至更优选地n＝0、1、2、3，甚至更进一步优选地n＝0、1、2，甚至再进一步优选地n＝0、1；和最优选地n＝1。

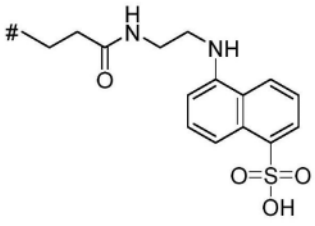
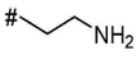
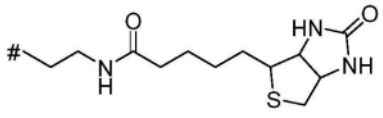
[0167] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表任选地被C_2-C_8-炔基取代的脂肪族或芳族残基。在优选的实施方案中，R_1为高炔丙基。

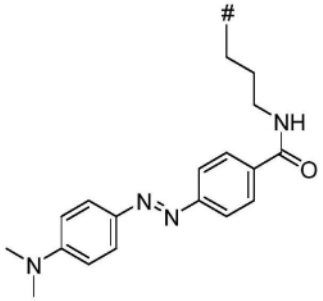
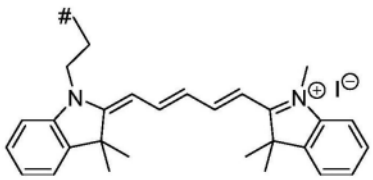
[0168] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，R_1代表  ，其中#代表O的位置，n＝0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地n＝0、1、2、3、4、5、6；更优选地n＝0、1、2、3、4；甚至更优选地n＝0、1、2、3，甚至更进一步优选地n＝0、1、2，甚至再进一步优选地n＝0、1；和最优选地n＝1，即n为1时，R_1代表  。

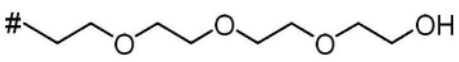
[0169] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，●代表小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

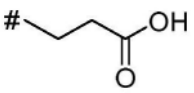
[0170] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，●代表小分子，所述小分子诸如例如任选取代的C_1-C_8-烷基，-CH_2-苯基、  、

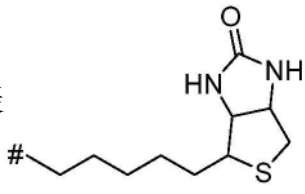
 、  、  、

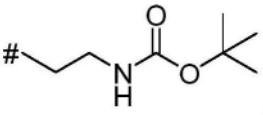
 、  、  、

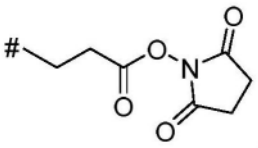
 、  或

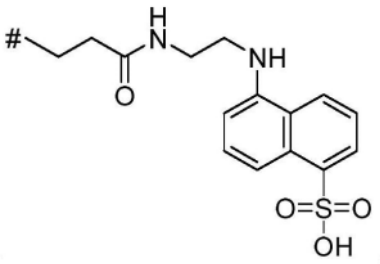
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中●代表任选取代的C_1-C_8-烷基，优选地任选取代的C_1-C_6-烷基，更优选地任选取代的C_1-C_4-烷基，甚至更优选C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中，●代表-CH_2-苯基，即苄基。在优选的实施方案中，●代表

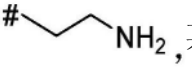
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

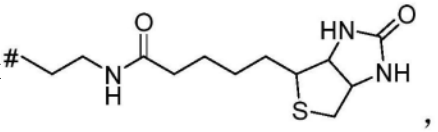
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

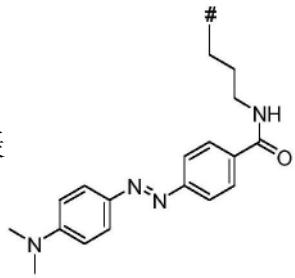
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

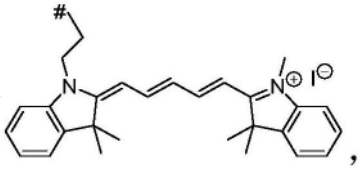
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

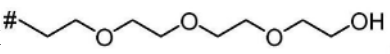
，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

，其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中，●代表

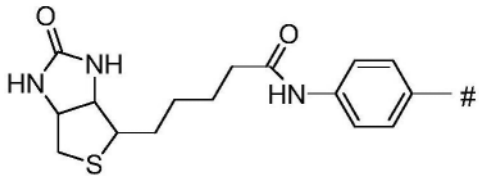
，其中#表示Y的位置。在一些实施方案中，●代表

，其中#表示Y的位置。在一些实施方案中，●代表

，其中#表示Y的位置。在一些实施方案中，●代表

，其中#表示Y的位置。

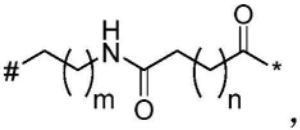
[0171] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，●代表任选取代的苯基，优选



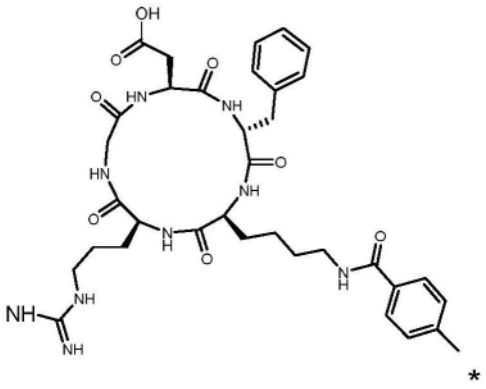
其中#表示Y的位置。

，

[0172] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，●代表放射性或非放射性核素、生物素、报告酶、核苷酸、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、氨基酸、肽、任选取代的5-或6-元杂芳族系统；其中任选地，所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在一些实施方案中，●代表放射性或非放射性核素。在优选的实施方案中，●代表生物素。在一些实施方案中，●代表报告酶。在优选的实施方案中，●代表核苷酸。在优选的实施方案中，●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，●代表氨基酸。在优选的实施方案中，●代表肽。在优选的实施方案中，●代表任选取代的5-或6-元杂芳族系统。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0173] 在整个说明书中，无论在任何关于“任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子”等的方法或化合物中，●实际上可以进一步包含任何连接子，并且该连接子与Y结合，如本文中关于式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物所述，所述Y为S(硫)或O(氧)，优选S。连接子可以是本领域技术人员已知的任何连接子，例如肽连接子或直链或支链的基于烃的部分。连接子也可以包含环状部分。肽连接子可以包含例如1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5、1至3或2或1个氨基酸。如果连接子是基于烃的部分，则该连接子的主链可仅包含碳原子，但还可包含诸如氧(O)、氮(N)或硫(S)原子的杂原子，和/或可包含羰基基团(C=O)。连接子可以是，例如，C_1-C_{20}碳原子链或比如具有-(O-CH_2-CH_2)-重复单元的聚乙二醇基链的聚醚基链。在基于烃的连接子的典型实施方案中，连接部分包含1至约150、1至约100、1至约75、1至约50或1至约40，或1至约30或1至约20，包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和19个主链原子。作为示例性实例，连接子可以是，其中#表示Y的位置，和*表示●的另一部分的位置，其中作为非限制性实例，所述另一部分可以是氨基酸、肽、抗体、蛋白质、核苷酸、寡核苷酸或小分子；和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选地m为1且n为1。前述示例性连接子也可以用在，例如当本说明书本身指“连接子”时，或例如在抗体药物偶联物的上下文中指“连接子-药物偶联物”时，或例如在抗体荧光团偶联物的上下文中指“连接子-荧光团偶联物”中时。本领域技术人员知晓选择合适的连接子。

[0174] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中，●代表结构(VII)的环状RGD肽(c(RDGfK))

[0175] 

(VII)

[0176] 其中*代表Y的位置。

[0177] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中,●代表苯基,所述苯基任选地被独立地选自C_1-C_8-烷基、C_1-C_8-烷氧基、卤素、-CN、-NO_2、-NH_2、-N(C_1-C_8-烷基)、-N(C_1-C_8-烷基)$_2$、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)、-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基)、-C(O)N-(C_1-C_8-烷基)、-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基)的1、2、3、4或5个取代基取代,优选地,所述苯基任选地被选自C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2的1个取代基取代。

[0178] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中,●代表C_1-C_8-烷基,所述C_1-C_8-烷基任选地被选自如下的至少一个取代基取代:C_3-C_8-环烷基;具有3至8个环成员的杂环基,其中杂原子选自N、O、S;C_1-C_8-烷氧基;卤素;-CN;-NO_2;-NH_2;-N(C_1-C_8-烷基);-N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-COOH;-COO(C_1-C_8-烷基);-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基);-$CONH_2$;-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基);-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基),优选C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2、苯基或杂芳族系统、单糖、多糖、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、聚合物、氨基酸、荧光团、蛋白质标签(第1代取代基),其中第1代取代基可再次任选地被如下基团取代:C_3-C_8-环烷基;具有3至8个环成员的杂环基,其中杂原子选自N、O、S;C_1-C_8-烷氧基;卤素;-CN;-NO_2;-NH_2;-N(C_1-C_8-烷基);-N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-COOH;-COO(C_1-C_8-烷基);-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基);-$CONH_2$;-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基);-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基),优选C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2、苯基或杂芳族系统(第2代取代基),和其中第2代取代基可再次被选自相同组的至少一个取代基取代,和其中此类取代可进行至3、4、5、6、7、8、9或10代。

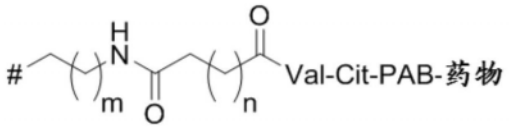
[0179] 在本发明的任意一种方法的一些实施方案中,●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。在一些实施方案中,●代表糖。在一些实施方案中,●代表多糖。在一些实施方案中,●代表聚合物。在一些实施方案中,●代表任选取代的C_1-C_8-烷基,优选任选取代的C_1-C_6-烷基,更优选任选取代的C_1-C_4-烷基,甚至更优选任选取代的C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中,●代表任选取代的苯基。在一些实施方案中,●代表任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结

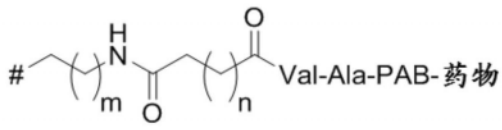
合的连接子。

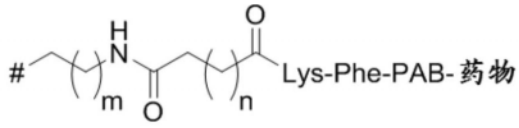
[0180] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中,●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在更优选的实施方案中,●代表肽、蛋白质、抗体或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在优选的实施方案中,●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

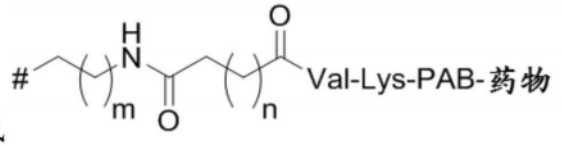
[0181] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中,●代表药物、蛋白质标签、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、蛋白质、肽、抗体或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,●代表药物。在优选的实施方案中,●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中,●代表连接子-药物偶联物。在优选的实施方案中,●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中,●代表生物素。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

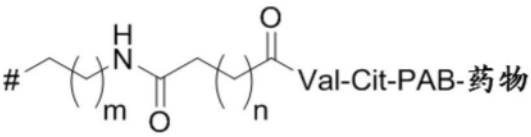
[0182] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中,●代表连接子或连接子-药物偶联物。在优选的实施方案中,●代表连接子,比如如包含VC-PAB、VA-PAB、KF-PAB或VK-PAB的连接子,优选包含VC-PAB的连接子。在优选的实施方案中,●代表连接子-药物偶联物,比如如

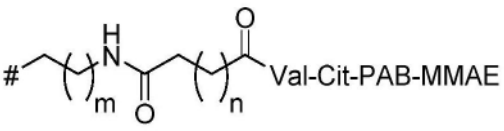


、


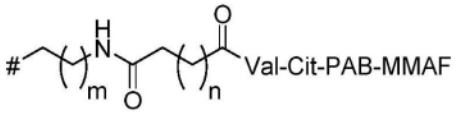
、优选


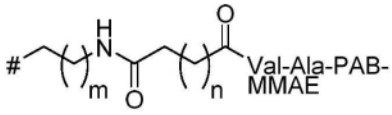
或


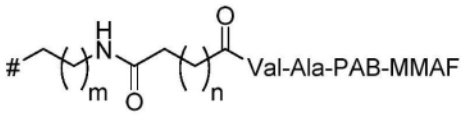
,


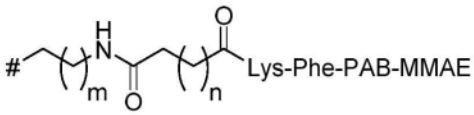
其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。更优选地,所述连接子药物偶联物为


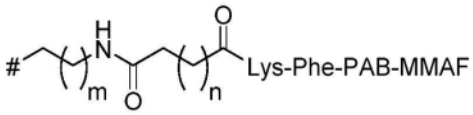
、

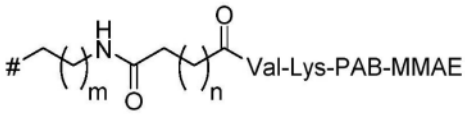


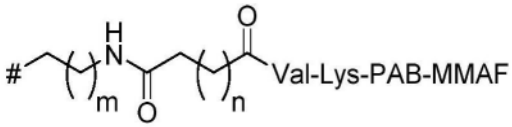
、


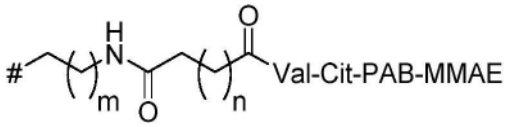
、


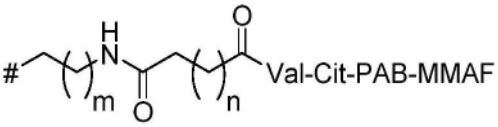
、


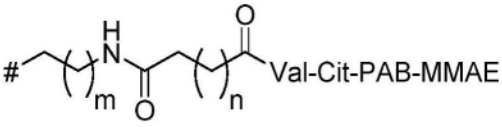
、


、


或


甚至更优选地为


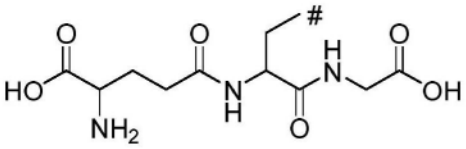
或


最优选地为


其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。

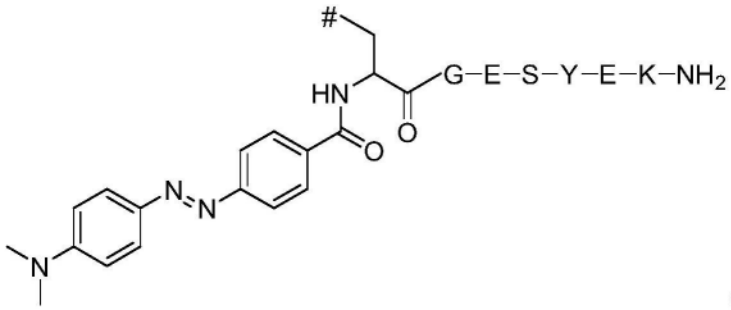
[0183] 根据本发明的任意一种方法,●●可代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。在优选的实施方案中,●●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸。在更优选的实施方案中,●●代表肽、蛋白质、抗体或寡核苷酸。在优选的实施方案中,●●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●●代表肽。在优选的实施方案中,●●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●●代表抗体。在优选的实施方案中,●●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●●代表寡核苷酸。在一些实施方案中,●●代表糖。在一些实施方案中,●●代表多糖。在一些实施方案中,●●代表聚合物。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_1-C_8-烷基,优选任选取代的C_1-C_6-烷基,更优选任选取代的C_1-C_4-烷基,甚至更优选任选取代的C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_3-C_8-烷基,优选任选取代的C_3-C_6-烷基,更优选任选取代的C_3-C_4-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_5-C_8-烷基,优选任选取代的C_6-C_7-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的苯基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。

[0184] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中,●●代表抗体,优选为IgG抗体,更优选地为西妥昔单抗(Cetuximab)或曲妥珠单抗(Trastuzumab)或本妥昔单抗(Brentuximab);蛋白质,优选GFP蛋白或eGFP蛋白,白蛋白,三肽,优选式(VIII)



或式(IX)

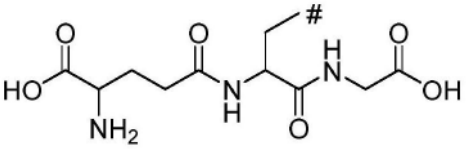
(VIII)，



的肽，其中#代表S的位

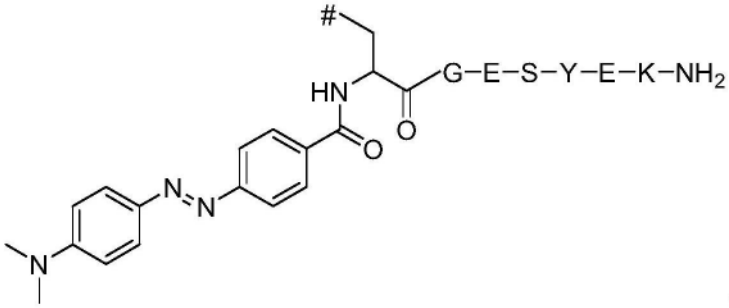
(IX)

置。因此，在优选的实施方案中，●代表抗体。在更优选的实施方案中，所述抗体为IgG抗体，甚至更优选地为西妥昔单抗或曲妥珠单抗或本妥昔单抗。在优选的实施方案中，●代表蛋白质，更优选GFP蛋白或eGFP蛋白。在优选的实施方案中，●代表白蛋白。在优选的实施方案中，●代表三肽。在优选的实施方案中，●代表式(VIII)



的肽。在优选的实施方案中，●代表式(IX)

(VIII)



的肽。在本发明的任意一种方法

(IX)

的优选实施方案中，●代表抗体(如西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗)和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表生物素。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表肽。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，●代表抗体和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

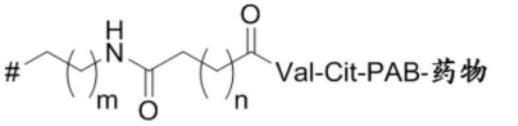
[0185] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，●代表蛋白质(如GFP蛋白或eGFP蛋白)和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、抗体、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，●代表蛋白质和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，●代表蛋白质和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，●代表蛋白质和●代表生物素。

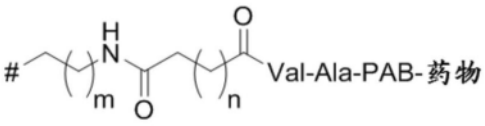
在优选的实施方案中，[redacted]代表蛋白质和●代表肽。在优选的实施方案中，[redacted]代表蛋白质和●代表抗体。在优选的实施方案中，[redacted]代表蛋白质和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，[redacted]代表蛋白质和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，[redacted]代表蛋白质和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

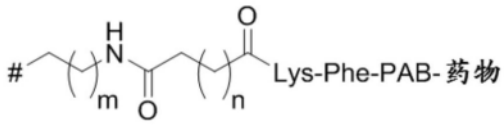
[0186] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，[redacted]代表肽和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表生物素。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表肽。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，[redacted]代表肽和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

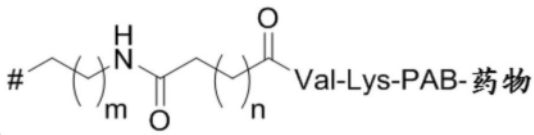
[0187] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表肽。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，[redacted]代表氨基酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0188] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，[redacted]代表抗体(如西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗)和●代表连接子、药物或连接子-药物偶联物。因此，在优选的实施方案中，[redacted]代表抗体和●代表连接子，比如如包含VC-PAB、VA-PAB、KF-PAB或VK-PAB的连接子，优选包含VC-PAB的连接子。在优选的实施方案中，[redacted]代表抗体和●代表药物。在优选的实施方案中，[redacted]代表抗体和●代表连接子-药物偶联物，比如如

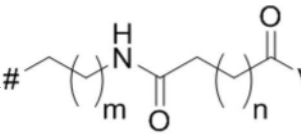


、


、


或


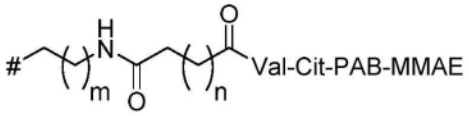
，

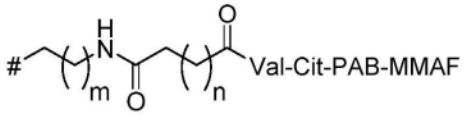
优选

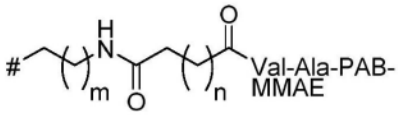
其中#表示Y(O(氧)或S(硫)，优选S)的位置，和

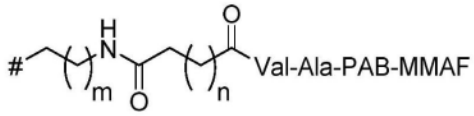
，

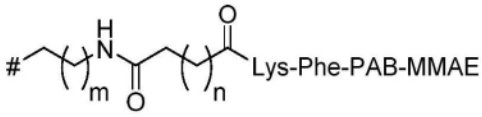
m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选m为1且n为1。在更优选的实施方案中，[redacted]代表抗体和●代表连接子-药物偶联物，比如如

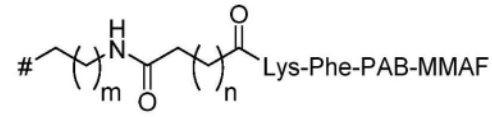


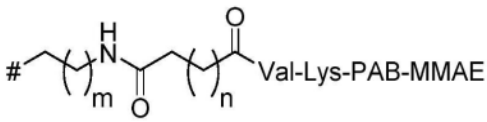
、


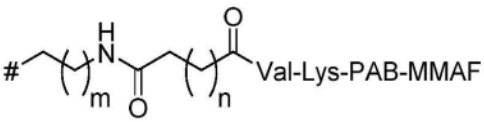
、


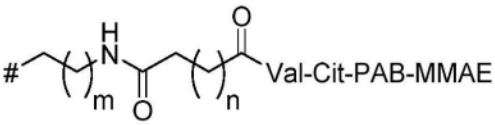
、


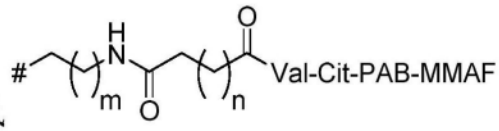
、


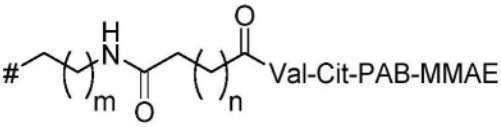
、


、


或


，甚至更优选地为


或


，最优选地为


，其中#表示Y(O(氧)或S(硫)，优选S)的位置，m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选m为1且n为1。在这些实施方案的任意一个中，所述抗体可以是西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗，优选本妥昔单抗。

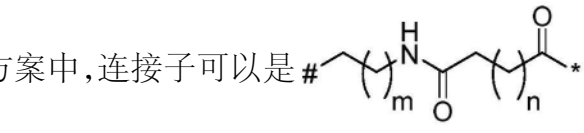
[0189] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，▬代表核苷酸和●代表肽、蛋白质、蛋白质标签、抗体、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0190] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，▬代表核苷酸和●代表连接子。

[0191] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表肽、蛋白质、蛋白质标签、抗体、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬

代表寡核苷酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，━代表寡核苷酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

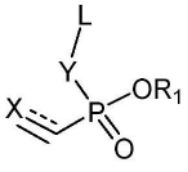
[0192] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，━代表寡核苷酸和●代表连接子。

[0193] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，●代表氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合。在一些实施方案中，●代表与固体支持物结合的氨基酸或肽。在一些实施方案中，●代表与固体支持物结合的核苷酸或寡核苷酸。在优选的实施方案中，●代表与固体支持物结合的肽。作为优点，本发明人发现本发明的硫代膦酸酯在酸性条件(如90％三氟乙酸(TFA))下是高度稳定的，该酸性条件通常用于从固体支持物上裂解肽。所述固体支持物可以是本领域技术人员已知的适合固相肽合成的任何固体支持物，或者是适用于固相寡核苷酸合成的任何固体支持物。此类固体支持物也称为树脂。适合固相肽合成的固体支持物的示例性实例包括有机和无机支持物，比如Merrifield聚苯乙烯树脂(苯乙烯和1-2％二乙烯基苯的共聚物)、聚丙烯酰胺树脂、TentaGel(将聚乙二醇接枝到聚苯乙烯上的接枝聚合物)、Wang树脂(通常基于交联的聚苯乙烯，例如在Merrifield树脂中)或具有限定孔径的多孔玻璃作为无机固体支持物的实例。商购可获得的、用于固相肽合成的固体支持物的示例性实例为Merck Millipore提供的Rink酰胺树脂或NovaSyn®TGR树脂。适合于固相寡核苷酸合成的固体支持物的示例性实例包括具有限定孔径的玻璃(可控孔径玻璃，CPG)和聚苯乙烯，比如大孔聚苯乙烯(MPPS)。任选地，在上述其中氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合的实施方案中，所述●进一步包含与本文所述的结构式，特别是化合物(I)、(III)、(I*)和(III*)中的Y结合的连接子。此外，所述连接子与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸结合。因此，所述●可以具有连接子-氨基酸-固体支持物、连接子-肽-固体支持物、连接子-核苷酸-固体支持物或连接子-寡核苷酸-固体支持物的结构。所述“连接子”实际上可以是任何连接子，且所述连接子与Y结合，例如如本文对于式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物所述，所述Y为S(硫)或O(氧)，优选S。连接子可以是本领域技术人员已知的任何连接子，例如肽连接子或直链或支链的基于烃的部分。连接子也可以包含环状部分。肽连接子可以包含例如1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5、1至3或2或1个氨基酸。如果连接子是基于烃的部分，则该连接子的主链可仅包含碳原子，但还可包含诸如氧(O)、氮(N)或硫(S)原子的杂原子，和/或可包含羰基基团(C=O)。连接子可以是，例如，C_1-C_{20}碳原子链或比如具有-(O-CH_2-CH_2)-重复单元的聚乙二醇基链的聚醚基链。在基于烃的连接子的典型实施方案中，连接部分包含1至约150、1至约100、1至约75、1至约50或1至约40，或1至约30或1至约20，包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和19个主链原子。本领域技术人员知晓选择合适的连接子。例如，在一些实施方案中，连接子可以是，其中#表示Y的位置，和*表示氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸的位置；和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选地m为1且n为1。氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸可通过N(氮)原子与连接子结合。

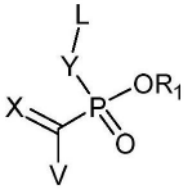
[0194] 在本发明的任意一种方法的优选实施方案中，━代表氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合。在一些实施方案中，━代表与固体支持物结合的氨基酸或肽。在一些实施方案中，━代表与固体支持物结合的核苷酸或寡核苷酸。在优选的实施方案中，━代表与固体支持物结合的肽。

[0195] 本发明还涉及一种用于制备式(I)或式(I*)的化合物的方法，所述方法包括：

[0196] (I)使式(Ia)的化合物

[0197]  或 (Ia)；

[0198] 式(I*a)的化合物

[0199]  (I*a)，

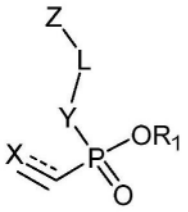
[0200] 其中

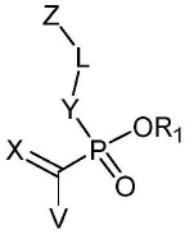
[0201] L代表适于与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸结合的连接子；和

[0202] 、X、Y、V和R_1如上文和下文所定义，

[0203] 与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸反应，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合，

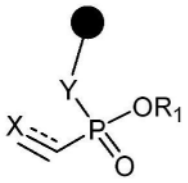
[0204] 得到式(Ib)或(I*b)的化合物

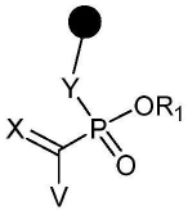
[0205]  或 (Ib)；

[0206]  (I*b)，

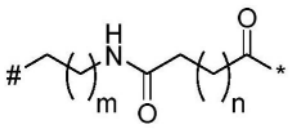
[0207] 其中Z代表氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合；和

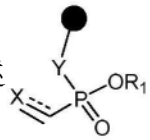
[0208] (II)使式(Ib)或(I*b)的化合物自固体支持物上裂解，得到式(I)或(I*)的化合物：

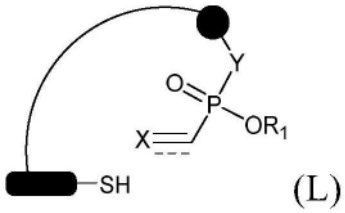
[0209]  或 (I)；

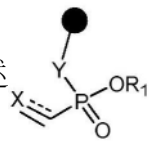
[0210]  (I*)，

[0211] 其中●代表通过连接子L与Y结合的氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，和

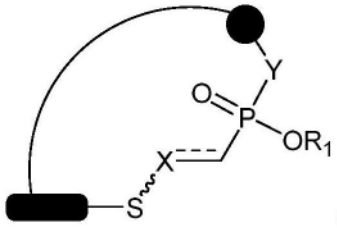
[0212] 、X、Y、V和R_1如上述步骤(I)所定义。在一些实施方案中，连接子L是其中#表示Y的位置，和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选地m为1且n为1。氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸通过羧基与此类连接子结合。在一些实施方案中，式(Ia)或(I*a)的化合物与和固体支持物结合的肽或与和固体支持物结合的寡核苷酸反应，优选地式(Ia)或(I*a)的化合物与和固体支持物结合的肽反应。在一些实施方案中，步骤(II)的裂解在酸性条件下，如采用三氟乙酸水溶液(如90％TFA)进行。在这方面，本发明人发现本发明的硫代膦酸酯(Y＝S)在酸性条件下是高度稳定的，该酸性条件特别用于从固体支持物上裂解肽。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述方法可进一步包括使式(I)或(I*)的化合物与上文和下文所定义的式(II)的化合物反应。

[0213] 在根据本发明的方法的一个实施方案中，所述和所述●—SH在同一个分子中。因此，本发明还涉及一种方法，其中式(L)的化合物

[0214]  (L)

[0215] 其中如所示通过连接●和●的弧所述和所述●—SH在同一个分子中，

[0216] 经反应得到式(IIIa)的化合物：

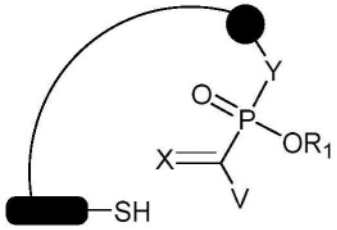
[0217] 
(IIIa);

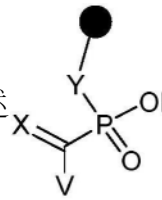
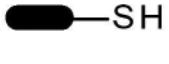
[0218] 其中,若式(XX)的化合物中代表双键,则代表单键,且X代表$(R_3\ R_4)C$;或

[0219] 若式(XX)的化合物中代表三键,则代表双键,且X代表R_3-C;和

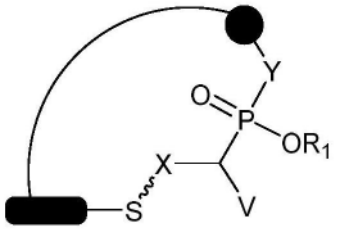
[0220] 、●、R_1、R_3、R_4和Y如上文和下文所定义。

[0221] 本发明还涉及一种方法,其中式(L*)的化合物

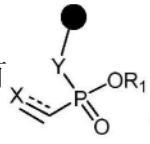
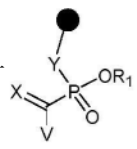
[0222] 
(XX*)

[0223] 其中如所示通过连接●和的弧所述和所述在同一个分子中,

[0224] 经反应得到式(III*a)的化合物:

[0225] 
(III*a);

[0226] 其中X为$(R_3\ R_4)C$,和、●、V、R_1、R_3、R_4和Y如上文和下文所定义。

[0227] 在一些实施方案中,在同一个分子中具有和的化合物(L)为肽,比如例如BCL9肽。因此,通过所述方法获得的式(IIIa)的化合物可以是环状肽,比如例如源自BCL9肽的环状肽。在一些实施方案中,在同一个分子中具有和的化合物(L*)为肽,比如例如BCL9肽。因此,通过所述方法获得的式(III*a)的化合物可以是环状肽,比如例如源自BCL9肽的环状肽。

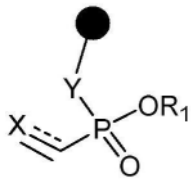
[0228] 本文针对式(I)、(I*)、(II)、(III)和(III*)的化合物描述的所有方法均可类似地

针对式(L)、(L*)、(IIIa)和(III*a)的化合物实施。

[0229] 化合物

[0230] 本发明还涉及通过本文所述任意一种方法可获得或获得的化合物。此外,本发明涉及用于本文所述的任意一种方法中如作为起始原料或中间体的化合物。特别地,本发明还涉及式(I)、(I*)、(III)、(III*)、(L)、(L*)、(IIIa)和(III*a)的化合物。

[0231] 因此,本发明还涉及一种式(I)的化合物

[0232] 

(I)

[0233] 其中

[0234] 代表双键或三键;

[0235] 当为三键时,X代表R_3-C;

[0236] 当为双键时,X代表(R_3 R_4)C;

[0237] Y代表S或O;

[0238] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基;

[0239] R_3代表H或C_1-C_8-烷基;

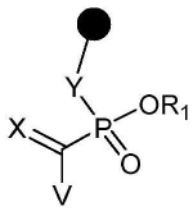
[0240] R_4代表H或C_1-C_8-烷基;和

[0241] ●代表脂肪族或芳族残基。

[0242] 在式(I)的化合物的一些实施方案中,代表双键,X代表(R_3 R_4)C,和R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_8-烷基。优选地,R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_8-烷基,更优选地代表H或C_1-C_6-烷基,甚至更优选地代表H或C_1-C_4-烷基,再更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中,R_3和R_4相同。在优选的实施方案中,R_3和R_4均为H。

[0243] 可选地,在式(I)的化合物的一些实施方案中,代表三键,X代表R_3-C,R_3代表H或C_1-C_8-烷基。优选地,R_3表H或C_1-C_8-烷基,更优选地代表H或C_1-C_6-烷基,甚至更优选地代表H或C_1-C_4-烷基,再更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中,R_3为H。

[0244] 本发明还涉及一种式(I*)的化合物

[0245] 

(I*)

[0246] 其中,

[0247] V代表C_1-C_8-烷基,优选地为甲基、乙基或丙基,更优选地为甲基;

[0248] X代表(R_3 R_4)C;

[0249] Y代表S或O；

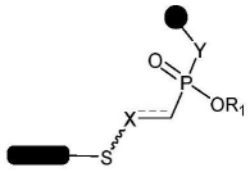
[0250] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基；

[0251] R_3代表H或C_1-C_8-烷基；

[0252] R_4代表H或C_1-C_8-烷基；和

[0253] ●代表脂肪族或芳族残基。

[0254] 本发明还涉及一种式(III)的化合物

[0255] 

(III)

[0256] 其中

[0257] ⁄代表单键，和X代表$(R_3R_4)C$；或

[0258] ⁄代表双键，和X代表R_3-C；

[0259] Y代表S或O；

[0260] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基；

[0261] R_3代表H或C_1-C_8-烷基；

[0262] R_4代表H或C_1-C_8-烷基；和

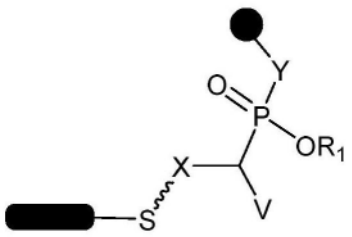
[0263] ●代表脂肪族或芳族残基；

[0264] ▬代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。

[0265] 在式(III)的化合物的一些实施方案中，⁄代表单键，X代表$(R_3\ R_4)C$，和R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_8-烷基。优选地，R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_6-烷基，更优选地代表H或C_1-C_4-烷基，甚至更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中，R_3和R_4相同。在优选的实施方案中，R_3和R_4均为H。

[0266] 或者地，在式(III)的化合物的一些实施方案中，⁄代表双键，X代表R_3-C，和R_3代表H或C_1-C_8-烷基。优选地，R_3表H或C_1-C_6-烷基，更优选地代表H或C_1-C_4-烷基，甚至更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中，R_3为H。

[0267] 本发明还涉及式(III*)的化合物

[0268] 

(III*)

[0269] 其中

[0270] X代表$(R_3\ R_4)C$

[0271] Y代表S或O；

[0272] R_1代表任选取代的脂肪族或芳族残基；

[0273] R_3代表H或C_1-C_8-烷基；

[0274] R_4代表H或C_1-C_8-烷基；

[0275] V代表C_1-C_8-烷基，优选地为甲基、乙基或丙基，更优选地为甲基；

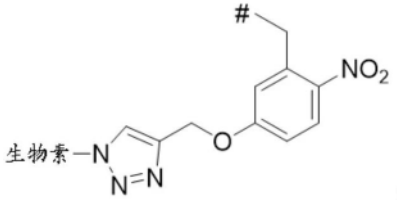
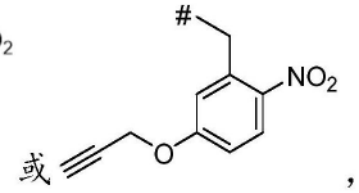
[0276] ●代表脂肪族或芳族残基；和

[0277] ▬代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。

[0278] 在式(III*)的化合物的一些实施方案中，R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_8-烷基。优选地，R_3和R_4独立地代表H或C_1-C_6-烷基，更优选地代表H或C_1-C_4-烷基，甚至更优选地代表H或C_1-C_2-烷基。在优选的实施方案中，R_3和R_4相同。在优选的实施方案中，R_3和R_4均为H。

[0279] 在式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物中的任意一个中，Y可以为S(硫)或O(氧)，即当Y为S时，化合物(I)、(I*)、(III)或(III*)代表硫代膦酸酯，和当Y为O时，化合物(I)、(I*)、(III)或(III*)代表膦酸酯。因此，在一些实施方案中，Y为S。在一些实施方案中，Y为O。作为优势，本发明人已经证明硫代膦酸酯和膦酸酯在生理相关条件下均是稳定的。在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，Y为S。已表明，与相应的膦酸酯相比，可以通过更快的硫醇加成来获得其中Y为S的式(III)或(III*)的硫代膦酸酯。非常需要这种更快的反应速率，因为由此提高硫代膦酸酯的转化率和收率。

[0280] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表任选地被如下的至少一个取代的C_1-C_8-烷基：其中n为1、2、3、4、5或6的(C_1-C_8-烷氧基)$_n$、F、Cl、Br、I、-NO_2、-N(C_1-C_8-烷基)H、-NH_2、-N_3、-N(C_1-C_8-烷基)$_2$、=O、C_3-C_8-环烷基、-S-S-(C_1-C_8-烷基)、其中n为1、2、3、4、5或6的羟基-(C_1-C_8-烷氧基)$_n$、C_2-C_8-烯基或C_2-C_8-炔基。

[0281] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表任选取代的苯基，比如  或 ，其中#代表O的位置。

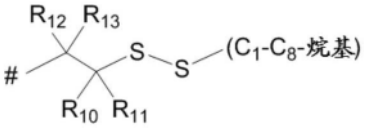
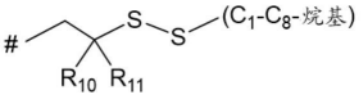
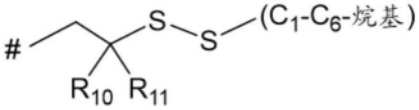
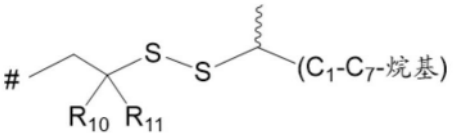
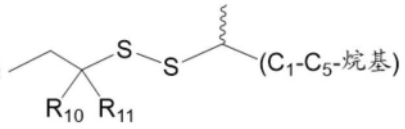
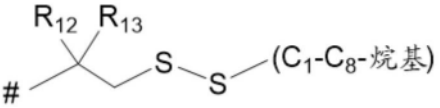
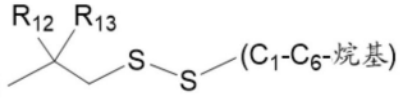
[0282] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表任选独立地被如下的至少一个取代的苯基：C_1-C_8-烷基、其中n为1、2、3、4、5或6的(C_1-C_8-烷氧基)$_n$、F、Cl、I、Br、-NO_2、-N(C_1-C_8-烷基)H、-NH_2或-N(C_1-C_8-烷基)$_2$。

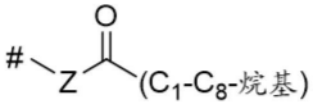
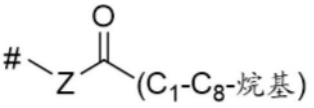
[0283] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表诸如吡啶基的5-或6-元杂芳族系统。

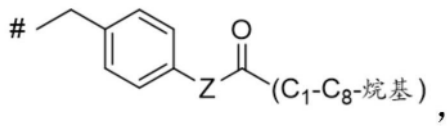
[0284] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表C_1-C_8-烷基；被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的C_1-C_8-烷基；被其中n为1、2、3、4、5或6的(C_1-C_8-烷氧基)$_n$取代的C_1-C_8-烷基；被任选取代的苯基取代的C_1-C_8-烷基；或苯基；或被-NO_2取代的苯基。

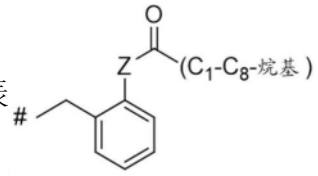
[0285] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表甲

基、乙基、丙基或丁基，优选甲基或乙基。

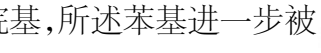
[0286] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表任选地被-S-S-(C_1-C_8-烷基)取代的脂肪族或芳族残基。在优选的实施方案中，R_1代表  其中R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}各自独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}各自独立地代表氢、甲基或乙基。在优选的实施方案中，R_1代表  其中R_{10}和R_{11}独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{10}和R_{11}独立地代表氢、甲基或乙基。在进一步更优选的实施方案中，R_1代表  其中R_{10}和R_{11}独立地代表氢、甲基或乙基；和#代表O的位置。在这些实施方案的一些中，R_{10}和R_{11}均为氢。在这些实施方案的一些中，R_{10}为氢，R_{11}为C_1-C_6-烷基。在这些实施方案的一些中，R_{10}为氢，R_{11}为甲基或乙基。在这些实施方案的一些中，R_{10}和R_{11}相同。在优选的实施方案中，R_1代表  更优选地代表  其中R_{10}和R_{11}如上文所定义。在优选的实施方案中，R_1代表  其中R_{12}和R_{13}独立地代表氢或C_1-C_8-烷基；和#代表O的位置。在更优选的实施方案中，R_{12}和R_{13}独立地代表氢、甲基或乙基。在甚至更优选的实施方案中，R_1代表  其中R_{12}和R_{13}独立地代表氢、甲基或乙基；和#代表O的位置。在这些实施方案的一些中，R_{12}和R_{13}均为氢。在这些实施方案的一些中，R_{12}为氢，R_{13}为C_1-C_6-烷基。在这些实施方案的一些中，R_{12}为氢，R_{13}为甲基或乙基。在这些实施方案的一些中，R_{12}和R_{13}相同。

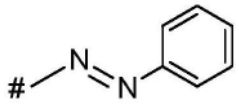
[0287] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被  取代，其中Z为O或NH，和其中#代表所述苯基的位置。在一些实施方案中Z为O。在一些实施方案中Z为NH。在  中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基。在优选的实施方案中，R_1代表

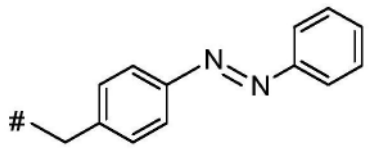


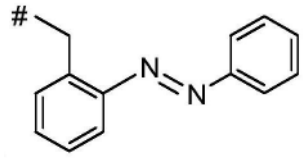
，其中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基；其中Z为O或NH，和其中#代表O的位置。在另一优选的实施方案中，R_1代表

，其中所述C_1-C_8-烷基可以是，例如甲基、乙基、丙基或丁基；优选为甲基、乙基或丙基；更优选地为甲基或乙基；最优选地为甲基；其中Z为O或NH，和其中#代表O的位置。

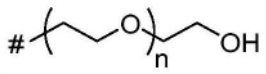
[0288] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被

取代，和其中#代表所述苯基的位置。在一些实施方案中，R_1代表被苯基取代的C_1-C_8-烷基，所述苯基进一步被

取代，其中#代表所述苯基的位置。在优选的实施方案中，R_1代表

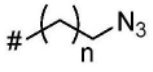
，其中#代表O的位置。在另一优选的实施方案中，R_1代表

，其中#代表O的位置。

[0289] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表

，其中#代表O的位置，n＝0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地n＝0、1、2、3、4、5、6；更优选地n＝0、1、2、3、4；甚至更优选地n＝0、1、2、3，甚至更进一步优选地n＝0、1、2，甚至再进一步优选地n＝0、1；和最优选地n＝1。

[0290] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表任选地被C_2-C_8-炔基取代的脂肪族或芳族残基。在优选的实施方案中，R_1为高炔丙基。

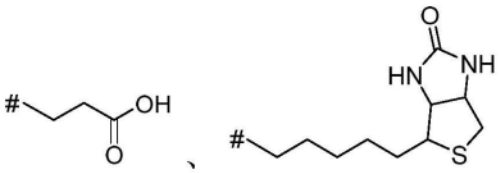
[0291] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，R_1代表

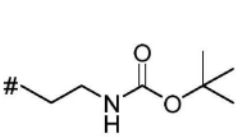
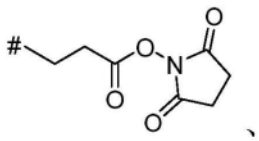
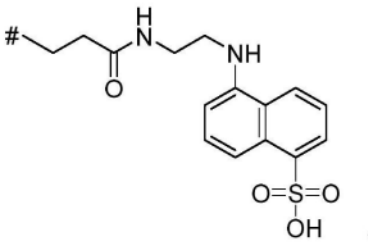
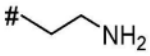
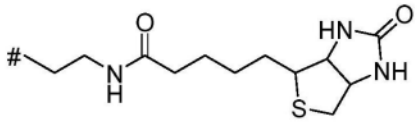
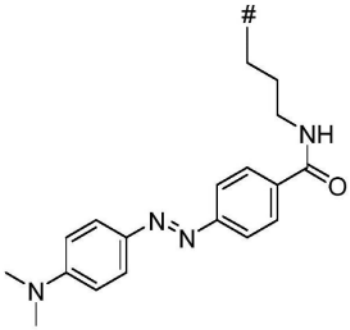
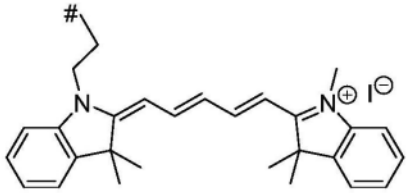
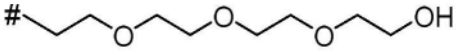
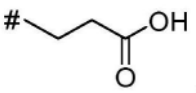
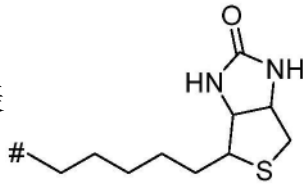
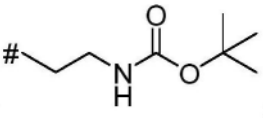
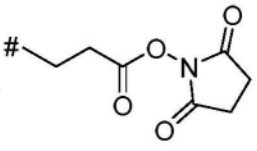
，其中#代表O的位置，n＝0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，优选地n＝0、1、2、3、4、5、6；更优选地n＝0、1、2、3、4；甚至更优选地n＝0、1、2、3，甚至更进一步优选地n＝0、1、2，甚至再进一步优选地n＝0、1；和最优选地n＝1，即n为1时，R_1代表

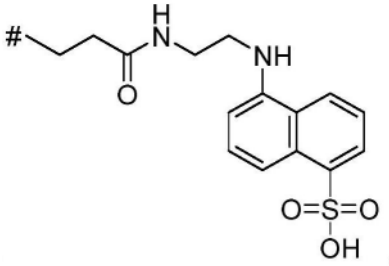
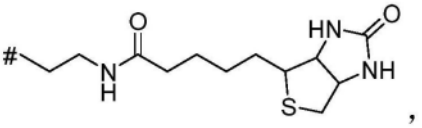
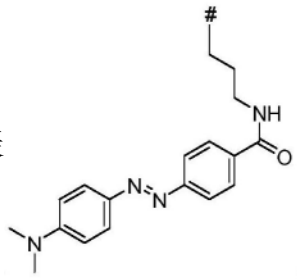
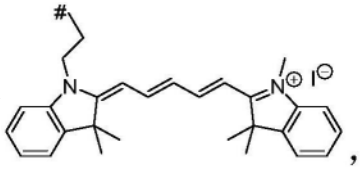
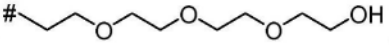
。

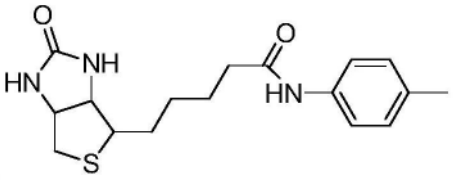
[0292] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中，●代表小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0293] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表小分子,所述小分子诸如例如任选取代的C_1-C_8-烷基,-CH_2-苯基、


、

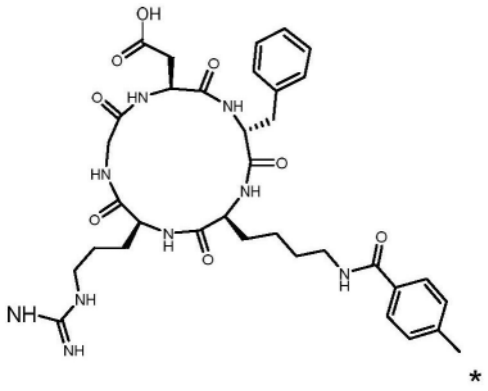
、

、

、

、

、

、

、

或

,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中●代表任选取代的C_1-C_8-烷基,优选地任选取代的C_1-C_6-烷基,更优选地任选取代的C_1-C_4-烷基,甚至更优选C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中,●代表-CH_2-苯基,即苄基。在优选的实施方案中,●代表

,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,●代表

,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,●代表

,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,●代表

,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,

●代表  其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,●代表  ,其中#表示Y的位置。在优选的实施方案中,●代表  ,其中#表示Y的位置。在一些实施方案中,●代表  ,其中#表示Y的位置。在一些实施方案中,●代表  ,其中#表示Y的位置。在一些实施方案中,●代表  ,其中#表示Y的位置。

[0294] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表任选取代的苯基,优选  ,其中#表示Y的位置。

[0295] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表放射性或非放射性核素、生物素、报告酶、核苷酸、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、氨基酸、肽或任选取代的5-或6-元杂芳族系统;其中任选地,所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在一些实施方案中,●代表放射性或非放射性核素。在一些优选的实施方案中,●代表生物素。在一些实施方案中,●代表报告酶。在一些优选的实施方案中,●代表核苷酸。在一些优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。在一些优选的实施方案中,●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在一些优选的实施方案中,●代表氨基酸。在一些优选的实施方案中,●代表肽。在一些优选的实施方案中,●代表任选取代的5-或6-元杂芳族系统。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0296] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表结构(VII)的环状RGD肽(c(RDGfK))

[0297] 

(VII)

[0298] 其中*代表Y的位置。

[0299] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表苯基,所述苯基任选地被独立地选自C_1-C_8-烷基、C_1-C_8-烷氧基、卤素、-CN、-NO_2、-NH_2、-N(C_1-C_8-烷基)、-N(C_1-C_8-烷基)$_2$、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)、-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基)、-C(O)N-(C_1-C_8-烷基)、-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基)的1、2、3、4或5个取代基取代,优选地,所述苯基任选地被选自C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2的1个取代基取代。

[0300] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表C_1-C_8-烷基,所述C_1-C_8-烷基任选地被选自如下的至少一个取代基取代:C_3-C_8-环烷基;具有3至8个环成员的杂环基,其中杂原子选自N、O、S;C_1-C_8-烷氧基;卤素;-CN;-NO_2;-NH_2;-N(C_1-C_8-烷基);-N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-COOH;-COO(C_1-C_8-烷基);-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基);-$CONH_2$;-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基);-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基),优选C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2、苯基或杂芳族系统、单糖、多糖、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、聚合物、氨基酸、荧光团、蛋白质标签(第1代取代基),其中第1代取代基可再次任选地被如下基团取代:C_3-C_8-环烷基;具有3至8个环成员的杂环基,其中杂原子选自N、O、S;C_1-C_8-烷氧基;卤素;-CN;-NO_2;-NH_2;-N(C_1-C_8-烷基);-N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-COOH;-COO(C_1-C_8-烷基);-O-C(O)-(C_1-C_8-烷基);-$CONH_2$;-C(O)N(C_1-C_8-烷基)$_2$;-C(O)NH-(C_1-C_8-烷基);-N(H)-C(O)-(C_1-C_8-烷基),优选C_1-C_8-烷氧基、-COOH、-COO(C_1-C_8-烷基)和NO_2、苯基或杂芳族系统(第2代取代基),和其中第2代取代基可再次被选自相同组的至少一个取代基取代,和其中此类取代可进行至3、4、5、6、7、8、9或10代。

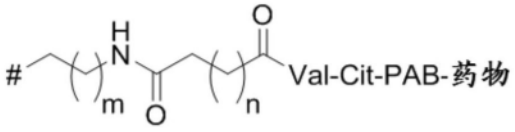
[0301] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的一些实施方案中,●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。在一些实施方案中,●代表糖。在一些实施方案中,●代表多糖。在一些实施方案中,●代表聚合物。在一些实施方案中,●代表任选取代的C_1-C_8-烷基,优选任选取代的C_1-C_6-烷基,更优选任选取代的C_1-C_4-烷基,甚至更优选任选取代的C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中,●代表任选取代的苯基。在一些实施方案中,●代表任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●

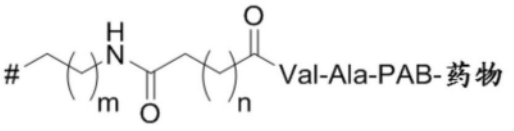
进一步包含与Y结合的连接子。

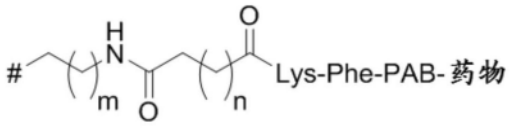
[0302] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在更优选的实施方案中,●代表肽、蛋白质、抗体或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在优选的实施方案中,●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

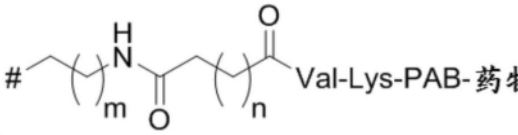
[0303] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,●代表药物、蛋白质标签、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、蛋白质、肽、抗体或寡核苷酸;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,●代表药物。在优选的实施方案中,●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中,●代表连接子-药物偶联物。在优选的实施方案中,●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中,●代表生物素。在优选的实施方案中,●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●代表肽。在优选的实施方案中,●代表抗体。在优选的实施方案中,●代表寡核苷酸。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

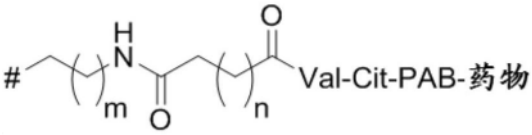
[0304] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,●代表连接子或连接子-药物偶联物。在优选的实施方案中,●代表连接子,比如如包含VC-PAB、VA-PAB、KF-PAB或VK-PAB的连接子,优选包含VC-PAB的连接子。在优选的实施方案中,●代表连接子-药物偶联物,比如如

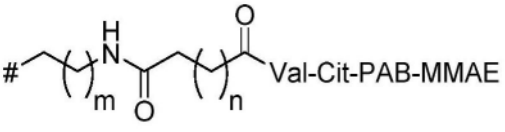


、


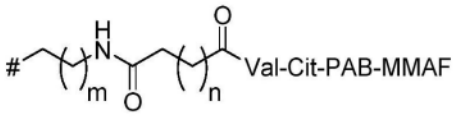
、


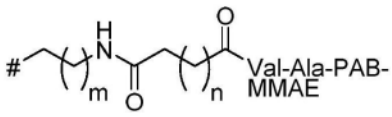
或


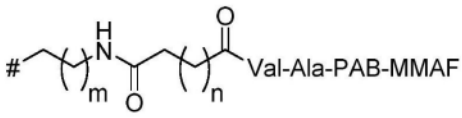
优选
,


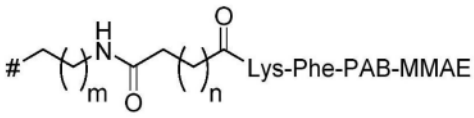
其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,m和
,
n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。更优选地,所述连接子药物偶联物为


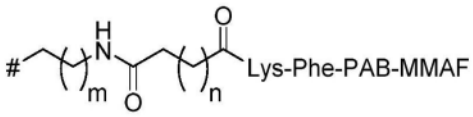
、

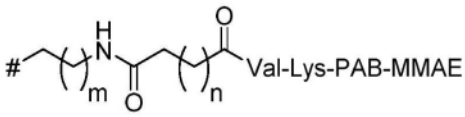


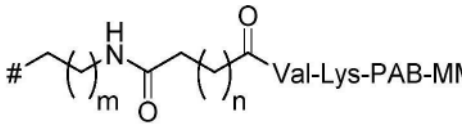
、


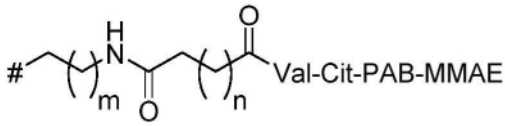
、


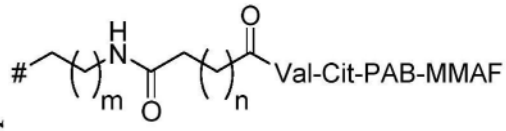
、


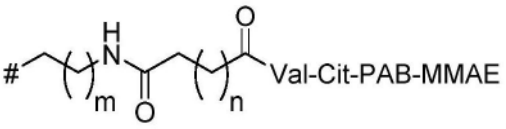
、


、


或


甚至更优选地为


或


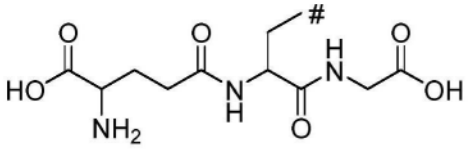
最优选地为


其中#表示Y(O(氧)或S(硫),优选S)的位置,m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选m为1且n为1。

[0305] 根据式(III)或(III*)的化合物中的任意一个,●●可代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸、寡核苷酸、糖、多糖、聚合物、任选取代的C_1-C_8-烷基、任选取代的苯基或任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。在优选的实施方案中,●●代表氨基酸、肽、蛋白质、抗体、核苷酸或寡核苷酸。在更优选的实施方案中,●●代表肽、蛋白质、抗体或寡核苷酸。在优选的实施方案中,●●代表氨基酸。在优选的实施方案中,●●代表肽。在优选的实施方案中,●●代表蛋白质。在优选的实施方案中,●●代表抗体。在优选的实施方案中,●●代表核苷酸。在优选的实施方案中,●●代表寡核苷酸。在一些实施方案中,●●代表糖。在一些实施方案中,●●代表多糖。在一些实施方案中,●●代表聚合物。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_1-C_8-烷基,优选任选取代的C_1-C_6-烷基,更优选任选取代的C_1-C_4-烷基,甚至更优选任选取代的C_1-C_2-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_3-C_8-烷基,优选任选取代的C_3-C_6-烷基,更优选任选取代的C_3-C_4-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的C_5-C_8-烷基,优选任选取代的C_6-C_7-烷基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的苯基。在一些实施方案中,●●代表任选取代的芳族5-或6-元杂环系统。

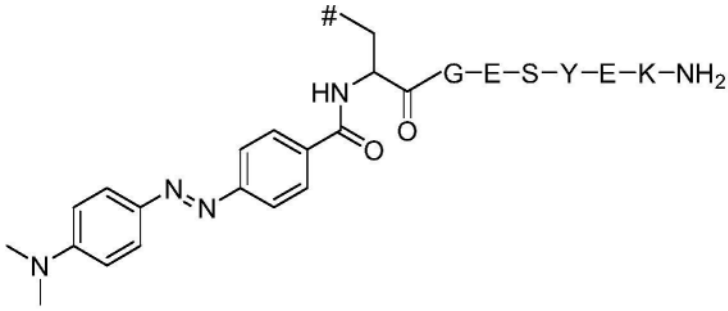
[0306] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,●●代表抗体,优选为IgG抗体,更优选地为西妥昔单抗或曲妥珠单抗或本妥昔单抗;蛋白质,优选GFP蛋白或

eGFP蛋白,白蛋白,三肽,优选式(VIII)



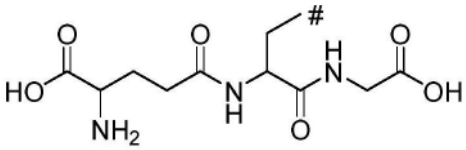
(VIII),

或式(IX)

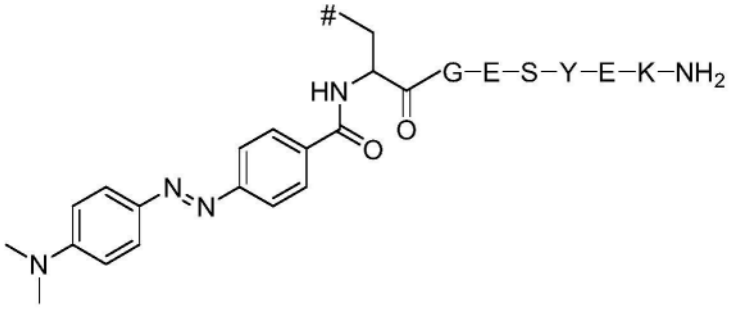


(IX)

的肽,其中#代表S的位置。因此,在优选的实施方案中,▬代表抗体。在更优选的实施方案中,所述抗体为IgG抗体,甚至更优选地为西妥昔单抗或曲妥珠单抗或本妥昔单抗。在优选的实施方案中,▬代表蛋白质,更优选GFP蛋白或eGFP蛋白。在优选的实施方案中,▬代表白蛋白。在优选的实施方案中,▬代表三肽。在优选的实施方案中,▬代表式(VIII)



(VIII)的肽。在优选的实施方案中,▬代表式(IX)



(IX)

的肽。在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,▬代表抗体(如西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗)和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表生物素。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表肽。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表蛋白质。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中,▬代表抗体和●代表小分子。任选地,在这些实施方案的任意一个中,所述●进一步包含与Y结合的连接子。

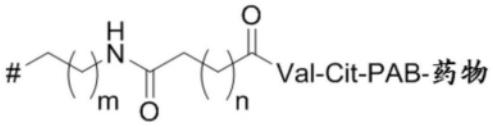
[0307] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中,▬代表蛋白质(如GFP蛋白或eGFP蛋白)和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、抗体、蛋白质、寡核苷酸或小分子;其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此,在优选的实施方案中,▬代表蛋白质和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中,▬代表蛋白质和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中,▬代表蛋白质和●代表

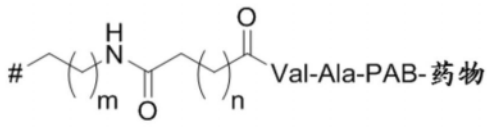
生物素。在优选的实施方案中，▬代表蛋白质和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表蛋白质和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表蛋白质和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表蛋白质和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表蛋白质和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

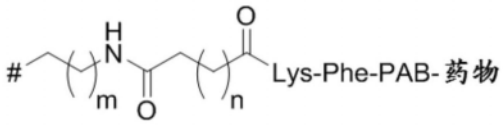
[0308] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表肽和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、抗体、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表生物素。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表肽和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

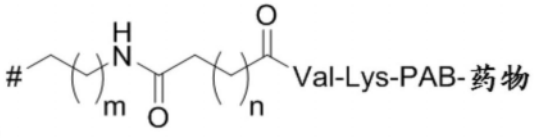
[0309] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表氨基酸和●代表蛋白质标签或诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素、肽、蛋白质、寡核苷酸或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表氨基酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

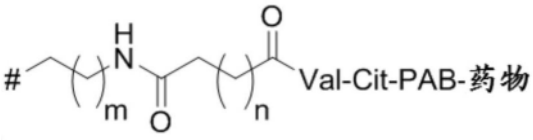
[0310] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表抗体(如西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗)和●代表连接子、药物或连接子-药物偶联物。因此，在优选的实施方案中，▬代表抗体和●代表连接子，比如如包含VC-PAB、VA-PAB、KF-PAB或VK-PAB的连接子，优选包含VC-PAB的连接子。在优选的实施方案中，▬代表抗体和●代表药物。在优选的实施方案中，▬代表抗体和●代表连接子-药物偶联物，比如如



、


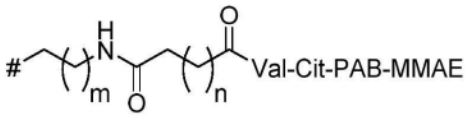
、优选


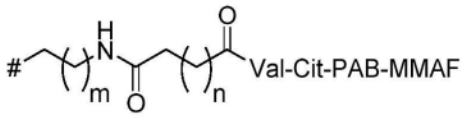
或


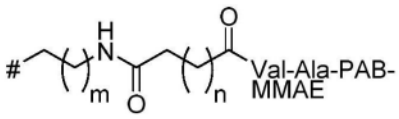
，


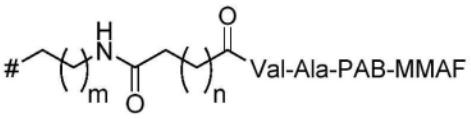
其中#表示Y(O(氧)或S(硫)，优选S)的位置，和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选m为1且n

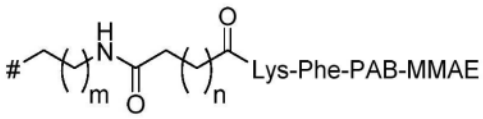
为1。在更优选的实施方案中，▬代表抗体和●代表连接子-药物偶联物，比如如

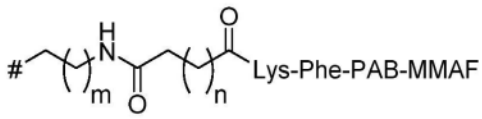


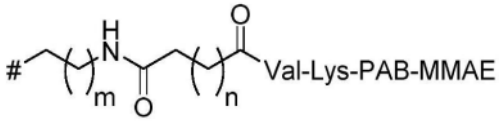
、


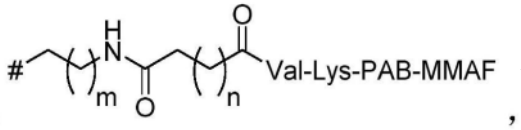
、


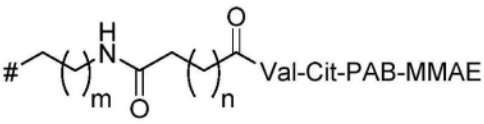
、


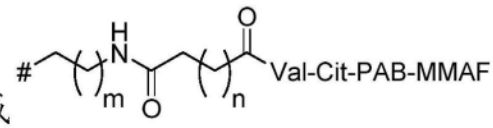
、


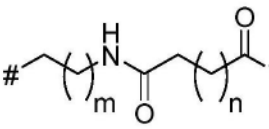
、


、


或


，甚至更优选地为


或


，最优选地为


，其中#表示Y(O(氧)或S(硫)，优选S)的位置，m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选m为1且n为1。在这些实施方案的任意一个中，所述抗体可以是西妥昔单抗、曲妥珠单抗或本妥昔单抗，优选本妥昔单抗。

[0311] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表核苷酸和●代表肽、蛋白质、蛋白质标签、抗体、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，▬代表核苷酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

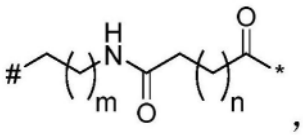
[0312] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表核苷酸和●代表连接子。

[0313] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表肽、蛋白质、蛋白质标签、抗体、寡核苷酸、诸如CY_5或EDANS的荧光团、生物素或小分子；其中任选地所述●进一步包含与Y结合的连接子。因此，在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表肽。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表蛋白质。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表蛋白质标签。在优选的实施方案中，▬代

表寡核苷酸和●代表抗体。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表诸如CY_5或EDANS的荧光团。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表生物素。在优选的实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表小分子。任选地，在这些实施方案的任意一个中，所述●进一步包含与Y结合的连接子。

[0314] 在任意一个式(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表寡核苷酸和●代表连接子。

[0315] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，●代表氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合。在一些实施方案中，所述化合物为式(I)的化合物或式(I*)的化合物。在一些实施方案中，●代表与固体支持物结合的氨基酸或肽。在一些实施方案中，●代表与固体支持物结合的核苷酸或寡核苷酸。在优选的实施方案中，●代表与固体支持物结合的肽。作为优点，本发明人发现本发明的硫代膦酸酯(Y＝S)在酸性条件(如90％三氟乙酸(TFA))下是高度稳定的，该酸性条件通常用于从固体支持物上裂解肽。如在上文的所述方法的上下文中所述的，所述固体支持物可以是本领域技术人员已知的适合固相肽合成的任何固体支持物，或者是适用于固相寡核苷酸合成的任何固体支持物。任选地，在上述其中氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合的实施方案中，所述●进一步包含与本文所述的结构式，特别是化合物(I)、(III)、(I*)和(III*)中的Y结合的连接子。此外，所述连接子与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸结合。因此，所述●可以具有连接子-氨基酸-固体支持物、连接子-肽-固体支持物、连接子-核苷酸-固体支持物或连接子-寡核苷酸-固体支持物的结构。所述“连接子”实际上可以是任何连接子，且所述连接子与Y结合，例如如本文对于式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物所述，所述Y为S(硫)或O(氧)，优选S。连接子可以是本领域技术人员已知的任何连接子，例如肽连接子或直链或支链的基于烃的部分。连接子也可以包含环状部分。肽连接子可以包含例如1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5、1至3或2或1个氨基酸。如果连接子是基于烃的部分，则该连接子的主链可仅包含碳原子，但还可包含诸如氧(O)、氮(N)或硫(S)原子的杂原子，和/或可包含羰基基团(C＝O)。连接子可以是，例如，C_1-C_{20}碳原子链或比如具有-(O-CH_2-CH_2)-重复单元的聚乙二醇基链的聚醚基链。在基于烃的连接子的典型实施方案中，连接部分包含1至约150、1至约100、1至约75、1至约50或1至约40，或1至约30或1至约20，包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和19个主链原子。本领域技术人员知晓选择合适的连接子。例如，在一些实施方案中，连接子可以是



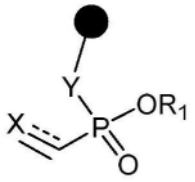
，其中#表示Y的位置，和*表示氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸的位置；和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数，优选地m为1且n为1。氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸可通过N(氮)原子与连接子结合。

[0316] 在任意一个式(I)、(I*)、(III)或(III*)的化合物的优选实施方案中，▬代表氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸，其中所述氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合。在一些实施方案中，▬代表与固体支持物结合的氨基酸或肽。在一些实施方案中，▬代表与固体支持物结合的核苷酸或寡核苷酸。在优选的实施方案中，▬代表与固

体支持物结合的肽。

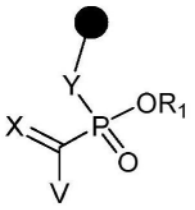
[0317] 本发明还涉及一种试剂盒,其包含固体支持物,和

[0318] 式(I)的化合物

[0319] 

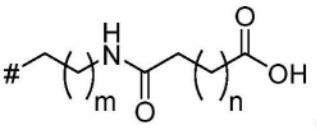
(I),

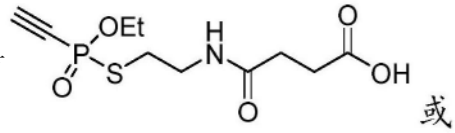
[0320] 和/或式(I*)的化合物

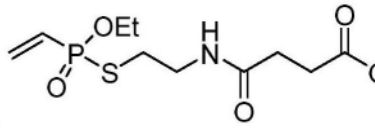
[0321] 

(I*),

[0322] 其中●为适于与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸结合的连接子;和

[0323] 其中、R_1、X、Y和V如上文和下文所定义。此类试剂盒适于固相肽合成和/或固相寡核苷酸合成。优选地,由于本发明人发现本发明的硫代膦酸酯(Y=S)在酸性条件(如90%三氟乙酸(TFA))下是高度稳定的,该酸性条件通常用于从固体支持物上裂解肽,因此,该试剂盒可用于固相肽合成。在固相合成中,氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸与固体支持物结合,且式(I)或式(I*)的化合物的连接子与氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸结合。在所述试剂盒的优选实施方案中,所述连接子为

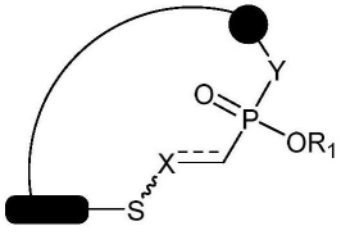
其中#表示Y的位置,和m和n各自独立地为如0至20、0至15、1至10、1至8、1至6、1至4、1至3、1至2或1的整数,优选地m为1且n为1。氨基酸、肽、核苷酸或寡核苷酸通过羧基与此连接子结合。在一些实施方案中,式(I)的化合物具有

或

的结构。

[0324] 试剂盒可进一步包含可用在固相合成中的一种或多种氨基酸、一种或多种肽、一种或多种核苷酸和/或一种或多种寡核苷酸。特别地,由于固相肽合成是优选的,试剂盒可包含一种或多种氨基酸。

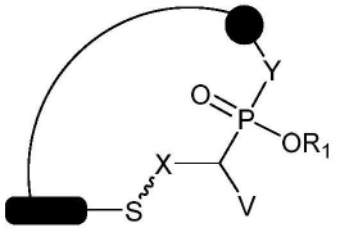
[0325] 本发明还涉及一种式(IIIa)的化合物

[0326] 

(IIIa),

[0327] 其中如所示通过连接●和的弧所述●和在同一个分子中,和其中●、、、X、Y和R_1如上文和下文所定义,特别如针对化合物(III)所定义。优选地,化合物(IIIa)为环状肽,比如例如源自BCL9肽的环状肽。

[0328] 本发明还涉及一种式(III*a)的化合物:

[0329] 

(III*a);

[0330] 其中如所示通过连接●和的弧所述●和在同一个分子中,和其中●、、V、X、Y和R_1如上文和下文所定义,特别如针对化合物(III*)所定义。优选地,化合物(III*a)为环状肽,比如例如源自BCL9肽的环状肽。

[0331] 此外,本文对于式(I)、(I*)、(III)、(III*)、(IIIa)或(III*a)的化合物在实施例部分作为实例提供的化合物是优选的。

[0332] 本领域技术人员应理解,根据本发明的实施方案可以彼此组合,只要排除会违反任何自然法则的组合即可。

[0333] 本文对于任意方法所描述的任何实施方案、特征、定义等加以必要改变后也可应用于本文所述的任何化合物。同样地,本文对于任意化合物所描述的任何实施方案、特征、定义等加以必要改变后也可应用于本文所述的任何方法。

[0334] 从三卤化磷开始合成式(IV)、(IV*)、(I)和(I*)的化合物

[0335] 以下部分提供了一些从三卤化磷开始合成式(IV)、(IV*)、(I)和(I*)的化合物的一般特征。通常,本领域技术人员知晓选择合适的反应条件以实施该合成。在下文的实施例部分给出了进一步的细节。

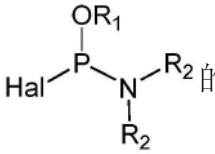
[0336] 如上文和下文所示,式(IV)或(IV*)的化合物可以通过包括步骤(i)至(iv)的顺序制备。因此,式(IV)或(IV*)的化合物可以通过如下合成:(i)使三卤化磷(X),优选PCl_3与包含R_1残基的醇(XI)反应,(ii)使步骤(i)得到的产物与胺(XII)反应,(iii)使步骤(ii)得到的产物与烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII)或与烯基卤化镁(XIII*)反应,和(iv)使步骤(iii)得到的产物与包含●残基的醇或硫醇(XIV)反应,以提供式(IV)或(IV*)的化合物。自式(IV)或(IV*)的化合物通过氧化可以获得式(I)或(I*)的化合物。

[0337] 步骤(i)

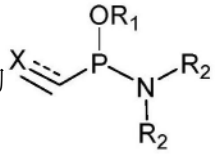
[0338] 可以通过,例如如下所述来进行步骤(i):使三卤化磷(X),优选PCl_3与醇(XI)在诸如如乙醚或四氢呋喃的合适溶剂中,于-10℃以下的低温下反应,然后使反应混合物升温;例如,所述温度范围可以为-50℃至+50℃;更具体地,所述反应可以在约-40℃或-30℃下进行,然后升温至室温。优选地,三卤化磷与醇的反应是在弱碱(诸如如三乙胺的胺碱)的存在下进行的。醇与三卤化磷的摩尔比应为5:1至1:5,优选2:1至1:2,更优选地,所述摩尔比为1:1。当采用弱碱(诸如如三乙胺的胺碱)时,所述碱与三卤化磷的摩尔比可以为5:1至1:5,例如2:1至1:2,优选地约1:1。当然,反应时间取决于反应体积和物质的量。作为指导,在升温之前的低温下的反应时间可以是2分钟至2小时,比如如约10分钟,而升温后的反应时间

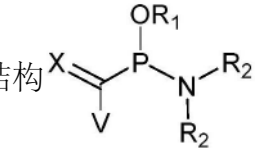
可以是15分钟至6小时,比如如约1小时。优选地,反应在诸如氩气的惰性气体下进行。在本上下文中,“惰性”是指在给定反应条件下不与任何起始原料或反应产物反应的气体。优选地,将步骤(i)的反应后得到的混合物直接用于步骤(ii),无需分离产物。任选地,在步骤(i)之后和步骤(ii)之前,可以如通过硅藻土过滤来纯化所述混合物。

[0339] 步骤(ii)

[0340] 可以通过,例如如下所述来进行步骤(ii):使步骤(i)获得的产物与胺(XII)(优选二异丙胺)在诸如如乙醚或四氢呋喃的合适溶剂中反应。在这方面,该溶剂可以与步骤(i)中的溶剂相同。步骤(ii)的反应可以在-10℃以下的低温下进行,然后使反应升温;例如,所述温度范围可以为-50℃至+50℃;更具体地,所述反应可以在约-40℃或-30℃下进行,然后升温至室温。胺(XII)的摩尔比可基于步骤(i)中采用的三卤化磷(X)的摩尔量。因此,胺(XII)与三卤化磷(X)的摩尔比应为5:1至1:5,优选地胺(XII)与三卤化磷(X)的摩尔比应为约2:1。作为指导,在升温之前的低温下的反应时间可以是2分钟至2小时,比如如约10分钟,而升温后的反应时间可以是15分钟至6小时,比如如约1小时。优选地,反应在诸如氩气的惰性气体下进行。将步骤(ii)的反应后得到的混合物直接用于步骤(iii),无需分离产物。任选地,在步骤(ii)之后和步骤(iii)之前,可以如通过硅藻土过滤来纯化所述混合物。在步骤(ii)中,可以获得具有一般结构的产物,其中根据步骤1中采用的三卤化磷,Hal为诸如Cl、Br或I的卤素,如当采用PCl_3时,Hal为Cl;和其中R_1和R_2如上文和下文所定义。

[0341] 步骤(iii)

[0342] 可以通过,例如如下所述来进行步骤(iii):使步骤(ii)获得的产物与烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII)或与烯基卤化镁(XIII*)在诸如如乙醚或四氢呋喃的合适溶剂中反应。在这方面,该溶剂可以与步骤(ii)中的溶剂相同。步骤(ii)的反应可以在-50℃以下的低温下进行,然后使反应升温;例如,所述温度范围可以为-100℃至+50℃;更具体地,所述反应可以在约-78℃下进行,然后升温至室温。烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII),或烯基卤化镁(XIII*)的摩尔比可基于步骤(i)中采用的三卤化磷(X)的摩尔量。因此,烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII)或烯基卤化镁(XIII*)与三卤化磷(X)的比应为5:1至1:5,优选地为2:1至1:2,更优选地,烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII)与三卤化磷(X)的摩尔比应为约1:1。作为指导,在升温之前的低温下的反应时间可以是2分钟至1小时,比如如约10分钟,而升温后的反应时间可以是15分钟至6小时,比如如约1小时。优选地,反应在诸如氩气的惰性气体下进行。通过步骤(iii)的反应得到的混合物可以进行后处理,然后可以通过本领域技术人员一般已知的,如硅胶色谱或真空蒸馏的方法来分离产物。在步骤(iii)中,当采用烯基卤化镁或炔基卤化镁(XIII)时,可以获得具有一般结构的产物,或者当采用烯基

卤化镁(XIII*)时,可以获得具有一般结构的产物,其中在这些结构的任意一个中,、R_1和R_2、X和V如上文和下文所定义。

[0343] 步骤(iv)

[0344] 可以通过,例如如下所述来进行步骤(iv):使步骤(iii)获得的产物与包含●残基的醇或硫醇(XIV)在诸如如乙腈的合适溶剂中反应。步骤(ii)的反应可以在-20℃以下的低温下进行,然后使反应升温;例如,所述温度范围可以为-50℃至+50℃;更具体地,所述反应可以在约-40℃下进行,然后升温至室温。优选地,步骤(iii)获得的产物与醇或硫醇(XIV)的反应在四唑存在下进行。所述四唑可以是未取代的四唑或取代的四唑。醇或硫醇(XIV)与步骤(iii)获得的产物的摩尔比应为5:1至1:5,优选地为2:1至1:2,更优选地所述摩尔比为约1:1。当采用四唑时,所述四唑与步骤(iii)获得的产物的摩尔比应为5:1至1:5,优选地,所述四唑与步骤(iii)获得的产物的摩尔比应为约2:1至1:2。作为指导,在升温之前的低温下的反应时间可以是2分钟至2小时,比如如约10分钟,而升温后的反应时间可以是15分钟至6小时,比如如约30分钟或约1小时。反应可以在诸如氩气的惰性气体下进行。

[0345] 氧化以合成式(I)或(I*)的化合物

[0346] 步骤(iv)得到式(IV)或(IV*)的化合物。然后通过在磷上氧化式(IV)或(IV*)的化合物获得式(I)或(I*)的化合物。可以将步骤(iv)的反应后得到的混合物直接用在该氧化中,而无需进一步的后处理或纯化,即可以直接将氧化剂添加到步骤(iv)的反应后得到的混合物中。可以使用各种合适的氧化剂,比如如叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)、间氯过氧苯甲酸(mCPBA)、过氧化氢(H_2O_2)、碘(I_2)、过氧硫酸钾或氧气(O_2),如来自空气的氧气。技术人员将容易地确定合适的氧化剂。优选地,可以将叔丁基过氧化氢(tBu-OOH)用作氧化剂。反应可在0至60℃的温度下,如在室温下进行。氧化剂的摩尔比可以基于步骤(iii)中获得的产物的摩尔量。因此,氧化剂与步骤(iii)中得到的产物的摩尔比应为2:1至1:2,优选地氧化剂与步骤(iii)中得到的产物的摩尔比应为1:1。作为指导,氧化的反应时间可以是2分钟至2小时,比如如约10分钟。反应可以在诸如氩气的惰性气体下进行。可以对通过氧化获得的混合物进行后处理,并且可以通过本领域技术人员一般已知的,如硅胶色谱的方法来分离获得的式(V)或(V*)的化合物。

[0347] 从亲电子二硫化物开始合成式(I)或(I*)的化合物

[0348] 以下部分提供了一些从亲电子二硫化物(electrophilic disulfide)开始合成式(I)和(I*)的化合物(其中Y为S(硫))的一般特征。通常,本领域技术人员知晓选择合适的反应条件以实施该合成。在下文的实施例部分给出了进一步的细节。

[0349] 如上文和下文所示,式(I)或(I*)的化合物(其中Y为S)可以通过使亲电子二硫化物(XXX)与包含●残基的硫醇(XXXI)反应得到式(VIa)的化合物。式(VIb)的化合物可根据文献已知方法制备。然后使式(VIa)或(VIb)的化合物与包含R_1残基的式(V)或(V*)的磷(III)化合物反应,得到式(I)或(I*)的化合物。式(V)的化合物可以通过使携带R_1残基的式(XX)的卤代亚磷酸酯与式(XXI)的格氏(Grignard)化合物反应来制备,和式(V*)的化合物可以通过使式(XX)的卤代亚磷酸酯与式(XXI*)的格氏(Grignard)化合物反应来制备。

[0350] 式(V)或(V*)的化合物的合成

[0351] 可以通过,例如如下所述来制备式(V)或式(V*)的化合物:使式(XXI)的烯基卤化镁或炔基卤化镁-优选式(XXI)的烯基卤化镁-或式(XXI*)的烯基卤化镁与包含R_1残基的式(XX)的卤代亚磷酸酯反应。优选地,式(XXI)的烯基卤化镁或炔基卤化镁或式(XXI*)的烯基卤化镁为烯基溴化镁或炔基溴化镁。优选地,式(XX)的卤代亚磷酸酯为氯代亚磷酸酯。可以采用,例如乙醚或四氢呋喃作为合适的溶剂。优选地,反应在-20℃以下,如-100℃至-40℃,优选-90℃至-50℃(如约-78℃)的温度下进行。优选地,反应在诸如氩气的惰性气体下进行。作为指导,反应时间应为2分钟至4小时,比如如2小时。式(XXI)的烯基卤化镁或炔基卤化镁或式(XXI*)的烯基卤化镁与式(XXI)的卤代亚磷酸酯的摩尔比应为5:1至1:5,如2:1至1:2,如约1:1,比如如式(XXI)的烯基卤化镁或炔基卤化镁或式(XXI*)的烯基卤化镁与式(XXI)的卤代亚磷酸酯的比为约1:1.2。详情请参阅,例如M.R.J.Vallée,Angewandte Chemie Int.Ed.,2013,52(36),9504。

[0352] 式(VIa)或(VIb)的化合物的合成

[0353] 可以通过例如使式(XXX)的亲电子二硫化物与包含●残基的硫醇(XXXI)反应制备式(VIa)或(VIb)的化合物。该反应可以在合适的溶剂,比如例如四氢呋喃或N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中进行。优选地,式(XXX)的亲电子二硫化物与硫醇(XXXI)的反应是在弱碱(诸如如三乙胺的胺碱)的存在下进行的。该反应可以在0℃至60℃的温度下,比如例如在室温下进行。式(XXX)的亲电子二硫化物与硫醇(XXXI)的摩尔比应为5:1至1:5,优选2:1至1:2,更优选地为约1:1,比如如式(XXX)的亲电子二硫化物与硫醇(XXXI)的比为1:1.2。当采用弱碱(诸如如三乙胺的胺碱)时,所述碱与式(XXXI)的硫醇的摩尔比可以是5:1至1:5,优选地,所述碱与式(XXXI)的硫醇的摩尔比是约3:1。反应时间可以为例如2分钟至6小时,比如如约1小时,或约20分钟或约10分钟。可以使用适当的方法,比如如薄层色谱法来监测反应。反应在诸如氩气的惰性气体下进行。可以通过本领域技术人员一般已知的,如硅胶色谱的方法来分离包含●残基的式(VIa)的化合物。可根据文献已知方法制备式VIb的化合物,例如,通过使硫醇●-SH(XXXI)与硫酰氯(参见例如Allared,F.等人,Synthetic Metals,120(1-3),1061-1062;2001)或亚硫酰氯(参见如Masaki,Yukio等人,Chemical&Pharmaceutical Bulletin,33(5),1930-40;1985)反应制备,或通过使硫醇●-SH(XXXI)与N-氯代琥珀酰亚胺(NCS)(参见如Kawamura,Takamasa等人,European Journal of Organic Chemistry,2015(4),719-722;2015)或氯气(参见如E.Schneider,Chemische Berichte 84,911-916(1951))反应制备,其中●如上文和下文所定义。

[0354] 式(I)或(I*)的化合物的合成

[0355] 可以通过使式(V)或(V*)的化合物与式(VIa)或(VIb)的化合物反应来制备式(I)或(I*)的化合物(其中Y为S)。优选地,式(V)或(V*)的化合物为烯烃亚膦酸酯(phosphonite),即式(V)或(V*)的化合物中为双键。该反应在合适的有机溶剂,比如如四氢呋喃中或在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中或在溶剂混合物,比如如在四氢呋喃和甲苯的混合物中进行。该反应可以在0℃至60℃的温度下,如在室温下进行。优选地,反应可以在诸如氩气的惰性气体下进行。式(V)或(V*)的化合物与式(VIa)或(VIb)的化合物的摩尔比应为5:1至1:5,优选地为2:1至1:1,更优选地为约1:1,比如如式(V)或(V*)的化合物与式

(VIa)或(VIb)的化合物的摩尔比为约1.2:1。作为指导,反应时间可以为例如2分钟至6小时,比如如约2小时、约1小时、约30分钟或约10分钟。可以通过本领域技术人员一般已知的,如硅胶色谱的方法来分离式(I)或(I*)的化合物。

[0356] 化合物(I)或(I*)与式(II)的化合物的氢硫醇化(hydrothiolation)

[0357] 式(I)或(I*)的硫代膦酸酯或膦酸酯可以在合适的溶剂中与式(II)的硫醇进行氢硫醇化反应。所述溶剂系统可以从多种溶剂中选择。所述溶剂可以是极性非质子溶剂系统,比如四氢呋喃(THF)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙腈(MeCN)、丙酮、二甲基亚砜(DMSO)、乙酸乙酯(EtOAc)、N-乙基吡咯烷酮或它们的混合物,优选为THF、DMF、DMSO;非极性溶剂,比如己烷、甲苯、苯、1,4-二恶烷、氯仿、乙醚或二氯甲烷(DCM),优选DCM;极性质子溶剂,比如水、乙醇、异丙醇、甲醇、正丁醇,优选乙醇;或它们的混合物。例如,所述氢硫醇化可以在DMF或DMF/水混合物中进行。特别地,当诸如如蛋白质、抗体、肽、核苷酸或寡核苷酸的生物分子反应时,可以在DMF或DMF/水混合物中进行氢硫醇化。所述溶剂也可以是水性介质,比如如水或水性缓冲液,比如如磷酸盐缓冲盐水(PBS)、三(羟甲基)-氨基甲烷(TRIS)、碳酸氢盐、EDTA/NH_4HCO_3缓冲液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的EDTA/NH_4HCO_3或含硼酸盐的磷酸盐缓冲盐水。若在氢硫醇化反应中采用诸如如蛋白质、抗体、肽、核苷酸或寡核苷酸的生物分子,则优选在缓冲液中进行该反应。也可以在任意一种前述的水性缓冲液和DMF的混合物中进行氢硫醇化。本领域技术人员可容易地选择合适的溶剂和缓冲液。

[0358] 优选地,硫代膦酸酯或磷酸酯的氢硫醇化反应在碱性条件下进行,特别是在轻微碱性条件下,如pH为如7.2至9,比如如在pH为8或8.5的条件下进行。此类碱性条件可以通过使用合适的缓冲系统,比如如,通过使用上述任何一种缓冲液来建立。另外地或可选地,用于氢硫醇化反应的碱性条件也可以通过使用弱碱来建立。合适的碱为,如诸如$(NH_4)_2CO_3$、Na_2CO_3、Rb_2CO_3、K_2CO_3或Cs_2CO_3的碳酸盐或它们相关的碳酸氢盐(如$NaHCO_3$等);以及弱的含氮碱,比如三甲胺Et_3N(25℃下,pKa 10,76)。优选地,采用pKa值为7,5至11,5的碱。本领域技术人员将容易地选择合适的碱。

[0359] 氢硫醇化的反应温度没有特别的限制。例如氢硫醇化可在0℃至60℃、0℃至50℃、0℃至40℃、0℃至30℃的温度下,如在室温下(即约25℃),如在约5℃,或如在约37℃的生理相关条件下进行。反应时间取决于温度、反应体积和物质的量。作为指导,反应可以在如1分钟至24小时的时间框内,如在1分钟至20小时的时间框内、1分钟至10小时的时间框内、1分钟至3小时的时间框内或甚至在1分钟至1小时的时间框内进行。本领域技术人员可以容易地确定合适的反应温度和反应时间。

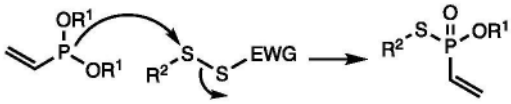
[0360] 在下文的实施例部分给出了与氢硫醇化反应相关的更多细节。

实施例

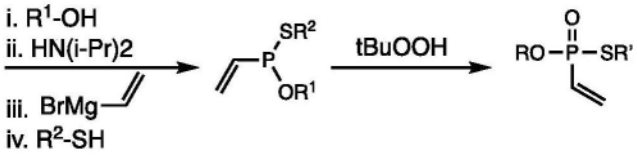
[0361] 实施例1:烯烃-硫代膦酸酯的合成

[0362] 本发明人开发了两种不同的合成途径来获得烯烃-硫代膦酸酯:即自亲电子二硫化物的一步反应或可选地从诸如三氯化磷(PCl_3)的三卤化磷开始。在本文中(有关合成的详细信息和表征,参见下文的实施例10)描述了并在方案2中描绘了两种途径以及分离的化合物。仅作为示例性实例,证明了其中R^1为甲基或乙基的衍生物(O-乙基和O-甲基衍生物(R^1=甲基,乙基);参见方案2)的合成。但是,两种合成途径均不限于该范围。如实施例部分所

用,“R^2”或在某些情况下仅仅为“R”,即与S结合的残基,对应于本说明书中所用的●。

[0363] 二硫化物途径:

EWG:吸电子基团

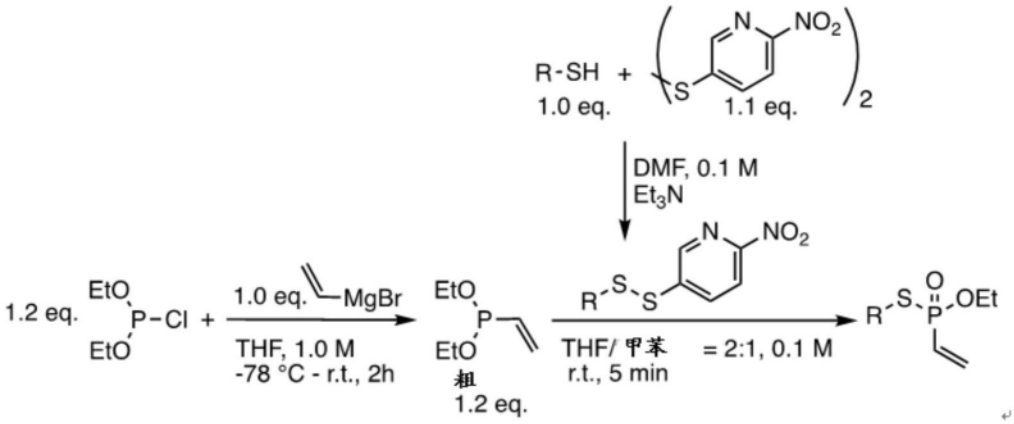
[0364] PCl_3途径:

[0365] 方案2:烯烃-硫代膦酸酯的合成

[0366] 亲电子二硫化物途径

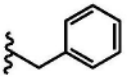
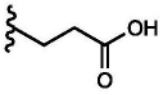
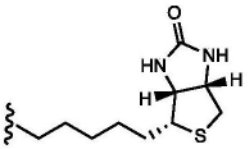
[0367] 可以在由亲电子二硫化物和烯基亚膦酸酯的一步反应中获得烯烃-硫代膦酸酯。不希望受到任何理论的束缚,假设亚膦酸酯的磷原子的游离孤对攻击了二硫化物的亲电子硫,由此生成了高反应性的中间体,该中间体迅速氧化为硫代膦酸酯。

[0368] 根据公开的方案(M.R.J.Vallée,Angewandte Chemie Int.Ed.,2013,52(36),9504)合成了二乙基烯烃亚膦酸酯,并使其与不同的脂肪族亲电子二硫化物反应,参见方案3。通过相应的硫醇与2,2’-二硫代双(5-硝基吡啶)(PNP)的反应获得亲电子二硫化物。通过硅胶柱色谱来分离O-乙基烯烃-硫代膦酸酯。表1给出了收率。

[0369] 

[0370] 方案3:通过二乙基烯烃亚膦酸酯与亲电子二硫化物的反应合成O-乙基烯烃-硫代膦酸酯。

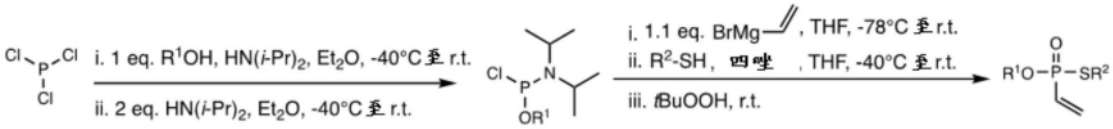
[0371]

项目	R=	化合物	分离收率(%)
1		**1**	53
2		**2**	63
3		**3**	27
4		**4**	58

[0372] 表1:通过二硫化物途径合成的O-乙基烯烃-硫代膦酸酯和分离收率。

[0373] PCl_3途径

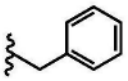
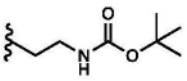
[0374] 可选地,在一些取代反应中,然后通过用如tBuOOH的氧化剂的氧化可以将PCl_3转化为烯烃-硫代膦酸酯(方案4)。

[0375] 

[0376] 方案4:从PCl_3合成烯烃-硫代膦酸酯。

[0377] 采用这一途径,得到苄基和Boc保护的胺衍生物并通过硅胶色谱将其分离(结构和收率参见表2)。

[0378]

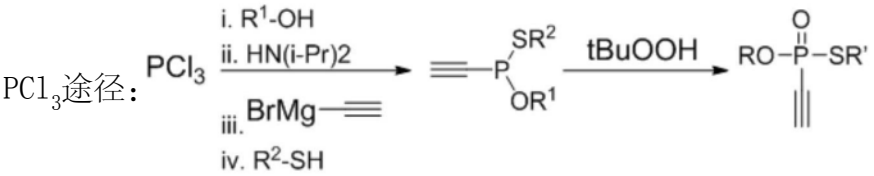
项目	R=	化合物	分离收率(%)
1		**5**	37
2		**6**	36

[0379] 表2:通过PCl_3途径合成的O-乙基烯烃-硫代膦酸酯及分离收率。

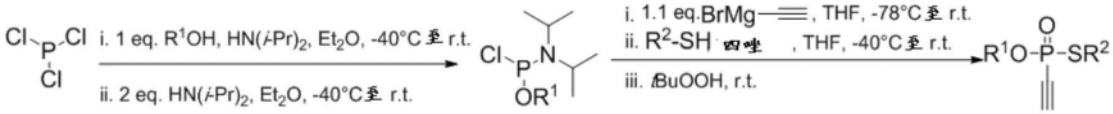
[0380] 实施例2:炔烃-硫代膦酸酯的合成

[0381] 与烯烃-硫代膦酸酯类似(参见上文实施例1和下文方案5),可以从PCl_3开始获得炔烃-硫代膦酸酯。

[0382] PCl_3途径：



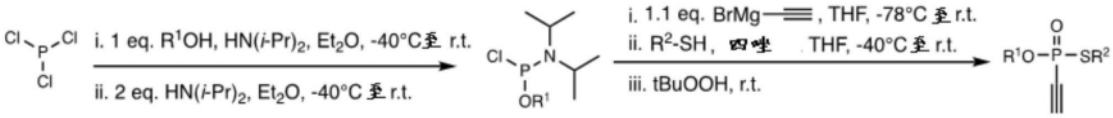
[0383]



[0384] 方案5：通过PCl_3途径合成炔烃-硫代膦酸酯。

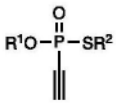
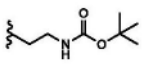
[0385] 采用PCl_3途径，本发明人通过硅胶色谱能够分离所需的产物(结构和收率参见方案6和表3)。

[0386]



[0387] 方案6：炔烃-硫代膦酸酯的合成。

[0388]

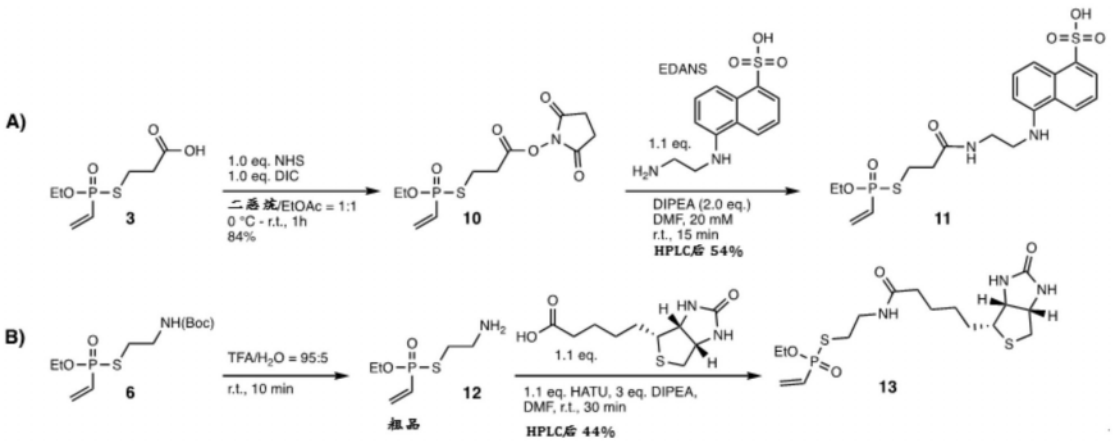
项目		化合物	分离收率(%)
1	R^1= 甲基，R^2=苄基	**7**	18*
2	R^1= 乙基，R^2= 苄基	**8**	34
3	R^1= 乙基，R^2= 	**9**	32

[0390] 表3：合成的O-甲基炔烃-PT及分离收率。*(从N,N-二异丙基甲基膦酰胺酰氯(phosphonamidic chloride)开始)

[0391] 实施例3：通用硫代膦酸酯构建模块的进一步功能化

[0392] 通用羧酸或胺硫代膦酸酯衍生物可进一步通过如胺偶联的手段被如荧光团EDANS或生物素的功能化构建模块修饰。方案7中给出了两个示例性实例(更多的化合物以及炔烃衍生物，参见下文的实施例14)。

[0393]



[0394] 方案7:通用硫代膦酸酯构建模块的功能化的实例。A)可以将羧酸衍生物活化成NHS酯,并进一步与如荧光团EDANS的胺反应。B)可选地,可以通过将胺PT偶联到如生物素的羧酸上来交换再活化剂。

[0395] 实施例4A:谷胱甘肽与硫代膦酸酯的硫醇加成

[0396] 作为论证不饱和硫代膦酸酯与硫醇反应的原理证据,本发明人在碱性水性缓冲液中进行了与模型硫醇谷胱甘肽的偶联,得到了水溶性的硫代膦酸酯-偶联物。通过UV LC-MS和^{31}P-NMR监测该反应(参见图1的烯烃-硫代膦酸酯)。

[0397] 图1示出了:A)谷胱甘肽-烯烃-硫代膦酸酯-偶联物14的合成。通过B)UV LC-MS和C)^{31}P-NMR监测该反应,表明形成了单一的产物。P:产物14,SM:起始原料=烯烃-硫代膦酸酯2,PMe_4Br=四甲基溴化鏻,内标^{31}P-NMR。

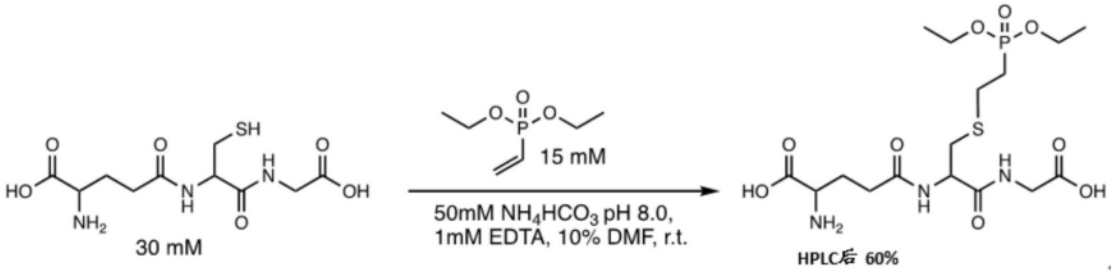
[0398] 通过^{31}P-NMR和UPLC-MS监测该反应,表明是生成单一产物(P)的清洁反应。

[0399] 与上述类似,本发明人进行了谷胱甘肽与炔烃衍生物,即与来自下文实施例11的S-苄基O-甲基炔烃-PT 7的偶联(表3,项目1)(参见图2A)。该反应比采用烯烃-硫代膦酸酯的反应快得多(还比较了动力学研究,参见下文实施例5)。在指定的条件下,本发明人观察到炔烃-硫代膦酸酯在约1分钟后完全转化。两个双键异构体以大约3:1的比率形成。

[0400] 图2示出了:A)谷胱甘肽-炔烃-PT-偶联物15的合成。通过B)UV LC-MS监测该反应,表明以大约3:1的比率形成了两个双键异构体。将肌苷用作内标。

[0401] 实施例4B:谷胱甘肽与烯烃膦酸酯的硫醇加成

[0402] 本发明人通过硫醇加成的方法进行了二乙基烯烃膦酸酯与谷胱甘肽的偶联,得到了水溶性的偶联物(参见方案1)。

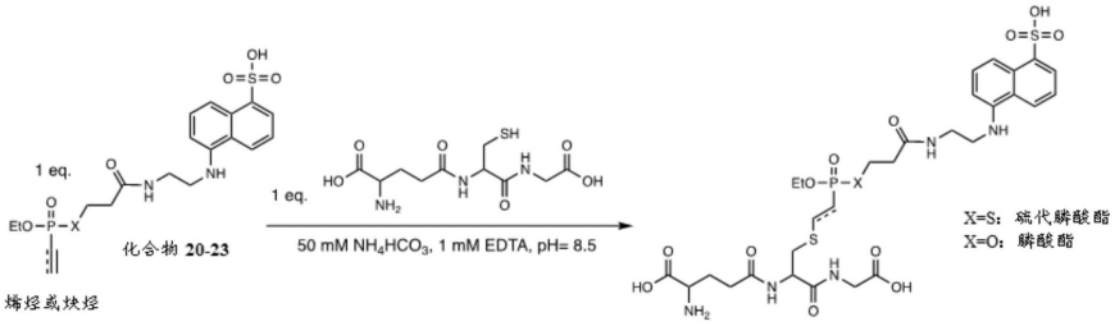
[0403] 

[0404] 方案1:谷胱甘肽-膦酸酯偶联物的合成。

[0405] 通过^{31}P-NMR和UPLC-MS监测该反应,表明是生成单一产物的清洁反应。可以通过半制备HPLC(酸性条件)以60%的收率分离偶联物。

[0406] 实施例5:与硫代膦酸酯和膦酸酯的硫醇加成的动力学研究

[0407] 在下一步骤中,本发明人着手研究向不饱和硫代膦酸酯的硫醇加成的动力学,以获得动力学数据。对此,本发明人于室温(约25℃)下在1当量的还原型谷胱甘肽的存在下,对烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯进行了与荧光EDANS的加成反应(方案8)。本发明人还采用相应的膦酸酯衍生物进行了相同的研究。对于这些化合物的制备,参见下文的实施例14。

[0408] 

[0409] 方案8:谷胱甘肽与荧光烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯和膦酸酯的偶联。

[0410] 在8小时的过程中,使用荧光检测器通过HPLC监测原材料的衰变。本研究的结果示于下文的图3中。以下两种趋势是明显的:首先,在硫醇加成中,炔烃衍生物的反应比烯烃衍生物快得多。其次,硫代膦酸酯比膦酸酯反应更快。这是硫代膦酸酯的重要优点,因为这将允许使用者以更低的浓度进行该反应,并在更短的时间内获得更高的转化率,最终也增加了反应的收率。这在例如通常需要高的药物与抗体的比率的抗体-药物偶联物的生产中是至关重要的。

[0411] 图3示出了:在pH 8.5下将谷胱甘肽加成到烯烃和炔烃硫代膦酸酯和膦酸酯的动力学研究。示出的是原材料随时间的衰减。使用带有荧光检测器的HPLC测量相对于内标的剩余起始原料的荧光强度。每个反应进行三次。示出的是具有标准偏差的平均值。起始原料面积(Area starting material)为1.0是指100％的起始原料。

[0412] 实施例6:硫代膦酸酯偶联物的稳定性研究

[0413] 当使用不饱和硫代膦酸酯作为生物偶联处理剂(handle)时,重要的考虑因素是所得的硫醇加成产物在生理相关条件下是否稳定。为了解决这个问题,本发明人利用了Dabcyl-EDANS淬灭剂对(quencher pair),并合成了相应的烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯偶联物,以及相应的烯烃-和炔烃膦酸酯偶联物(图4)。这些化合物使我们能够监测偶联物在复杂基质(如细胞裂解液或血清)中的稳定性。

[0414] 当偶联物是完整的时候,Dabcyl和EDANS非常接近,并且EDANS的荧光被淬灭。一旦偶联物裂解,则EDANS释放,从而可以检测和定量其荧光。

[0415] 这些淬灭剂对化合物不仅允许监测P-S键的稳定性,而且可以监测硫醇偶联物的稳定性。这是非常重要的,因为由此也可以检测到潜在的逆硫醇加成或与其它硫醇的交换。

[0416] 图4示出了:EDANS-Dabcyl淬灭剂对的设计,该淬灭剂对经由硫代膦酸酯或膦酸酯偶联化学而连接。如果被包围的部分被裂解,那么EDANS失去了其对Dabcyl的接近性,因此EDANS的荧光将不再被淬灭。

[0417] 本发明人在以下条件下监测了烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯以及烯烃-和炔烃-膦酸酯的稳定性:PBS(磷酸盐缓冲盐水)pH＝7.4,Hela细胞裂解物,人血清。温度为室温(约25℃)。在大约3天的过程中监测荧光。作为阳性对照,在相同条件下测量未偶联的EDANS和游离的Dabcyl-肽(1:1)。结果示于图5。右列显示与左列相同的数据集的缩放。同样,作为对照,用1M NaOH处理硫代膦酸酯和膦酸酯,这导致硫代膦酸酯和膦酸酯的快速裂解。这证实了在使用pH＝7.4的PBS、HeLa细胞裂解物或人血清的分析中,仅以非常低的程度发生了裂解(如果有的话)。

[0418] 在磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)中,所有衍生物均显示出良好的稳定性。在Hela细

胞的裂解物中和血清中,它们也显示出良好的稳定性,由此从表明基于硫代膦酸酯的生物偶联物和基于膦酸酯的生物偶联物在生理相关条件下是稳定的。

[0419] 图5示出了:硫代膦酸酯偶联物和膦酸酯偶联物在指定条件下的稳定性。荧光增强意味着偶联物裂解。

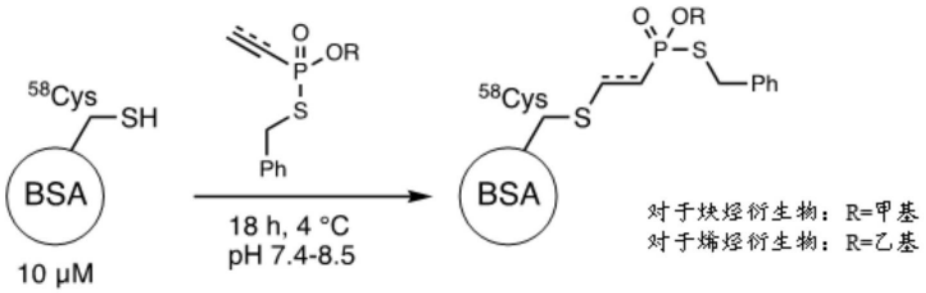
[0420] 实施例7:与硫代膦酸酯的蛋白质偶联

[0421] 以下,本发明人将烯烃-炔烃-硫代膦酸酯偶联至模型蛋白牛血清白蛋白(BSA)和单克隆抗体西妥昔单抗。

[0422] 实施例7A1:牛血清白蛋白与硫代膦酸酯的偶联

[0423] 作为模型蛋白,本发明人选择了牛血清白蛋白(BSA)以偶联至烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯。通过该实验证明,对于蛋白质水平的半胱氨酸选择性修饰,烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯是合适的生物偶联处理剂。BSA具有一个还原的半胱氨酸残基(Cys58),可通过PT进行烷基化。理论上,由于其它半胱氨酸存在于二硫桥中,因此它们不与硫代膦酸酯反应。

[0424] 为了进行修饰,在pH=7.4-8.5下,将BSA溶液于4℃下与过量的PT反应18h(参见方案9)。

[0425] 

[0426] 方案9:采用PT的BSA修饰

[0427] 反应后,对修饰的蛋白质进行SDS-PAGE,然后进行胶内胰蛋白酶消化,接着对获得的肽进行MS/MS分析。

[0428] MS/MS分析的结果汇总于表4。两种衍生物均获得了良好的BSA序列覆盖率。并且,修饰的程度高(对于烯烃-硫代膦酸酯而言>50%;和对于炔烃-膦酸硫代酸酯而言>90%)。对于烯烃-膦酸酯衍生物,在某种程度也修饰了其它氨基酸(His、Ser、Thr、Arg)。然而,采用更少的当量和/或将pH降低到7.4减少了与这些氨基酸的反应。观察到炔烃-硫代膦酸酯与半胱氨酸的反应比烯烃-硫代膦酸酯的选择性更高。

[0429]

条件		结果
pH	eq. PT	
烯烃-硫代膦酸酯 2		
8.5	100 eq.	使用胰凝乳蛋白酶进行消化可以以高序列覆盖率检测到BSA。无论是否具有硫代膦酸酯修饰，均可可靠地检测到几种含 C58 的肽：可可靠地识别 ^{55}LQQCPFDEHVKL^{66}、^{55}LQQCPFDEHVKLVNELTEF^{73} 、^{56}QQCPFDEHVKL^{66} 和 ^{56}QQCPFDEHVKLVNELTEF^{73} （评分＞20）。修饰程度非常高(> 50%)。 还可以检测到被硫代膦酸酯修饰的其他肽。由此，不仅在半胱氨酸上发现了修饰，而且还在组氨酸和其它氨基酸上发现了修饰。但是，这些肽所估计的修饰程度要低得多：（H42 约 5-10%、H91/S89/T92 约 10-20%、H169/R168 小于 1%、

[0430]

	H361/R360 约 5-10%，所有值均由信号强度比估算得出。）
8.5 & 50 eq. 或 7.4 & 100 eq.	使用胰凝乳蛋白酶进行消化可以以高序列覆盖率检测到BSA。可以可靠地检测到几种含 C58 的肽（评分＞20）。修饰程度非常高(> 50%)。 还可以检测到被硫代膦酸酯修饰的其他肽。由此，不仅在半胱氨酸上发现了修饰，而且还在组氨酸和其它氨基酸上发现了修饰。但是，这些肽所估计的修饰程度要低得多：（H42 约2-5%、H91 约 5-10%、H169/Y171/R168 约 1-5%、H361/R360 约 1- 5%，所有值均由信号强度比估算得出。） 探针 pH 8.5 / 50 eq.与探针 pH 7.4 / 100 eq.在修饰程度上未显示出显著差异。
炔烃-硫代膦酸酯 7	
pH= 7.4/8.0/8.5 & 100 eq.	在所有pH值下，可清楚地检测到BSA的单个游离半胱氨酸(C58)，并发现该半胱氨酸有约90%被炔烃-硫代膦酸酯修饰。预估在其它氨基酸上的修饰<10%，但更多情况下<1%。

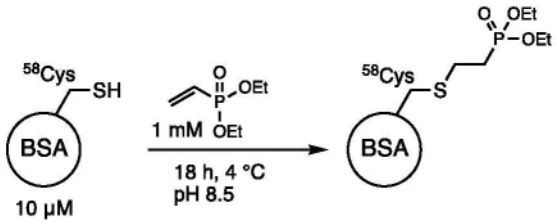
[0431] 表4:硫代膦酸酯修饰的BSA蛋白的MS/MS分析结果。

[0432] 总之,结果表明了半胱氨酸的选择性,即根据需要,BSA的半胱氨酸被烯烃或炔烃硫代膦酸酯选择性修饰。

[0433] 实施例7A2:牛血清白蛋白与膦酸酯的偶联

[0434] 本发明人可进一步证明,如对偶联物的MS/MS分析所示,可以以半胱氨酸选择性的方式(参见表5)将二乙基烯烃膦酸酯偶联至模型蛋白牛血清白蛋白(BSA)(方案10)。BSA具有一个还原的半胱氨酸残基(Cys58),其可用于烷基化。

[0435]



[0436] 方案10:采用二乙基烯烃膦酸酯的BSA修饰。

[0437]

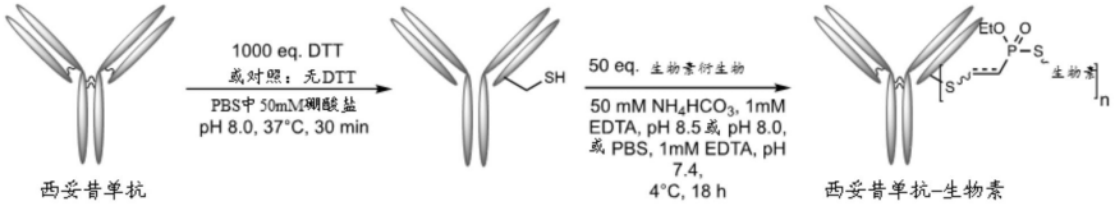
条件		结果
pH	Eq. 膦酸酯	
8.5	100 eq.	使用胰凝乳蛋白酶进行消化可以以高序列覆盖率检测到BSA。无论是否具有膦酸酯修饰，均可检测到几种含C58的肽：可可靠地识别 ^{55}LQQCPFDEHVKL^{66}、^{55}LQQCPFDEHVKLVNELTEF^{73} 和 ^{56}QQCPFDEHVKL^{66}（评分＞20）。修饰程度非常高(> 50%)。 还可以检测到被膦酸酯修饰的其他肽。由此，不仅在半胱氨酸上发现了修饰，而且还在组氨酸、赖氨酸和苏氨酸上发现了修饰。但是，这些肽所估计的修饰程度要低得多：（K44 和 H361 占 1%、T255/K256 和 K297/299 和或 C301/302 1-3%，所有值均由信号强度比估算得出。）

[0438] 表5:膦酸酯修饰的BSA蛋白的MS/MS分析结果。

[0439] 总之,这些结果表明了半胱氨酸的选择性,即根据需要,BSA的半胱氨酸被烯烃或炔烃膦酸酯选择性修饰。

[0440] 实施例7B:抗体与硫代膦酸酯的偶联

[0441] 最后,本发明人将这种新的半胱氨酸选择性反应序列事件(sequence)用于IgG抗体的偶联(方案11)。修饰策略依赖于先前应用于马来酰亚胺偶联的两步还原-烷基化方法(S.O.Doronina,B.E.Toki,M.Y.Torgov,B.A.Mendelsohn,C.G.Cerveny,D.F.Chace,R.L.DeBlanc,R.P.Gearing,T.D.Bovee,C.B.Siegall,J.A.Francisco,A.F.Wahl,D.L.Meyer,P.D.Senter,Nat Biotech 2003,21,778-784.)。第一步,通过用二硫苏糖醇(DTT)处理将把抗体保持(hold)在一起的链间二硫桥还原。然后游离的巯基可以在硫醇加成反应中与硫代膦酸酯反应。用西妥昔单抗进行了首批实验,所述西妥昔单抗是一种针对人表皮生长因子的单克隆IgG1抗体。

[0442] 

[0443] 方案11:采用生物素修饰的烯烃-硫代膦酸酯4的半胱氨酸选择性抗体修饰的两步还原和烷基化方法。

[0444] 作为原理证据,将抗体用生物素烯烃-衍生物4修饰,并通过SDS-PAGE,然后通过抗-生物素蛋白质印记进行分析。

[0445] 抗-生物素蛋白质印记分析的结果示于图6。可以确认在pH＝7.4(泳道3)和pH＝8.5(泳道5)下抗体片段(重链和轻链)被生物素硫代膦酸酯衍生物4修饰。在更高的pH＝8.5下的收率更高(比较泳道3和5)。需注意,如果不预先用DTT还原二硫键,则无法检测到修饰(泳道4和6)。为了比较,还使用相同方案在pH＝7.4时用生物素-马来酰亚胺标记了抗体。尽管在马来酰亚胺的情况下修饰的程度比PT更高(比较泳道1和3),但是由于这种情况还检测到对非还原抗体(泳道2)也有修饰,因此该反应显然对半胱氨酸没有化学选择性。

[0446] 图6示出了:还原SDS-gel后,西妥昔单抗偶联的蛋白质印迹分析。上图:印迹后,膜的丽春红S染色(Ponceau S stain)显示等量的印迹抗体。下图:生物素修饰的抗体片段的化学发光检测(Strep-HRP)。在pH＝7.4(泳道1-4)或在pH＝8.5(泳道5-6)下进行还原的抗体与生物素化合物的反应。M＝标记(蛋白梯)。

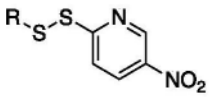
[0447] 任选地,本发明人还在pH 8.5下进行了西妥昔单抗与生物素-硫代膦酸酯衍生物28(烯烃)和13(炔烃)的偶联(图7A),以及在pH 7.4、8.0和8.5下进行了西妥昔单抗与28的偶联以作为对照(图7B)。在标记抗体中,炔烃-硫代膦酸酯比烯烃-硫代膦酸酯更有效(图7A)。与对于烯烃-硫代膦酸酯4(图6)相似,对于炔烃-硫代膦酸酯28而言,随着pH的增加,采用炔烃-硫代膦酸酯获得了更多标记的抗体。

[0448] 图7示出了:还原SDS-gel后,西妥昔单抗偶联的蛋白质印迹分析。A)在pH 8.5下采用化合物13和28的修饰。B)在pH 7.4-8.5下采用化合物28的修饰。

[0449] 总之,结果表明了半胱氨酸的选择性,即根据需要,抗体的半胱氨酸被烯烃或炔烃硫代膦酸酯选择性修饰。

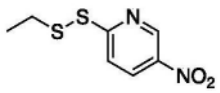
[0450] 实施例8:亲电子二硫化物的合成程序

[0451] 一般程序A:由2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶)合成混合的二硫化物

[0452] 

[0453] 在经火焰干燥的圆底烧瓶中加入在10ml(c＝0.1M)THF中的1.0mmol(1.0eq.)硫醇。随后加入3.0mmol(3.0eq.)三乙胺和1.2mmol(1.2eq.)二硫化物2,2'-二硫代双(5-硝基吡啶),并将反应混合物在室温搅拌10分钟。通过TLC监测反应。当达到完全转化时(约10分钟),减压蒸发挥发性物质并通过硅胶快速柱色谱(flash column chromatography)纯化残余物。

[0454] 2-(乙基二硫烷基)-5-硝基吡啶

[0455] 

[0456] 根据一般程序A,由乙硫醇制备2-(乙基二硫烷基)-5-硝基吡啶(103μl,1.34mmol)。通过快速柱色谱(已烷/EtOAc=10:1)纯化粗产物以得到呈黄色油的标题化合物(228mg,1.05mmol,78%)。

[0457] ^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=9.24(d,J=2.6,1H),8.39(dd,J=8.9,2.6,1H),7.92(d,J=8.9,1H),2.85(q,J=7.3,2H),1.34(t,J=7.3,3H)ppm。

[0458] ^{13}C NMR(75M,氯仿-d)δ=169.42,145.15,141.99,131.67,119.18,33.01,14.36ppm。

[0459] HRMS(ESI):$C_7H_9N_2O_2S_2$[M+H$^+$]的计算值:217.0100;实测值:217.0106。

[0460] 2-(苄基二硫烷基)-5-硝基吡啶

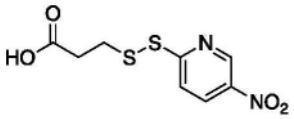
[0461] 根据一般程序A,由苄基硫醇制备2-(苄基二硫烷基)-5-硝基吡啶(48μl,0.41mmol)。通过快速柱色谱(已烷/EtOAc=10:1)纯化粗产物以得到呈无色固体的标题化合物(91mg,0.33mmol,80%)。

[0462] ^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=9.18(d,J=2.6,1H),8.15(dd,J=8.9,2.6,1H),7.49(d,J=8.9,1H),7.30-7.24(m,2H),7.24-7.17(m,3H),4.04(s,2H)ppm。

[0463] ^{13}C NMR(75MHz,氯仿-d)δ=168.90,144.86,141.81,136.10,131.17,129.50(2C),128.83(2C),128.04,119.03,77.36,43.86ppm。

[0464] HRMS(ESI):$C_{12}H_{11}N_2O_2S_2$[M+H$^+$]的计算值:279.0256;实测值:279.0271。

[0465] 3-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙酸

[0466] 

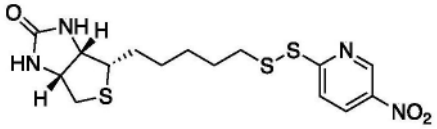
[0467] 根据一般程序A,由巯基丙酸制备3-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙酸(250μl,2.85mmol)。通过快速柱色谱(已烷/EtOAc=1:1+0.1%甲酸)纯化粗产物以得到呈黄色油的标题化合物(80mg,1.54mmol,54%)。

[0468] ^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=9.26(d,J=2.6Hz,1H),8.40(dd,J=8.8,2.7Hz,1H),7.87(d,J=8.8Hz,1H),3.09(t,J=6.8Hz,2H),2.82(t,J=6.8Hz,2H)ppm。

[0469] ^{13}C NMR(75MHz,氯仿-d)δ=177.25,168.05,145.34,142.35,131.91,119.68,33.69,33.33。

[0470] HRMS:n.d。

[0471] 2-(生物素基二硫烷基)-5-硝基吡啶

[0472] 

[0473] 根据一般程序A,由生物素硫醇制备2-(生物素基二硫烷基)-5-硝基吡啶(44mg,0.179mmol)。通过快速柱色谱(DCM/MeOH=20:1至10:1)纯化粗产物以得到呈黄色固体的标题化合物(53mg,0.134mmol,75%)。

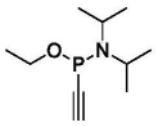
[0474] ^{1}H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=9.27(d,J=2.6Hz,1H),8.42(dd,J=8.9,2.6Hz,1H),

7.91(d,J＝8.9Hz,1H),4.51(s,1H),4.37-4.24(m,1H),3.14(d,J＝6.4Hz,1H),2.97-2.68(m,4H),1.76-1.61(m,4H),1.44(d,J＝3.5Hz,4H)ppm。

[0475] HRMS(ESI):$C_{15}H_{21}N_4O_3S_3$[M+H$^+$]的计算值:401.0770;实测值:401.0791。

[0476] 实施例9:磷(III)前体的合成程序

[0477] 1-乙氧基-1-乙炔基-N,N-二异丙基膦胺

[0478] 

[0479] 在氩气氛围下,向经火焰干燥的圆底Schlenk烧瓶中加入三氯化磷(12.5mmol,1090μl)和无水醚(50ml),并在干冰浴中冷却至-30℃。加入乙醇(12.5mmol,728μl)和三乙胺(12.5mmol,1.733ml),在-30℃下将溶液搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌1小时。将得到的白色悬浮液经硅藻土过滤。在氩气氛围下,将滤液收集在经火焰干燥的圆底Schlenk烧瓶中,并再次冷却至-30℃。加入二异丙胺(25mmol,3.528ml),在-30℃下将反应混合物搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌1小时。再次将得到的悬浮液经硅藻土过滤。在氩气氛围下,将澄清的滤液冷却至-78℃,并加入乙炔基溴化镁溶液(在THF中0.5M,13.75mmol,27.5ml),在-78℃下搅拌10分钟,然后再在室温下搅拌1小时。然后将反应混合物减压浓缩至约20ml,用饱和$NaHCO_3$水溶液(60ml)稀释,并用EtOAc(3x 120ml)萃取。将合并的有机层用$NaSO_4$干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化得到的油状残留物,从而得到呈黄色油的标题化合物(1.236g,6.14mmol,49%),通过^{1}H和^{31}P NMR判断纯度为约80%。该化合物无需进一步纯化即可用于下一步。

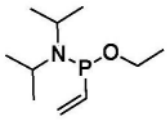
[0480] ^{1}H-NMR(300MHz,乙腈-d_3)δH＝3.84-3.57(m,4H),3.35(d,J＝1.8Hz,1H),1.20(m,15H)ppm。

[0481] ^{13}C-NMR(75MHz,乙腈-d_3)δC＝91.78(d,J＝7.4Hz),85.72(d,J＝17.8Hz),61.9(d,J＝16.2Hz),47.4,23.5,16.5(d,J＝16.5)ppm。

[0482] ^{31}P-NMR(122MHz,乙腈-d_3)δP＝92.25ppm。

[0483] HRMS(ESI):$NaC_{10}H_{20}NOP$[M+Na$^+$]的计算值:224.1180;实测值:224.1270。

[0484] 1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺

[0485] 

[0486] 在氩气氛围下,向经火焰干燥的圆底Schlenk烧瓶中加入三氯化磷(12.5mmol,1090μl)和无水醚(50ml),并在干冰浴中冷却至-30℃。加入乙醇(12.5mmol,728μl)和三乙胺(12.5mmol,1.733ml),在-30℃下将溶液搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌1小时。将得到的白色悬浮液经硅藻土过滤。在氩气氛围下,将滤液收集在经火焰干燥的圆底Schlenk烧瓶中,并再次冷却至-30℃。加入二异丙胺(25mmol,3.528ml),在-30℃下将反应混合物搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌1小时。再次将得到的悬浮液经硅藻土过滤。在氩气氛围下,将澄清的滤液冷却至-78℃,并加入乙烯基溴化镁溶液(在THF中1.0M,13.75mmol,13.75ml),在-78℃下搅拌10分钟,然后再在室温下搅拌1小时。然后将反应混合物减压浓缩至约20ml,用饱和$NaHCO_3$水溶液(60ml)稀释,并用EtOAc(3x 120ml)萃取。将合并的有机层

用$NaSO_4$干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化得到的油状残留物,从而得到呈无色油的标题化合物(852mg,4.19mmol,34%),通过^1H和^{31}P NMR判断纯度>95%。

[0487] ^1H-NMR(300MHz,乙腈-d_3)δH=6.36-6.14(m,1H),5.77-5.53(m,2H),3.81-3.61(m,2H),3.47(dt,J=9.8,6.7Hz,2H),1.23-1.04(m,15H)ppm。

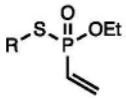
[0488] ^{13}C-NMR(75MHz,乙腈-d_3)δC=142.30(d,J=6.9Hz),124.41(d,J=19.6Hz),62.1(d,J=20.7Hz),45.5(d,J=9.50Hz),23.90(m),16.66(d,J=7.7Hz)ppm.

[0489] ^{31}P-NMR(122MHz,乙腈-d_3)δP=113.79ppm。

[0490] HRMS(ESI):$C_{10}H_{23}NOP[M+H^+]$的计算值:204.1517;实测值:204.1596。

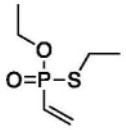
[0491] 实施例10:烯烃硫代膦酸酯的合成程序

[0492] 一般程序B:经由二硫化物途径合成烯烃-PT

[0493] 

[0494] 在氩气氛围下,将0.5mmol(1.0eq.)混合的二硫化物置于经火焰干燥的Schlenk管中并溶解在无水THF/甲苯(2:1,5ml)的混合物中。在室温下,向搅拌的混合物中逐滴添加二乙基烯烃亚膦酸酯溶液(THF中约0.6M,0.6mmol,0.6ml,1.2eq.),并搅拌10分钟。然后将反应混合物干燥-装载(dry-packed)在硅胶上,并通过快速柱色谱纯化。

[0495] O,S-二乙基烯烃-PT(化合物1)

[0496] 

[0497] 根据一般程序B,由混合的二硫化物2-(乙基二硫烷基)-5-硝基吡啶(100mg,0.462mmol)制备O,S-二乙基烯烃-PT。通过快速柱色谱(已烷/EtOAc=4:1至1:1梯度)纯化粗产物以得到呈无色油的标题化合物(44mg,0.244mmol,53%)。

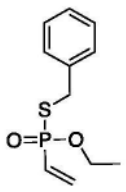
[0498] ^1H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=6.40-5.98(m,3H),4.30-4.06(m,2H),2.89-2.72(m,2H),1.41-1.30(m,6H)ppm。

[0499] ^{13}C NMR(75MHz,氯仿-d)δ=133.92,131.82,129.90,61.83,24.98,16.51ppm。

[0500] ^{31}P NMR(122MHz,氯仿-d)δ=42.12ppm。

[0501] HRMS(ESI):$C_6H_{14}O_2PS[M+H^+]$的计算值:181.0447;实测值:181.0460。

[0502] S-苄基O-乙基烯烃-PT(化合物2)

[0503] 

[0504] 根据一般程序B,由混合的二硫化物2-(苄基二硫烷基)-5-硝基吡啶(100mg,0.359mmol)制备S-苄基O-乙基烯烃-PT。通过快速柱色谱(已烷/EtOAc=4:1至1:1梯度)纯化粗产物以得到呈黄色油的所述化合物2(55mg,0.227mmol,63%)。

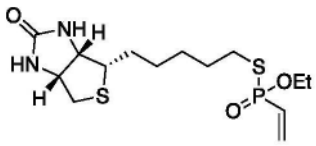
[0505] ^1H NMR(300MHz,氯仿-d)δ=7.42-7.19(m,5H),6.40-5.91(m,3H),4.28-3.39(m,4H),1.31(t,J=7.1Hz,3H)ppm。

[0506] ^{13}C(75MHz,氯仿-d)δ=162.92,137.01,134.54,130.53,128.87,128.59,128.57,127.56,62.23,34.37,16.08ppm。

[0507] ^{31}P NMR(122MHz,氯仿-d)δ=42.69ppm。

[0508] HRMS(ESI):$C_{11}H_{15}O_2PS$[M+H$^+$]的计算值:242.0525;实测值:242.0551。

[0509] O-乙基S-生物素烯烃-PT(化合物4)

[0510] 

[0511] 根据一般程序B,在溶剂混合物THF/DMF=5:1中由混合的二硫化物2-(生物素基二硫烷基)-5-硝基吡啶(40mg,0.100mmol)制备O-乙基S-生物素烯烃-PT。通过快速柱色谱(100%DCM至DCM/MeOH=9:1梯度)纯化粗产物以得到呈黄色固体的所述化合物4(21mg,0.0576mmol,58%)。

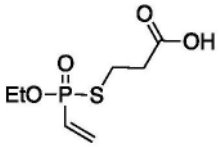
[0512] ^1H NMR(600MHz,氯仿-d)δ=6.35-6.05(m,3H),5.83(d,J=24.7Hz,1H),5.24(s,1H),4.52(dd,J=7.8,4.9Hz,1H),4.32(dd,J=7.8,4.6Hz,1H),4.26-4.11(m,2H),3.17-3.12(m,1H),2.92(dd,J=12.8,5.0Hz,1H),2.87-2.72(m,3H),2.15(s,2H),1.75-1.60(m,4H),1.49-1.39(m,4H),1.36(td,J=7.1,1.5Hz,3H)ppm。

[0513] ^{13}C NMR(151MHz,氯仿-d)δ=163.43,133.85,130.75(dd,J=145.2,9.9Hz),62.10-61.69(m,2C),60.17,55.52,40.53,30.59(t,J=5.2Hz),30.12,28.51(d,J=8.7Hz),28.30(d,J=25.5Hz,2C),16.32(d,J=6.8Hz)ppm。

[0514] ^{31}P NMR(122MHz,氯仿-d)δ=42.57ppm。

[0515] HRMS(ESI):$C_{14}H_{26}N_2O_3PS_2$[M+H$^+$]的计算值:365.1117;实测值:365.1141。

[0516] 3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酸(化合物3)

[0517] 

[0518] 根据一般程序B,由混合的二硫化物3-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙酸(146mg,0.561mmol)制备3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酸。通过快速柱色谱(不加酸的己烷/EtOAc=4:1至EtOAc+0.1%甲酸)纯化粗产物以得到呈无色油的化合物3(33.7mg,0.150mmol,27%)。通过随后的HPLC纯化(30min内5-40%MeCN)获得分析纯样品*。

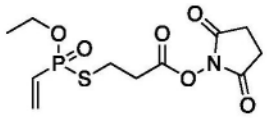
[0519] ^1H NMR(600MHz,氯仿-d)δ=9.25(s,1H),6.38-6.08(m,3H),4.26-4.13(m,2H),3.09-2.96(m,2H),2.74(t,J=7.2,2H),1.35(t,J=7.1,3H)ppm。

[0520] ^{13}C NMR(151MHz,氯仿-d)δ=174.98,134.92,130.18(d,J=145.9Hz),62.52(d,J=6.9Hz),35.73(d,J=3.5Hz),25.02(d,J=2.8Hz),16.38(d,J=6.9Hz)ppm。

[0521] ^{31}P NMR(122MHz,氯仿-d)δ=43.17ppm。

[0522] HRMS(ESI):$C_7H_{14}O_4PS_2$[M+H$^+$]的计算值:225.0345;实测值:225.0358。

[0523] 2,5-二氧代吡咯烷-1-基3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酸酯(化合物10)

[0524] 

[0525] 将10mg羧酸3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酸3(0.0446mmol,1.0eq)和N-羟基琥珀酰亚胺(5.1mg,0.0446mg,1.0eq.)溶于400μl的二恶烷/EtOAc＝1:1的混合物中,并冷却至0℃。将9.2mg二环已基碳二亚胺(0.0446mmol,1.0eq.)添加到搅拌的溶液中,并使混合物升温至室温。1小时后,将悬浮液过滤并减压干燥澄清的残余物以得到12mg所述的产物10(0.0374mmol,84%)。

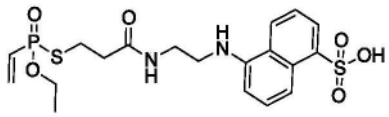
[0526] ^{1}H NMR(600MHz,氯仿-d)δ＝6.39-6.09(m,3H),4.29-4.13(m,2H),3.19-2.99(m,4H),1.37(t,J＝7.1Hz,3H)ppm。

[0527] ^{13}C NMR(151MHz,氯仿-d)δ＝168.92,166.85,134.76,130.50(d,J＝146.2Hz),62.41(d,J＝6.8Hz),33.03(d,J＝3.0Hz),25.71,24.57(d,J＝2.9Hz),16.40(d,J＝6.9Hz)ppm。

[0528] ^{31}P NMR(122MHz,氯仿-d)δ＝41.44ppm。

[0529] HRMS(ESI):$C_{11}H_{17}NO_6PS$[M+H$^+$]的计算值:322.0509;实测值:322.0540。

[0530] 5-((2-(3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酰胺基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(化合物11)

[0531] 

[0532] 将30mg的NHS酯2,5-二氧代吡咯烷-1-基3-((乙氧基(烯烃)磷酰基)硫代)丙酸酯10(0.0934mmol,1.0eq.)和30mg的EDANS(0.103mmol,1.1eq.)溶解在置于Eppendorf管中的470μl DMF中。加入33μl(0.189mmol,2.0eq.)的DIPEA并将悬浮液在室温下搅拌15分钟。将挥发性物质减压蒸发并通过制备型HPLC(40min内5-60%MeCN,流速16ml/min)纯化粗产物,冻干后得到24mg呈白色粉末的所述的化合物11(0.0508mmol,54%)。

[0533] ^{1}H NMR(600MHz,DMSO-d_6)δ＝8.32(d,J＝8.6Hz,1H),8.22(t,J＝5.8Hz,1H),8.07(d,J＝8.5Hz,1H),7.96(d,J＝7.0Hz,1H),7.40(dd,J＝8.5,7.1Hz,1H),7.34(t,J＝8.1Hz,1H),6.81(d,J＝7.3Hz,1H),6.38(ddd,J＝28.0,18.4,12.4Hz,1H),6.25-6.11(m,2H),4.14-3.98(m,2H),3.41(t,J＝6.2Hz,2H),3.32(t,J＝6.5Hz,2H),2.93(ddt,J＝18.0,12.9,6.6Hz,2H),1.26(t,J＝7.0Hz,3H)ppm。

[0534] ^{13}C NMR(151MHz,DMSO-d_6)δ＝170.42,144.21,134.28,130.60(d,J＝142Hz),130.09,125.92,124.59,124.07,123.23,122.62,61.37(d,J＝6.7Hz),44.79,37.23,36.23(d,J＝4.0Hz),25.42(d,J＝2.8Hz),16.10(d,J＝6.5Hz)ppm。

[0535] ^{31}P NMR(243MHz,DMSO-d_6)δ＝41.29ppm。

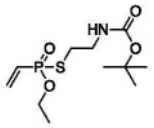
[0536] HRMS(ESI):$C_{19}H_{26}N_2O_6PS_2$[M+H$^+$]的计算值:473.0964;实测值473.0984。

[0537] 一般程序C:经由PCl_3途径合成烯烃-PT

[0538] 将1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺(如0.3mmol)加入圆底烧瓶中,溶解在无水乙腈(3ml)中并冷却至-40℃。单独制备硫醇(0.3mmol)的四唑溶液(在MeCN中0.45M,0.6mmol,1.33ml),并在-40℃下将其添加至搅拌的混合物中。将反应混合物在-40℃下搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌30分钟。在室温下向该混合物中添加叔丁基过氧化氢溶液

(H_2O中70wt.%,0.3mmol,86μl),并搅拌10分钟。然后将反应混合物用H_2O(10ml)稀释,并用DCM(3x 30ml)萃取。将合并的有机层用Na_2SO_4干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化粗产物。

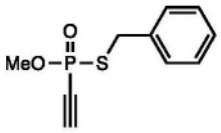
[0539] (2-((乙氧基(乙烯基)磷酰基)硫代)乙基)氨基甲酸叔丁酯(化合物6)

[0540] 

[0541] 根据一般程序C,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺(93mg,0.465mmol)和(2-巯基乙基)氨基甲酸叔丁酯(82mg,0.465mmol)开始制备化合物6。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(30mg,0.10mmol,22%)。

[0542] 实施例11:合成炔烃硫代膦酸酯的程序

[0543] S-苄基O-甲基乙炔-PT(化合物7)

[0544] 

[0545] 在氩气氛围下,向配有搅拌棒的经火焰干燥的Schlenk管中加入无水THF(17mL),随后加入乙炔基溴化镁的THF溶液(0.5M,4mL,2mmol)。然后将该溶液冷却至-78℃,加入1-氯-N,N-二异丙基-1-甲氧基膦胺(0.39mL,2mmol),搅拌10min,然后升温至0℃达35min,然后至室温(然后取0.5mL反应混合物用于^{31}P-NMR)。然后在氩气下将反应混合物转移至经火焰干燥的RBF中,真空除去溶剂,留下固体,并将烧瓶装满氩气。将固体冷却至-40℃,加入无水四唑的MeCN溶液(11mL,5mmol),加入无水苄硫醇(0.6mL,1.7mmol),搅拌过夜得到固体悬浮液。向混合物中加入70%叔丁基过氧化氢的H_2O溶液(1.6mL,12mmol),然后搅拌30min。然后真空除去溶剂,用水稀释,用DCM萃取,用盐水洗涤,并用$MgSO_4$干燥。真空除去溶剂,得到棕色油,将其加载至采用已烷/乙酸乙酯(1:0至1:1)作为洗脱剂的硅胶柱上,得到呈黄色油的纯产物(82mg,0.362mmol,18%)。

[0546] ^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$)δH=7.40-7.28(5H,m,5x芳族C(sp^2)-H),4.17(1H,d,^{3}JHP=3.2Hz,S-CHa),4.11(1H,d,^{3}JHP=1.8Hz,S-CHb),3.71(3H,d,^{3}JHP=14.0Hz,O-CH3),3.20(1H,d,^{3}JHP=12.6Hz,CCH)ppm。

[0547] ^{13}C-NMR(76MHz,$CDCl_3$)δC=135.39(d,^{3}JCP=6.1Hz,IPSO芳族C(sp^2)),129.07(s,间位芳族C(sp^2)),128.76(s,邻位芳族C(sp^2)),127.88(s,对位芳族C(sp^2),89.76(d,^{2}JCP=43.2Hz,C(sp)-H),76.66(d,^{1}JCP=239.2Hz,C(sp)),52.93(d,^{2}JCP=6.2Hz,O-CH3),34.96(d,^{2}JCP=3.5Hz)。

[0548] ^{31}P-NMR(122MHz,$CDCl_3$)δP=17.59(m)ppm。

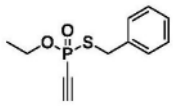
[0549] HRMS(ESI):$C_{10}H_{11}O_2PS$[M+H$^+$]的计算值:227.0290;实测值:227.0293。

[0550] 一般程序D:经由PCl_3途径合成炔烃-硫代膦酸酯

[0551] 将1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(如0.3mmol)加入圆底烧瓶中,溶解在无水乙腈(3ml)中并冷却至-40℃。单独制备硫醇(0.3mmol)的四唑溶液(0.45M MeCN中,0.6mmol,1.33ml),并在-40℃下将其添加至搅拌的混合物中。将反应混合物在-40℃下搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌30分钟。在室温下向该混合物中添加叔丁基过氧化氢溶液

(H_2O中70wt.%,0.3mmol,86μl),并搅拌10分钟。然后将反应混合物用H_2O(10ml)稀释,并用DCM(3x 30ml)萃取。将合并的有机层用Na_2SO_4干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化粗产物。

[0552] S-苄基O-乙基乙炔基硫代膦酸酯(化合物8)

[0553] 

[0554] 根据一般程序C,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(25mg,0.123mmol)和巯基苄基(14.4μl,0.123mmol)开始制备化合物8。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(10mg,0.042mmol,34%)。

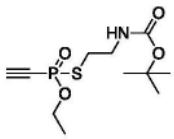
[0555] ^{1}H-NMR(300MHz,CDCl3)δH=7.45-7.25(m,5H),4.28-4.02(m,4H),3.12(d,J=12.5Hz,1H),1.35(t,J=7.1Hz,3H)ppm。

[0556] ^{13}C-NMR(76MHz,CDCl3)δC=136.47(d,J=6.4Hz),129.09,128.91,127.84,88.90(d,J=43.0Hz),63.50(d,J=3.3Hz),35.04(d,J=3.3Hz),28.27,16.05(d,J=7.7Hz)ppm。

[0557] ^{31}P-NMR(122MHz,CDCl3)δP=15.36ppm。

[0558] HRMS:n.d。

[0559] (2-((乙氧基(乙炔基)磷酰基)硫代)乙基)氨基甲酸叔丁酯(化合物9)

[0560] 

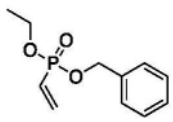
[0561] 根据一般程序D,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(93mg,0.465mmol)和(2-巯基乙基)氨基甲酸叔丁酯(82mg,0.465mmol)开始制备化合物9。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(50mg,0.17mmol,37%)。

[0562] 实施例12:合成烯烃-膦酸酯的程序

[0563] 一般程序E:经由PCl_3途径合成烯烃-膦酸酯

[0564] 将1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺(如0.3mmol)加入圆底烧瓶中,溶解在无水乙腈(3ml)中并冷却至-40℃。单独制备醇(0.3mmol)的四唑溶液(MeCN中0.45M,0.6mmol,1.33ml),并在-40℃下将其添加至搅拌的混合物中。将反应混合物在-40℃下搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌30分钟。在室温下向该混合物中添加叔丁基过氧化氢溶液(H_2O中70wt.%,0.3mmol,86μl),并搅拌10分钟。然后将反应混合物用H_2O(10ml)稀释,并用DCM(3x 30ml)萃取。将合并的有机层用Na_2SO_4干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化粗产物。

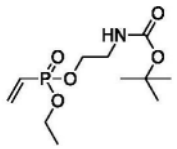
[0565] 苄基乙基乙烯基膦酸酯

[0566] 

[0567] 根据一般程序E,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺(25mg,0.123mmol)和苯甲醇(12.3μl,0.123mmol)开始制备苄基乙基乙烯基膦酸酯。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(2mg,0.0088mmol,7%)。(收率低的原因可在于纯

化过程中的处理步骤的产物损失)。

[0568] (2-((乙氧基(乙烯基)磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯

[0569] 

[0570] 根据一般程序E,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙烯基膦胺(201mg,1.00mmol)和(2-羟乙基)氨基甲酸叔丁酯(161mg,1.00mmol)开始制备标题化合物。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(100mg,0.358mmol,36%)。

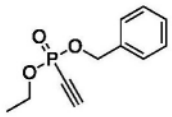
[0571] HRMS(ESI):NaC11H22NO5P[M+Na$^+$]的计算值:302.1133;实测值:302.1120。

[0572] 实施例13:合成炔烃-膦酸酯的程序

[0573] 一般程序F:经由PCl_3途径合成炔烃-膦酸酯

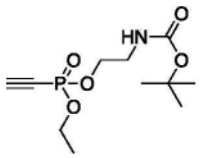
[0574] 将1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(如0.3mmol)加入圆底烧瓶中,溶解在无水乙腈(3ml)中并冷却至-40℃。单独制备醇(0.3mmol)的四唑溶液(MeCN中0.45M,0.6mmol,1.33ml),并在-40℃下将其添加至搅拌的混合物中。将反应混合物在-40℃下搅拌10分钟,然后升温至室温,再搅拌30分钟。在室温下向该混合物中添加叔丁基过氧化氢溶液(H_2O中70wt.%,0.3mmol,86μl),并搅拌10分钟。然后将反应混合物用H_2O(10ml)稀释,并用DCM(3x 30ml)萃取。将合并的有机层用Na_2SO_4干燥,过滤,并减压除去溶剂。通过硅胶色谱法纯化粗产物。

[0575] 苄基乙基乙炔基膦酸酯

[0576] 

[0577] 根据一般程序F,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(25mg,0.123mmol)和苯甲醇(12.3μl,0.123mmol)开始制备苄基乙基乙炔基膦酸酯。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(27mg,0.120mmol,49%)。

[0578] (2-((乙氧基(乙炔基)磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯

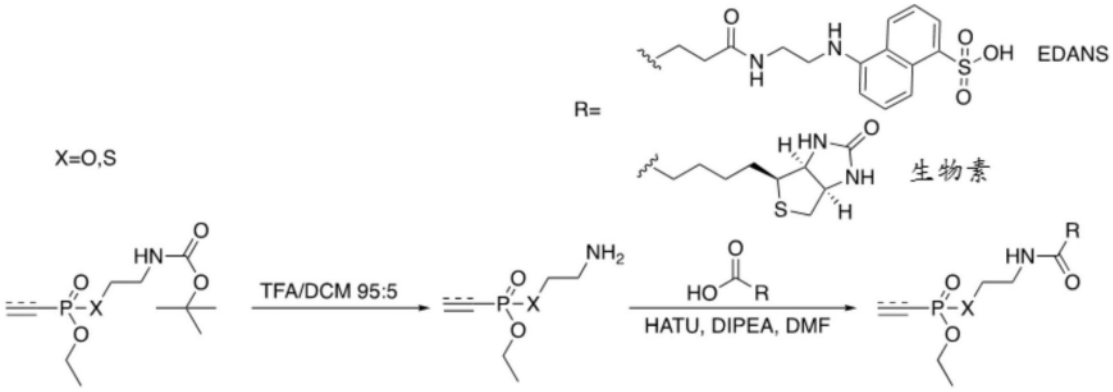
[0579] 

[0580] 根据一般程序F,从1-乙氧基-N,N-二异丙基-1-乙炔基膦胺(201mg,1.00mmol)和(2-羟乙基)氨基甲酸叔丁酯(161mg,1.00mmol)开始制备标题化合物。通过硅胶色谱法(100%乙酸乙酯)纯化,得到呈无色油的期望化合物(168mg,0.601mmol,60%)。

[0581] HRMS(ESI):C11H21NO5P[M+H$^+$]的计算值:278.1157;实测值:278.1149。

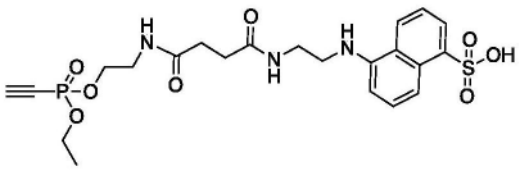
[0582] 实施例14:羧酸与烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯和膦酸酯的偶联程序

[0583] 一般程序G:通过形成酰胺键来制备功能化的硫代膦酸酯和膦酸酯

[0584] 

[0585] 将烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯(X＝S)或膦酸酯(X＝O)的Boc-保护的胺衍生物(参见上文方案)(如0.2mmol)溶解在TFA/H_2O(95:5,xx ml)的混合物中,并将所得的澄清溶液在室温下搅拌15分钟。然后通过在溶液中鼓氮来去除溶剂。将残留物再次溶解在H_2O中并冻干,得到无色油。产物无需进一步纯化即可用于下一步。向去保护的胺(例如0.05mmol)中加入HATU(0.055mmol)、羧酸(0.055mmol)和DIPEA(0.15mmol)的DMF(250μl)溶液。将得到的混合物在Eppendorf管中于室温下搅拌30分钟,然后减压浓缩。将残余物重新溶于H_2O/MeCN(9:1,5ml)中,并通过制备型HPLC纯化。

[0586] 5-((2-(4-((2-((乙氧基(乙炔基)磷酰基)氧基)乙基)氨基)-4-氧代丁酰氨基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(化合物20)

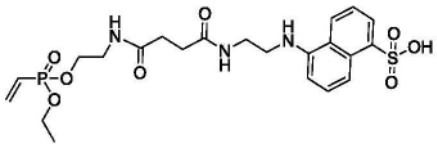
[0587] 

[0588] 根据一般程序G,由去保护的胺(14mg,0.079mmol)制备化合物20。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(18mg,0.0342mmol,43%)。

[0589] HRMS(ESI):C22H29N3O8PS[M+H^+]的计算值:526.1413;实测值:526.1387。

[0590] 图8示出了纯化的化合物20的UV-LC轨迹。

[0591] 5-((2-(4-((2-((乙氧基(乙烯基)磷酰基)氧基)乙基)氨基)-4-氧代丁酰氨基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(化合物21)

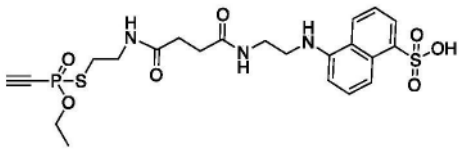
[0592] 

[0593] 根据一般程序G,由去保护的胺(12.9mg,0.072mmol)制备化合物21。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(10mg,0.0190mmol,26%)。

[0594] HRMS(ESI):C22H31N3O8PS[M+H^+]的计算值:528.1570;实测值:528.1543。

[0595] 图9示出了纯化的化合物21的UV-LC轨迹。

[0596] 5-((2-(4-((2-((乙氧基(乙炔基)磷酰基)硫代)乙基)氨基)-4-氧代丁酰氨基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(化合物22)

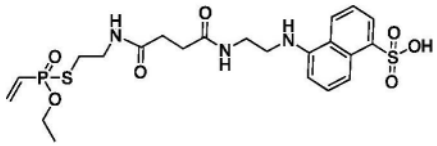
[0597] 

[0598] 根据一般程序G,由去保护的胺(11.2mg,0.058mmol)制备化合物22。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(10mg,0.0185mmol,32%)。

[0599] HRMS(ESI):C22H29N3O7PS2[M+H$^+$]的计算值:542.1184;实测值:542.1156。

[0600] 图10示出了纯化的化合物22的UV-LC轨迹。

[0601] 5-((2-(4-((2-((乙氧基(乙烯基)磷酰基)硫代)乙基)氨基)-4-氧代丁酰氨基)乙基)氨基)萘-1-磺酸(化合物23)

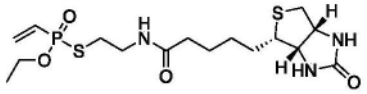
[0602] 

[0603] 根据一般程序G,由去保护的胺(9.6mg,0.049mmol)制备化合物23。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(11mg,0.0202mmol,41%)。

[0604] HRMS(ESI):C22H31N3O7PS2[M+H$^+$]的计算值:544.1341;实测值:544.1316。

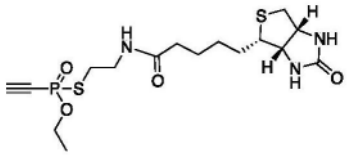
[0605] 图11示出了纯化的化合物23的UV-LC轨迹。

[0606] O-乙基S-(2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺基)乙基)乙烯基硫代膦酸酯(化合物13)

[0607] 

[0608] 根据一般程序G,由去保护的胺(14.8mg,0.076mmol)制备化合物13。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(14mg,0.033mmol,44%)。

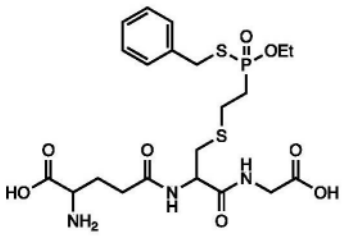
[0609] O-乙基S-(2-(5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺基)乙基)乙炔基硫代膦酸酯(化合物28)

[0610] 

[0611] 根据一般程序G,由去保护的胺(20mg,0.104mmol)制备标题化合物。通过HPLC()纯化并冻干后得到呈无色粉末的纯产物(7mg,0.0167mmol,16%)。

[0612] 实施例15A:采用谷胱甘肽的烯烃-硫代膦酸酯的氢硫醇化程序

[0613] (乙基-S-苄基-P-乙基-硫代膦酸酯)-S-谷胱甘肽偶联物(化合物14)

[0614] 

[0615] 将还原的谷胱甘肽(20.3mg,0.066mmol,2.0eq.)溶解在1.32ml的水性缓冲液(1mM

EDTA,50mM NH_4HCO_3,pH 8.0)中,然后添加至在0.33ml DMF中的S-苄基O-乙基烯烃-PT 2(8mg,0.033mmol,1.0eq.)的溶液中,然后将混合物在室温下搅拌90分钟。通过UPLC-MS监测反应(梯度:5分钟内3-60%MeCN),表明90分钟后完全转化。然后减压除去溶剂,并将残余物重新溶解在5ml H_2O中,并通过半制备HPLC(酸性条件,梯度:40分钟内20-60%MeCN,产物以35%MeCN洗脱,流速:16ml/min)纯化。冻干后得到呈白色粉末的所述的化合物14(14mg,0.026mmol,77%)。

[0616] ^1H NMR(300MHz,氧化氘)δ=7.46-7.28(m,5H),4.50(dd,J=8.4,5.3Hz,1H),4.19-3.93(m,7H),2.90(dd,J=14.1,5.3Hz,1H),2.76(ddd,J=14.1,8.4,1.9Hz,1H),2.69-2.47(m,4H),2.25-2.01(m,4H),1.26(t,J=7.1Hz,3H)ppm。

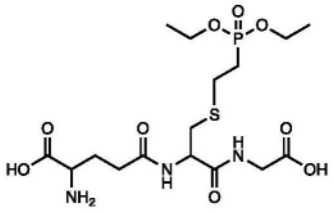
[0617] ^{13}C NMR(75MHz,氧化氘)δ=174.29,172.82,172.51,172.08,137.34,128.95,128.84,127.95,63.30,63.20,52.79,52.60,41.06,33.90,32.66,31.37,30.93,25.58,23.95,15.38(d,J=6.5Hz)ppm。

[0618] ^{31}P NMR(122MHz,氧化氘)δ60.51(d,J=1.9Hz)ppm。

[0619] HRMS(ESI):$C_{21}H_{33}N_3O_8PS[M+H^+]$的计算值:550.1441;实测值:550.1451。

[0620] 实施例15B:采用谷胱甘肽的烯烃-膦酸酯的氢硫醇化程序

[0621] (二乙基-膦酸酯)-S-谷胱甘肽偶联物

[0622] 

[0623] 将二乙基烯烃膦酸酯(20mg,0.147mmol,1.0eq.)溶解在1ml缓冲液(50mM NH_4HCO_3,1mM EDTA,pH 8.0)和1ml DMF中。向得到的溶液中加入在9ml相同缓冲液中的谷胱甘肽(90.3mg,0.294mmol,2.0eq.)溶液(溶解GSH后将pH调节至8.0),然后将混合物在室温下搅拌。当达到完全转化时(通过^{31}P-NMR判断),将反应混合物在液氮中冷冻,然后冻干。将残留物通过半制备HPLC纯化以得到呈无色粉末的标题化合物(41.6mg,0.0882mmol,60%)。

[0624] ^1H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ=8.48(t,J=5.9Hz,1H),8.38-8.25(m,4H),4.49(td,J=8.9,4.8Hz,1H),4.07-3.90(m,5H),3.76(d,J=5.8Hz,2H),2.91(dd,J=13.8,4.8Hz,1H),2.71-2.55(m,3H),2.45-2.23(m,2H),2.12-1.89(m,4H),1.23(t,J=7.0Hz,6H)ppm。

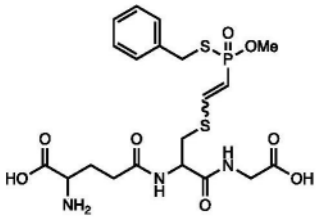
[0625] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO-d_6)δ=171.45,171.39,171.27,171.01,61.70,61.62,52.27,52.07,34.13,31.09,26.95,26.50,25.17,24.82,16.76,16.69ppm。

[0626] ^{31}P NMR(122MHz,DMSO-d_6)δ=28.58ppm。

[0627] HRMS:ESI-MS(正模式)m/z 472.1496[$(M+H)^+$;$C_{16}H_{31}N_3O_9PS^+$计算值:472.1513]。

[0628] 实施例16:采用谷胱甘肽的炔烃-硫代膦酸酯的氢硫醇化程序

[0629] (甲基-S-苄基-P-乙基-硫代膦酸酯)-S-谷胱甘肽偶联物(化合物15)

[0630] 

[0631] 向在缓冲水溶液(1mM EDTA,50mM NH_4HCO_3,pH＝8.5)中的谷胱甘肽(0.15mmol,23mg)的混合物中加入化合物7的DMF溶液(0.75mL,100mM),然后将混合物涡旋4分钟。随后将混合物冻干,将保留的残留物溶解在MeCN/H_2O中并通过HPLC(50分钟内5-45％MeCN)纯化。冷冻干燥含产物的级分,得到呈无色粉末的标题化合物15(16.4mg,约33％)。

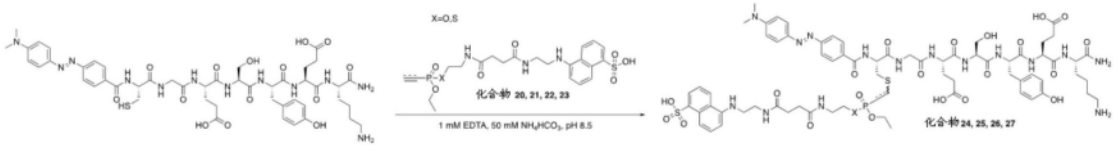
[0632] 1H-NMR(600MHz,DMSO-d^6)δ＝8.47-8.45(1H,m),8.39-8.37(1H,m),7.62-7.51(1H,ddd,J＝49.9Hz,J＝12.3Hz,J＝4.8Hz),7.37-7.25(5H,m),5.83-5.78(1H,ddd,J＝21.3Hz,J＝12.2Hz,J＝6.4Hz),4.56-4.54(1H,m),4.01-3.91(3H,m),3.78-3.77(2H,m),3.77-3.53(3H,m),3.22-3.19(1H,m),2.96-2.92(1H,m),2.38-2.31(2H,m),2.07-1.98(2H,m)ppm。

[0633] ^{13}C-NMR(151MHz,DMSO-d^6)δ＝171.07,170.87,170.75,170.02,137.80,137.76,128.87,128.50,127.32,118.07,116.09,113.62,112.63,52.89,51.63,51.20,51.17,51.13,40.77,36.81,33.37,30.66,30.62,25.88ppm。

[0634] ^{31}P-NMR(122MHz,DMSO-d^6)δ＝41.6ppm。

[0635] 实施例17:合成用于稳定性研究的Dabcyl-EDANS淬灭剂对的程序

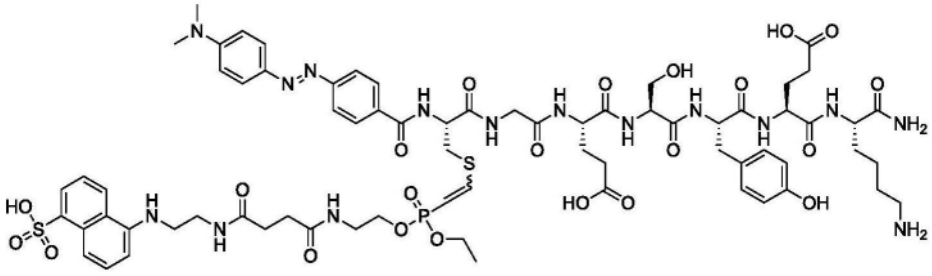
[0636] 用于合成Dabcyl-EDANS淬灭剂对的一般程序H

[0637] 

[0638] 在标准固相肽合成条件下(Fmoc策略)由Rink-amide树脂合成含DABCYL的肽。采用HATU作为偶联剂,将Dabcyl(作为羧酸)偶联至树脂上的游离N-端。采用TFA/TIS/H_2O/DTT＝95/2/2/1混合物将该肽自树脂上裂解下来。通过半制备HPLC纯化该肽。

[0639] 将纯化的Dabcyl肽(如2.35μmol)溶解在水性缓冲液(50mM NH_4HCO_3,1mM EDTA,pH 8.5)中并与溶解在DMF(280μl)中的EDANS化合物20-23(2.82μmol)在Eppendorf管中混合。将反应混合物在室温下搅拌,并通过UV-LC-MS监测反应。然后先将反应混合物用水(4.7ml)稀释,并通过半制备HPLC纯化(45分钟内10-50％MeCN,0.1％TFA,流速:16ml/min),然后将含有纯产物的级分合并并冻干。

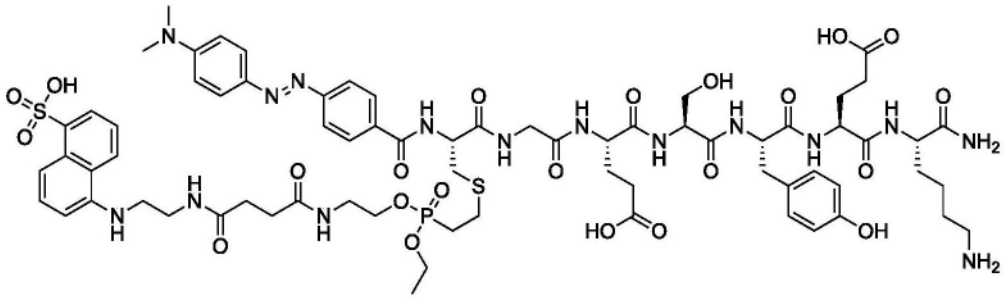
[0640] EDANS-Dabcyl FRET对(炔烃膦酸酯衍生物)(化合物24)

[0641] 

[0642] 根据一般程序H,由Edans化合物20(1.48mg,2.82μmol)和Dabcyl肽(2.5mg,2.35μmol)获得化合物24。通过半制备HPLC(10-50％MeCN,0.1％TFA,16ml/min)纯化并冻干后获得呈红色粉末的产物(3mg,2.01μmol,86％)。

[0643] 图12示出了纯化的化合物24的UV LC轨迹。

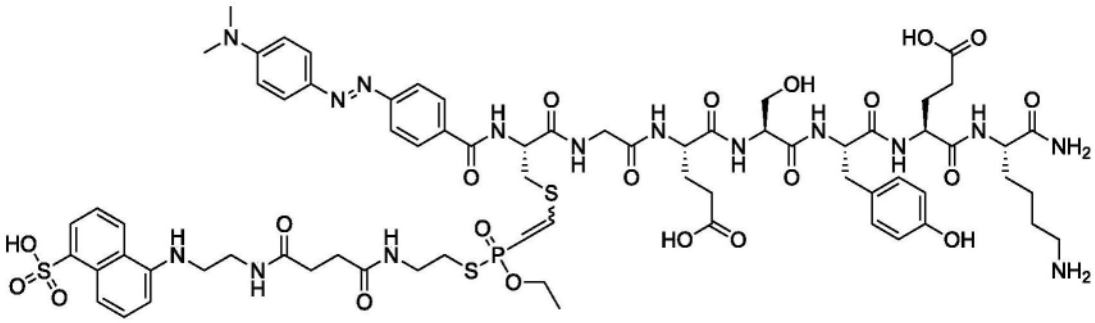
[0644] EDANS-Dabcyl FRET对(烯烃膦酸酯衍生物)(化合物25)

[0645] 

[0646] 根据一般程序H,由Edans化合物21(1.49mg,2.82μmol)和Dabcyl肽(2.5mg,2.35μmol)获得化合物25。通过半制备HPLC(10-50％MeCN,0.1％TFA,16ml/min)纯化并冻干后获得呈红色粉末的产物(3mg,2.01μmol,86％)。

[0647] 图13示出了纯化的化合物25的UV LC轨迹。

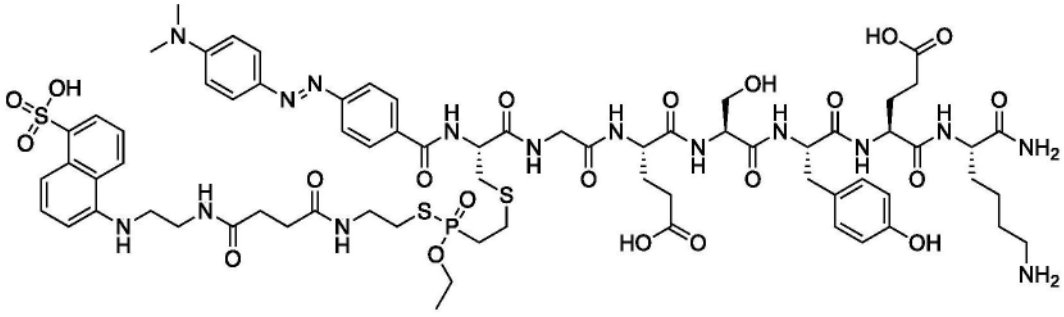
[0648] EDANS-Dabcyl FRET对(炔烃硫代膦酸酯衍生物)(化合物26)

[0649] 

[0650] 根据一般程序H,由Edans化合物22(1.53mg,2.82μmol)和Dabcyl肽(2.5mg,2.35μmol)获得化合物26。通过半制备HPLC(10-50％MeCN,0.1％TFA,16ml/min)纯化并冻干后获得呈红色粉末的产物(3mg,1.87μmol,80％)。

[0651] 图14示出了纯化的化合物26的UV LC轨迹。

[0652] EDANS-Dabcyl FRET对(烯烃硫代膦酸酯衍生物)(化合物27)

[0653] 

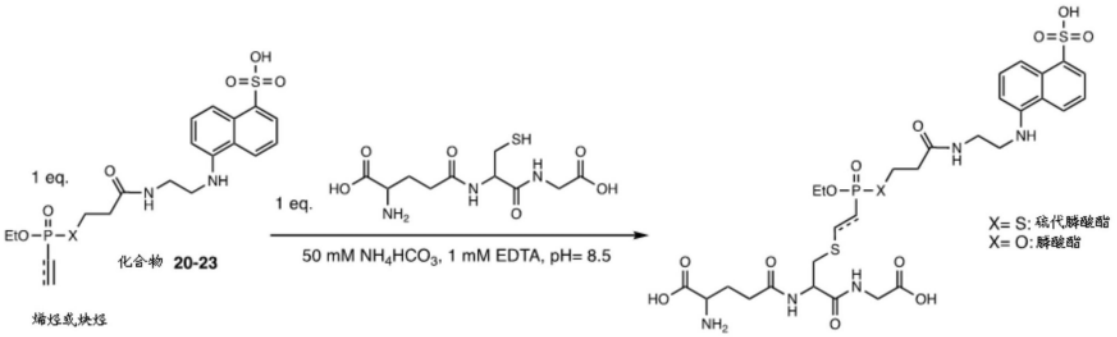
[0654] 根据一般程序H,由Edans化合物23(1.53mg,2.82μmol)和Dabcyl肽(2.5mg,2.35μmol)获得化合物27。通过半制备HPLC(10-50％MeCN,0.1％TFA,16ml/min)纯化并冻干后获得呈红色粉末的产物(3mg,1.87μmol,80％)。

[0655] 图15示出了纯化的化合物27的UV LC轨迹。

[0656] 实施例18:用于实施例6的稳定性研究的程序

[0657] 分别制备0.20mM的EDANS-DABCYL偶联物24-27的储备溶液(PBS pH 7.4)。自该储备溶液中取5μl与95μl的相应基质(PBS pH 7.4,新鲜制备的HeLa细胞裂解物(1mg/ml),人血清)混合,以在室温下(约25℃)于96孔板(Corning,N°3615)中进行测试。对于NaOH中的实验,在室温(约25℃)下,将这些化合物(150μL的200μM PBS储备溶液)与150μL的1M NaOH溶液在Eppendorf管中混合。在给定的时间点,将3μl的该溶液与5.6μl的1M HCl溶液和91μl PBS混合用于96孔板中的中和。采用Safire/Tecan仪器(EDANS:λex=360nm,λem=508nm)在3天的过程中(对于除NaOH外的所有条件)监测荧光。通过背景测量(仅基质)校正荧光强度,并计算三个独立实验的平均值和标准偏差(n=3)。

[0658] 实施例19:用于实施例5的动力学研究的程序

[0659] 

[0660] 将2.5μl的相应磷化合物20-23的20mM DMF溶液和5μl的未偶联的EDANS的1mM DMF/缓冲液(1:1)溶液(作为内标)添加到488μl偶联缓冲液(50mM NH_4HCO_3和1mM EDTA的超纯水溶液,用氨水溶液调节至pH 8.5)中。加入5μl的10mM谷胱甘肽缓冲液溶液以开始反应。反应在室温(约25℃)下进行。在添加谷胱甘肽之前抽取第一个样品(t=0)。在15、30、60、120、240和480分钟后采集随后的样品。以20μl的体积抽取样品,然后立即将其稀释到80μl的pH为3.5的50mM NaOAc缓冲液中以终止反应。使用荧光检测器对这些样品进行HPLC分析,每次进样20μl。(此研究的结果示于图3)。

[0661] 实施例20A:BSA与硫代膦酸酯偶联的程序

[0662] 将在缓冲液(PBS,1mM EDTA,pH 7.4或50mM NH_4HCO_3,100mM NaCl,1mM EDTA,pH 8.5)中的10μM牛血清白蛋白(BSA)溶液(100μl)与1μl的100mM(对应于100eq.)或1μl的化合物2或7的溶液(DMF中50mM)于4℃下混合。将反应混合物在4℃下搅拌18h。然后通过旋转过滤(7kDa MWCO)除去过量的化合物,由此将缓冲液变为pH 7.4的PBS。将3μl该种蛋白质的PBS溶液(10μM)与27μl的含巯基乙醇的Laemmli缓冲液混合,在95℃下加热10分钟,并在SDS-Gel(12%丙烯酰胺,250V,40分钟)上运行。然后用胰凝乳蛋白酶对该蛋白进行胶内(in-gel)消化,并通过MS/MS进行分析(MS/MS分析的结果汇总在表6中。)

[0663] 实施例20B:BSA与膦酸酯偶联的程序

[0664] 将在缓冲液(50mM NH_4HCO_3,100mM NaCl,1mM EDTA,pH 8.5)中的10μM牛血清白蛋白(BSA)溶液(100μl)与1μl的在DMF中的二乙基烯烃膦酸酯的100mM溶液于4℃下混合。将反应混合物在4℃下搅拌18h。然后通过旋转过滤(7kDa MWCO)除去过量的膦酸酯化合物,由此将缓冲液变为pH 7.4的PBS。之后将3μl该种蛋白质的PBS溶液(10μM)与27μl的含巯基乙醇的Laemmli缓冲液混合,在95℃下加热10分钟,并在SDS-Gel(12%丙烯酰胺,250V,40分钟)

上运行。然后用胰凝乳蛋白酶对该蛋白进行胶内(in-gel)消化,并通过MS/MS进行分析(MS/MS分析的结果汇总在表1中。)

[0665] 实施例20:抗体与硫代膦酸酯偶联的程序

[0666] 将1.25μl的100μM本妥昔单抗抗体溶液(在PBS中)与10μl含硼酸盐的PBS(50mM硼酸盐,pH 8.0)和1.25μl的DTT溶液(在相同硼酸盐缓冲液中的100mM DTT,pH 8.0)混合。类似地制备对照样品,其中不添加DTT。将这些混合物在恒温振荡器中于37℃下温育30分钟。然后采用尺寸排阻色谱柱移除过量的DTT(Thermo Scientific,Zeba™ Micro Spin脱盐柱,7K MWCO,产品N°89877)。首先用烷基化缓冲液(50mM NH_4HCO_3,1mM EDTA,pH=8.5/8.0或PBS,1mM EDTA,pH 7.4)平衡所述尺寸排阻色谱柱(在1000g下3x 50μl达1min)。然后将抗体-DTT混合物(12.5μl)加载至平衡的色谱柱上并通过离心(2min,1000g)的方式将抗体收集到新的Eppendorf管中。立即向该溶液中加入0.25μl生物素-PT(烯烃或炔基硫代膦酸酯)溶液(在DMSO中25mM),并将混合物在4℃的恒温振荡器中温育过夜。

[0667] 将3μl该种混合物与27μl的含巯基乙醇的Laemmli缓冲液混合,在95℃下加热10分钟。然后取10μl加载至12%丙烯酰胺SDS-Gel上,并在250V下运行35分钟。然后使用可商购的链霉亲和素-HRP偶联物对凝胶进行Western印迹,以与生物素修饰的抗体杂交并通过化学发光法间接检测生物素。

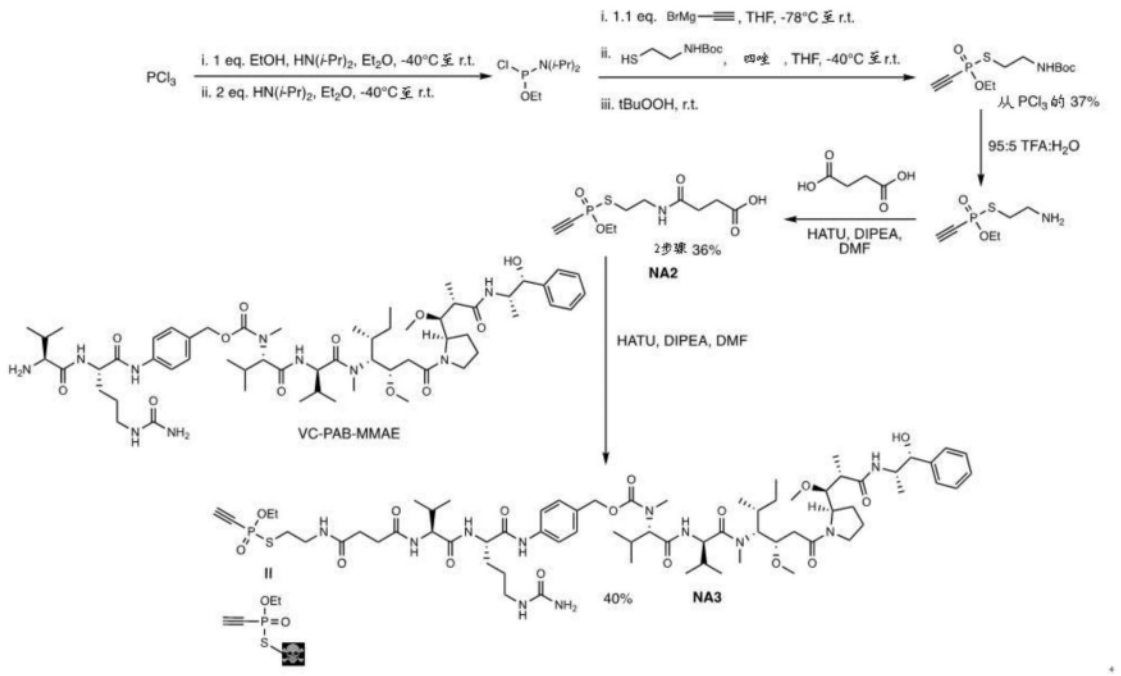
[0668] 实施例21:采用炔烃硫代膦酸酯的eGFP的修饰

[0669] 在原理证明实验中,本发明人采用了携带一个溶剂可接近的半胱氨酸的eGFP变体,并在生理pH下使它与小分子荧光炔烃硫代膦酸酯NA1(对应于以上实施例14的化合物22)反应(图16A)。通过ESI-MS监控反应,并且当在14小时后检查时,观察到完全转化,没有任何可检测到的副产物形成(图16B)。这一结果证明炔烃硫代膦酸酯适合用于在生理pH的温和条件下修饰蛋白质。

[0670] 图16示出了:用炔烃硫代膦酸酯-Edans衍生物NA1修饰eGFP。A)合成方案,B)通过ESI-MS观察到GFP完全转化为期望的产物。本文示出的光谱来自于未经任何纯化的反应混合物。PT=硫代膦酸酯NA1。

[0671] 实施例22:具有炔烃硫代膦酸酯的抗体药物偶联物(ADC)的合成

[0672] 本发明人还开发了由非常有效的抗有丝分裂的、微管蛋白结合细胞毒素一甲基澳瑞他汀E(MMAE)和针对CD30的(CD30-adressing)抗体本妥昔单抗合成硫代膦酸酯连接的抗体药物偶联物(ADC)的方法。为了促进毒性载荷的释放,在抗体和毒素之间制备了具有组织蛋白酶B裂解侧(缬氨酸-瓜氨酸连接子VC)的ADC,从而产生了市售ADC Adcetris® (Brentuximab vedotin)(M.A.Stephen,Blood 2014,124,3197-3200)的直接类似物。如方案12所描绘,通过胺偶联由炔烃硫代膦酸酯羧酸NA2和VC-PAB-MMAE合成了硫代膦酸酯-VC-PAB-MMAE构建体NA3。

[0673] 

[0674] 方案12:构建硫代膦酸酯连接的、组织蛋白酶B可裂解的一甲基澳瑞他汀E偶联物NA3的合成途径。VC:缬氨酸-瓜氨酸二肽,PAB:p-氨基苄基。

[0675] 然后,通过将NA3偶联至本妥昔单抗来合成抗体药物偶联物。为了使包含硫代膦酸酯连接的ADC的ADC的活性能够与FDA-批准的ADC Adcetris®相比较,本发明人首先进行筛选以发现产生具有药物与抗体比(DAR)为3-4的ADC。在Adcetris的情况中,VC-PAB-MMAE通过马来酰亚胺偶联至本妥昔单抗的半胱氨酸,其DAR=4(M.A.Stephen,Blood 2014,124,3197-3200.)。本发明人首先用DTT还原了本妥昔单抗的链间-二硫键,以产生游离的巯基,然后其可以与炔烃硫代膦酸酯NA3反应(参见图17A)。通过Zeba™ Spin脱盐柱移除过量的DTT。对于筛选,本发明人改变了本妥昔单抗抗体的浓度(1vs.5mg/ml)、偶联中的pH(pH 8.5vs.7.4)以及硫代膦酸酯-药物化合物NA3的当量数(8.8-100eq.),并在用酶PNGase-F去糖基化和还原后,通过ESI-MS分析了得到的ADC。用具有不同修饰度的重链和轻链种类(species)的质量信号强度估算了DAR。该筛选的结果如图17B所示。更高的抗体浓度和更多当量的硫代膦酸酯生成更高的DAR。与炔烃硫代膦酸酯的偶联在生理pH 7.4下同样高效。这是炔烃硫代膦酸酯用于偶联蛋白质或抗体的优势,因为出于如稳定性原因的考虑,所述蛋白质或抗体需要在生理pH下处理。

[0676] 图17示出了:采用NA3(硫代膦酸酯-VC-PAB-MMAE)修饰本妥昔单抗。A)反应方案,链间二硫化物的还原和烷基化。B)反应条件的筛选。C)用PNGase-F去糖基化并用DTT还原后的抗体片段的示例性MS光谱。显示的是去卷积谱图,插入图显示了原始数据。LC:轻链;HC:重链;mod:硫代膦酸酯-VC-PAB-MMAE NA3。

[0677] 本发明人通过尺寸排阻色谱法(SEC)进一步表征了ADC,其DAR=3.15(参见图21)。然后在其中采用了过表达CD30的细胞系Karpas 299的标准刃天青(resazurin)测定中评估该ADC(参见图18A)。本妥昔单抗(Brentuximab)-NA3 ADC表现出强的生长抑制作用(蓝色曲线),并且其以稍微较低的DAR(3.15vs.Adcetris®的4.0)具有与临床使用的ADC Adcetris®(红色曲线)一样的效果。单独的本妥昔单抗(绿色曲线)没有显示出生长抑制作

用。作为证明CD30选择性的对照,使用了未过表达CD30的细胞系HL 60(图18B)。在这种情况下,所有构建体均未观察到细胞增殖的抑制。综上所述,这些结果证明炔烃硫代膦酸酯是合适的产生选择性杀伤抗原阳性细胞系的活性ADC的连接子。

[0678] 图18示出了:A)MMAE连接的本妥昔单抗ADC选择性地对过表达CD30的细胞系Karpas 299的增强生长抑制。该图描绘了处理96小时后基于抗体浓度的细胞存活率。单独的本妥昔单抗(绿色),本妥昔单抗-NA3(蓝色)和Adcetris®(红色)。Karpas 299:过表达CD30的细胞系。B)对照。单独的本妥昔单抗(绿色),本妥昔单抗-NA3(蓝色)和Adcetris®(红色)。HL 60:具有低CD30表达水平的细胞系。

[0679] 与马来酰亚胺-硫醇偶联物相比,硫代膦酸酯-硫醇偶联物更稳定,特别是在存在过量的游离硫醇的情况下。特别地对于其中由于硫醇交换而导致的毒素过早释放从而导致脱靶毒性增加的ADC,本文所述方法和化合物具有这一重要优势。

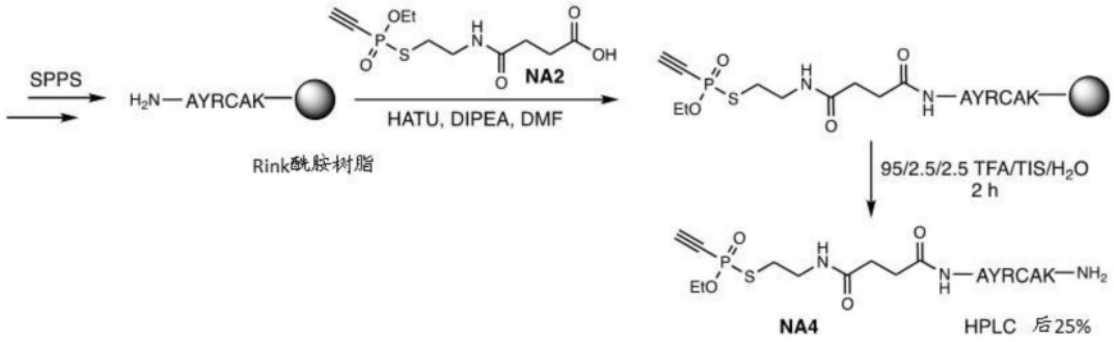
[0680] 作为另一个优势,本发明人已经观察到在抗体的修饰中,当在生理pH下采用相同当量数时,硫代膦酸酯比马来酰亚胺具有更好的半胱氨酸选择性,也参见上文的实施例7B。

[0681] 实施例23:在树脂上的肽上引入硫代膦酸酯

[0682] 本发明人已经观察到本文所述的硫代膦酸酯在酸性条件下是高度稳定的。因此,经由在树脂上的固相肽合成(SPPS)将硫代膦酸酯引入肽中。这允许在SPPS期间以直接方式将亲电体引入肽中,然后在酸性条件下从树脂上裂解下来。

[0683] 通过游离的N-端将模型肽与羧酸NA2偶联。在用95%TFA裂解2小时后,可以通过半制备HPLC分离产物。因此,该方法允许在SPPS期间在树脂上引入亲电体。作为优点,在从树脂上裂解的过程中的强酸性条件下,硫代膦酸酯未水解。因此,硫代膦酸酯在酸性条件下(例如在从树脂上裂解过程的>90%的三氟乙酸(TFA)下)是高度稳定的。

[0684] 通过UV-LC-MS和^{31}P-NMR分析炔烃硫代膦酸酯-肽。值得注意的是,该肽以如方案13所示的线性形式存在,并且未通过经由半胱氨酸残基的分子内硫醇加成而环化。

[0685] 

[0686] 方案13:采用炔烃硫代膦酸酯的固相肽合成。

[0687] 实施例24:采用炔烃硫代膦酸酯NA1修饰eGFP的程序

[0688] 该实验采用eGFP突变体(eGFP C70MS174C)。该蛋白已被表达为具有蛋白酶裂解位点的His-tagged变体。裂解后,完整序列为:

[0689] RGSHMGSIQMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQMFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNCHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

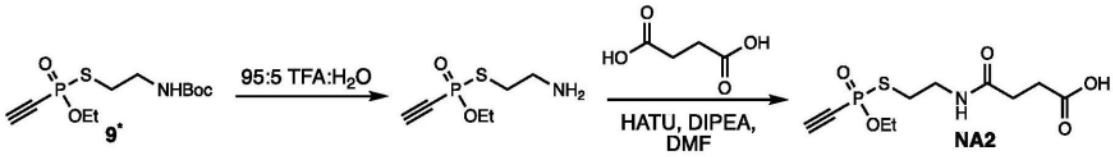
[0690] 图19示出了:用作与NA1偶联的原材料的eGFP C70MS174C的ESI-MS谱图。

[0691] 采用NA1修饰eGFP的程序

[0692] 向在低结合Eppendorf管中的eGFP PBS(pH 7.4)溶液(50μl,1mg/ml)中加入炔烃硫代膦酸酯NA1(0.72μl的25mM DMSO储备溶液,10eq.)并将混合物在14℃和800rpm的恒温振荡器上保持14小时。通过ESI-MS判断实现了全部转化。

[0693] 实施例25:采用炔烃-硫代膦酸酯产生抗体药物偶联物(ADC)的程序

[0694] 4-((2-((乙氧基(乙炔基)磷酰基)硫代)乙基)氨基)-4-氧代丁酸(化合物NA2)的合成

[0695] 

[0696] *原始申请中化合物编号

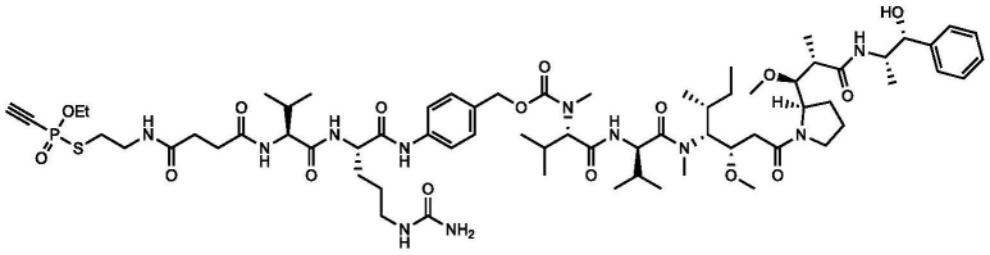
[0697] 由Boc保护的前体(上述实施例11中所述的9号化合物)分两步生成化合物NA2。将9(94mg,0.321mmol)溶于圆底烧瓶中的TFA/H_2O 95:5(3ml)中,并在室温搅拌5分钟。然后将反应混合物用H_2O(10ml)稀释并冷冻干燥。将干燥的粗产物溶解在DMF(1ml)中,并添加至在DMF(1ml)中的琥珀酸(38mg,0.321mmol)、HATU(122mg,0.321)和DIPEA(167ml,0.962mmol)的混合物中。将得到的混合物在室温下搅拌30分钟。然后减压除去溶剂,并将残余物溶解在含有0.1%TFA的MeCN/H_2O(1:4)的混合物中,通过半制备HPLC(在60分钟内20-60%MeCN,流速=10ml/min)纯化。冷冻干燥含产物的级分,得到基于^{1}H-NMR的纯度约为90%的呈冻干粉末的化合物NA2(34mg,0.116mmol,36%)。该化合物无需进一步纯化即可用于随后的反应。

[0698] $C_{10}H_{17}NO_5PS^{1+}$[M+1H]$^{1+}$的HR-MS计算值:294.0560,实测值294.0614。

[0699] ^{1}H-NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ_H=7.22-7.13(m,1H),4.25(dq,J=9.8,7.1Hz,2H),3.76-3.74(m,2H),3.29(d,J=12.6Hz,1H),3.25-2.98(m,2H),2.72-2.51(m,4H),1.50-1.36(m,3H)ppm。

[0700] ^{31}P-NMR(122MHz,$CDCl_3$)δ_P=17.1ppm。

[0701] 炔烃-硫代膦酸酯-Val-Cit-Pab-MMAE(化合物NA3)的合成

[0702] 

[0703] 将化合物NA2(1.88mg,6.41mmol)、HATU(2.44mg,6.41mmol)和DIPEA(4.7ml,26.7mmol)溶解在DMF(100ml)中,并将其添加至置于Eppendorf管中的H_2N-Val-Cit-Pab-MMAE(6mg,5.34mmol)DMF(150ml)溶液中。30分钟后,将反应混合物用H_2O(4.5ml)稀释,过滤并通过半制备HPLC(在50分钟内30-99%MeCN,流速=5ml/min)纯化。冻干后,获得呈白色粉末的所述的产物NA3(3mg,2.14mmol,40%)。

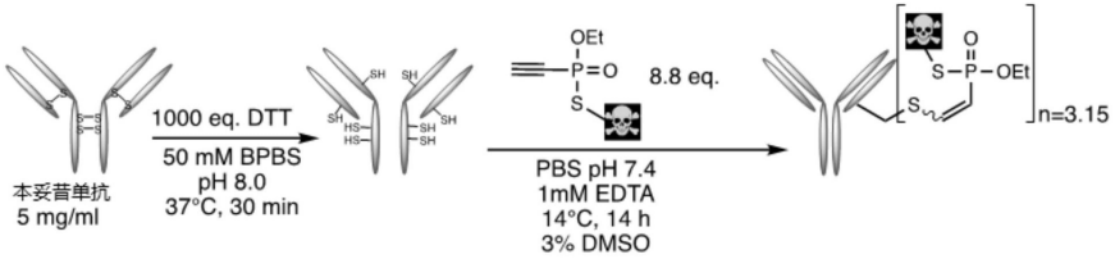
[0704] $C_{68}H_{109}N_{11}O_{16}PS^{1+}$[M+1H]$^{1+}$的HR-MS计算值:1398.7507,实测值1398.7201。

[0705] 图20示出了硫代膦酸酯-Val-Cit-Pab-MMAE NA3的UPLC-UV纯度。

[0706] 本妥昔单抗生产

[0707] 按照先前公布的(A.Stengl,D.Hörl,H.Leonhardt,J.Helma,SLAS Discov 2017,22,309-315.),以及另外的最终纯化进行本妥昔单抗的表达和纯化,所述另外的最终纯化通过在来自GE(GE life sciences,USA)的Superdex 200 Increase 10/300上采用PBS和0.75ml/min的流速的凝胶过滤进行。

[0708] 通过还原/烷基化规程修饰本妥昔单抗的程序

[0709] 

[0710] 在低结合Eppendorf中,通过将本妥昔单抗(c=5mg/ml,33.4mM)在总体积为300μl的含50mM硼酸钠和PBS(pH 8.0)中的34mM DTT的缓冲液中于37℃下温育30min来进行本妥昔单抗修饰。随后,采用具有7K MWCO的2mL Zeba™ Spin脱盐柱(Thermo Fisher Scientific,Waltham,United States)进行过量DTT移除并将缓冲液交换为含1mM EDTA的PBS(pH 7.4)。然后,快速添加2.45μl含36mM硫代膦酸酯NA3的DMSO溶液,并将该混合物在800rpm和14℃下振摇16小时。通过尺寸排阻色谱法(Äkta FPLC,Superose 6 Increase 10/300GL色谱柱,采用PBS,0.8ml/min)除去过量的硫代膦酸酯。将含有产物的级分合并并无菌过滤。为了分析ADC,在恒温振荡器上于60℃下采用1μl的RapiGest温育12μl的1mg/ml溶液30分钟。然后加入1μl的PNGaseF,并在37℃下再温育2小时。最后,加入1μl DTT的PBS(pH 7.4)中的10mM溶液,并将混合物在37℃下振荡30分钟。将该混合物的10μl用30μl H_2O稀释,然后进行ESI-MS(结果参见图2C)。

[0711] ADC的SEC

[0712] 在具有DAD检测器、Split Sampler FT(4℃)、柱室(Column Compartment)H(25℃)和二元泵(binary pump)F(Thermo Fisher Scientific,USA)的Vanquish Flex UHPLC系统上,采用MAbPac SEC-1 300 Å,4 x 300mm色谱柱(Thermo Fisher Scientific,USA)以0.15mL/min的流速进行分析尺寸排阻色谱(A-SEC)。使用pH为7的磷酸盐缓冲液(20mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4,300mM NaCl),以5%v/v异丙醇作为流动相在30分钟的等度梯度过程中实现了不同ADC/mAb群的分离。将8μg ADC/mAb加载至色谱柱以进行A-SEC分析。在220和280nm处记录UV色谱图。对220nm处的峰面积积分后,实现对单体和HMWS的定量。

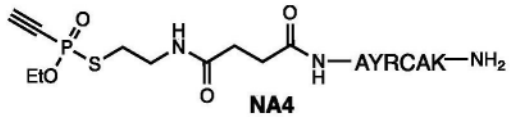
[0713] 图21示出了本妥昔单抗-NA3 ADC的尺寸排阻色谱图。

[0714] 基于细胞的抗增殖测定

[0715] 在补充有10%FCS和0.5%青霉素-链霉素的RPMI-1640中培养HL60和Karpas细胞系。在补充有10%FCS和0.5%青霉素-链霉素的DMEM/F12中培养SKBR3和MDAMB468细胞系。以$5*10^3$个细胞/孔(SKBR3、HL60和Karpas)或$1*10^3$个细胞/孔(MDAMB468)的密度将细胞接种在96孔细胞培养微孔板中。在细胞培养基中以3μg/mL的终浓度开始,进行ADC或抗体的1:4系列稀释,然后一式两份转移到微孔板上的各个孔中。在37℃、5%CO_2下将板温育96h。随

后,加入刃天青至终浓度为50μM,然后在37℃、5%CO_2下温育3-4小时。通过在Tecan Infinite M1000微孔板读数器上试卤灵(resorufin)的荧光信号(λ_{EX}=560nm和λ_{EM}=590nm)来定量测定刃天青向试卤灵的代谢转化。通过一式两份的结果计算平均值和标准偏差,针对未处理的对照对其进行标准化,并针对抗体浓度作图。使用MatLab R2016软件进行数据分析。

[0716] 实施例26:在树脂上的肽上引入硫代膦酸酯的程序

[0717] 

NA4

[0718] 在具有0.22g/mol加载的TentaGel S Rink酰胺树脂上人工合成具有序列AYRCAK的肽。采用5eq.氨基酸、5eq.HCTU、5eq.Oxyma和10eq.DIPEA在DMF中偶联1h(浓度:基于5eq.氨基酸,0.1M)。每次偶联后,采用Ac2O对残留的游离胺基团进行封端。用20%哌啶的DMF溶液进行Fmoc-脱保护。

[0719] 将对应于10μM的具有游离N-端的AYRCAK肽的树脂量用于采用硫代膦酸酯构建模块的进一步修饰。因此,在肽反应器中,将肽在DMF(1ml)中溶胀(swollen)2小时,然后加入化合物NA2(120μl的250mM储备溶液DMF,30μmol,3eq.)、HATU(11.4mg,30μmol,3eq.)和DIPEA(10.4μl,60μmol,6eq.)的混合物。将混合物于室温下振荡1小时。采用TFA/H_2O/TIS(95:2.5:2.5;v:v:v,2ml)进行自树脂上的裂解达2小时。在冷的无水醚中进行沉淀。通过制备型反相C18 HPLC(10-60%MeCN H_2O溶液+0.1%TFA,流速:10ml/min)纯化粗品。冻干后,获得呈白色粉末的产物NA4(2.44mg,2.48μmol,25%),并通过^{31}P-NMR、分析型UPLC(在RP-C18色谱柱上,于15min内含0.1%TFA的H_2O中5%至95%MeCN)和ESI-MS分析该产物NA4。

[0720] $C_{40}H_{66}N_{12}O_{11}PS_2^{1+}$[M+1H]$^{1+}$的HR-MS计算值:985.4148,实测值:985.4152。

[0721] ^{31}P-NMR(243MHz,DMSO-d_6)δ_P=14.6(d,J=6.5Hz)ppm。

[0722] 图22示出了硫代膦酸酯肽NA4的UPLC-UV纯度。

[0723] 结论

[0724] 本发明人在本文中证明了,不饱和的硫代膦酸酯和膦酸酯(烯烃-和炔烃-硫代膦酸酯以及烯烃-和炔烃-膦酸酯)是用于半胱氨酸选择性生物偶联反应的合适处理剂。在水性条件下硫醇加成是快速的,并且形成的偶联物在生理相关条件下是稳定的。本发明人表明,该方法允许,例如蛋白质(例如BSA)和抗体(例如西妥昔单抗、本妥昔单抗)的半胱氨酸选择性修饰。本文提供的结果表明,由于本发明的反应对硫醇更具选择性并且形成的偶联物表现出更好的稳定性,因此根据本发明的使用硫代膦酸酯或膦酸酯的方法优于当前的半胱氨酸生物偶联策略(例如马来酰亚胺化学)。

[0725] ***

[0726] 必须注意,如本文所用,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一个/种”和“该/所述”包括复数个提及物。因此,例如,对“一种试剂”的提及包括此类不同试剂中的一者或多者,且对“该方法”的提及包括本领域的普通技术人员已知的可针对本文所述的方法进行修改或代替的等效步骤和方法的提及。

[0727] 本文引用的全部出版物和专利均以其全文并入本文。就通过引入并入的材料与本说明书矛盾或不一致来说,本说明书将优先于任何这样的材料。

[0728] 除非另外指示,否则在一系列要素之前的术语“至少”应理解为指该系列中的每一要素。本领域的技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就能确定本文所述的本发明的特定实施方案的许多等效形式。本发明旨在涵盖此类等效形式。

[0729] 在本说明书通篇和随后的权利要求中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”和诸如“包括(comprises)”和“含有(comprising)”的变化形式应理解为暗示包括所述整数或步骤或整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤的组。在本文中使用时,术语“包含”可被术语“含有”或“包括”代替,或有时在本文中使用时,被术语“具有”代替。

[0730] 当在本文中使用时,“由.....组成”排除所主张要素中未规定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由.....组成”不排除并不实质性影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。在本文中的各种情况下,术语“包含”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”中的任一者可用其他两个术语中的任一者替换。

[0731] 本说明书的全文中引用了若干文件。本文引用的每一个文件(包括所有的专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指导书等),无论在前还是在后,均以其全文并入本文。本文无任何内容将被解释为承认由于在先发明,本发明无权早于这样的公开内容。

[0001] 序列表

[0002] <110> 柏林合作研究学会

[0003] 路德维希-马克西米利安慕尼黑大学

[0004] <120> 与烯烃-或炔烃-硫代膦酸酯和-膦酸酯的化学选择性巯基偶联

[0005] <130> LC20310005P

[0006] <150> EP 18160384.6

[0007] <151> 2018-03-07

[0008] <160> 26

[0009] <170> PatentIn version 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 15

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 人工

[0014] <220>

[0015] <223> AviTag

[0016] <400> 1

[0017] Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu

[0018] 1 5 10 15

[0019] <210> 2

[0020] <211> 26

[0021] <212> PRT

[0022] <213> 人工

[0023] <220>

[0024] <223> 钙调蛋白-标签

[0025] <400> 2

[0026] Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg

[0027] 1 5 10 15

[0028] Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu

[0029] 20 25

[0030] <210> 3

[0031] <211> 6

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工

[0034] <220>

[0035] <223> 聚谷氨酸标签

[0036] <400> 3

[0037] Glu Glu Glu Glu Glu Glu

[0038] 1 5

[0039] <210> 4

[0040] <211> 13

[0041] <212> PRT

[0042] <213> 人工

[0043] <220>

[0044] <223> E-标签

[0045] <400> 4

[0046] Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg

[0047] 1 5 10

[0048] <210> 5

[0049] <211> 8

[0050] <212> PRT

[0051] <213> 人工

[0052] <220>

[0053] <223> FLAG-标签

[0054] <400> 5

[0055] Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

[0056] 1 5

[0057] <210> 6

[0058] <211> 9

[0059] <212> PRT

[0060] <213> 人工

[0061] <220>

[0062] <223> HA-标签

[0063] <400> 6

[0064] Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

[0065] 1 5

[0066] <210> 7

[0067] <211> 6

[0068] <212> PRT

[0069] <213> 人工

[0070] <220>

[0071] <223> His-标签

[0072] <400> 7

[0073] His His His His His His

[0074] 1 5

[0075] <210> 8

[0076] <211> 10

[0077] <212> PRT

[0078] <213> 人工

[0079] <220>

[0080] <223> Myc-标签

[0081] <400> 8

[0082] Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

[0083] 1 5 10

[0084] <210> 9

[0085] <211> 18

[0086] <212> PRT

[0087] <213> 人工

[0088] <220>

[0089] <223> NE-标签

[0090] <400> 9

[0091] Thr Lys Glu Asn Pro Arg Ser Asn Gln Glu Glu Ser Tyr Asp Asp Asn

[0092] 1 5 10 15

[0093] Glu Ser

[0094] <210> 10

[0095] <211> 15

[0096] <212> PRT

[0097] <213> 人工

[0098] <220>

[0099] <223> S-标签

[0100] <400> 10

[0101] Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser

[0102] 1 5 10 15

[0103] <210> 11

[0104] <211> 38

[0105] <212> PRT

[0106] <213> 人工

[0107] <220>

[0108] <223> SBP-标签

[0109] <400> 11

[0110] Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly

[0111] 1 5 10 15

[0112] Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro

[0113] 20 25 30

[0114] Gln Gly Gln Arg Glu Pro

[0115] 35

[0116] <210> 12

[0117] <211> 13

[0118] <212> PRT

[0119] <213> 人工

[0120] <220>

[0121] <223> Softag 1

[0122] <400> 12

[0123] Ser Leu Ala Glu Leu Leu Asn Ala Gly Leu Gly Gly Ser

[0124] 1 5 10

[0125] <210> 13

[0126] <211> 8

[0127] <212> PRT

[0128] <213> 人工

[0129] <220>

[0130] <223> Softag 3

[0131] <400> 13

[0132] Thr Gln Asp Pro Ser Arg Val Gly

[0133] 1 5

[0134] <210> 14

[0135] <211> 8

[0136] <212> PRT

[0137] <213> 人工

[0138] <220>

[0139] <223> Strep-tag II

[0140] <400> 14

[0141] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

[0142] 1 5

[0143] <210> 15

[0144] <211> 6

[0145] <212> PRT

[0146] <213> 人工

[0147] <220>

[0148] <223> TC标签

[0149] <400> 15

[0150] Cys Cys Pro Gly Cys Cys

[0151] 1 5

[0152] <210> 16

[0153] <211> 14

[0154] <212> PRT

[0155] <213> 人工

[0156] <220>

[0157] <223> V5标签

[0158] <400> 16

[0159] Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

[0160] 1 5 10

[0161] <210> 17

[0162] <211> 11

[0163] <212> PRT

[0164] <213> 人工

[0165] <220>

[0166] <223> VSV-tag

[0167] <400> 17

[0168] Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

[0169] 1 5 10

[0170] <210> 18

[0171] <211> 8

[0172] <212> PRT

[0173] <213> 人工

[0174] <220>

[0175] <223> Xpress标签

[0176] <400> 18

[0177] Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys

[0178] 1 5

[0179] <210> 19

[0180] <211> 16

[0181] <212> PRT

[0182] <213> 人工

[0183] <220>

[0184] <223> Isopeptag

[0185] <400> 19

[0186] Thr Asp Lys Asp Met Thr Ile Thr Phe Thr Asn Lys Lys Asp Ala Glu

[0187] 1 5 10 15

[0188] <210> 20

[0189] <211> 13

[0190] <212> PRT

[0191] <213> 人工

[0192] <220>

[0193] <223> SpyTag

[0194] <400> 20

[0195] Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys
[0196] 1 5 10
[0197] <210> 21
[0198] <211> 12
[0199] <212> PRT
[0200] <213> 人工
[0201] <220>
[0202] <223> SnoopTag
[0203] <400> 21
[0204] Lys Leu Gly Asp Ile Glu Phe Ile Lys Val Asn Lys
[0205] 1 5 10
[0206] <210> 22
[0207] <211> 12
[0208] <212> PRT
[0209] <213> 人工
[0210] <220>
[0211] <223> 含C58的肽
[0212] <400> 22
[0213] Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val Lys Leu
[0214] 1 5 10
[0215] <210> 23
[0216] <211> 19
[0217] <212> PRT
[0218] <213> 人工
[0219] <220>
[0220] <223> 含C58的肽
[0221] <400> 23
[0222] Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val Lys Leu Val Asn Glu Leu
[0223] 1 5 10 15
[0224] Thr Glu Phe
[0225] <210> 24
[0226] <211> 11
[0227] <212> PRT
[0228] <213> 人工
[0229] <220>
[0230] <223> 含C58的肽
[0231] <400> 24
[0232] Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val Lys Leu
[0233] 1 5 10

[0234] <210> 25

[0235] <211> 18

[0236] <212> PRT

[0237] <213> 人工

[0238] <220>

[0239] <223> 含C58的肽

[0240] <400> 25

[0241] Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val Lys Leu Val Asn Glu Leu Thr

[0242] 1 5 10 15

[0243] Glu Phe

[0244] <210> 26

[0245] <211> 248

[0246] <212> PRT

[0247] <213> 人工

[0248] <220>

[0249] <223> eGFP突变体C70MS174C

[0250] <400> 26

[0251] Arg Gly Ser His Met Gly Ser Ile Gln Met Val Ser Lys Gly Glu Glu

[0252] 1 5 10 15

[0253] Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val

[0254] 20 25 30

[0255] Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr

[0256] 35 40 45

[0257] Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro

[0258] 50 55 60

[0259] Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Met

[0260] 65 70 75 80

[0261] Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser

[0262] 85 90 95

[0263] Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp

[0264] 100 105 110

[0265] Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr

[0266] 115 120 125

[0267] Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly

[0268] 130 135 140

[0269] Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Cys His Asn Val

[0270] 145 150 155 160

[0271] Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys

[0272] 165 170 175

[0273] Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr

[0274] 180 185 190

[0275] Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn

[0276] 195 200 205

[0277] His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys

[0278] 210 215 220

[0279] Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr

[0280] 225 230 235 240

[0281] Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

[0282] 245

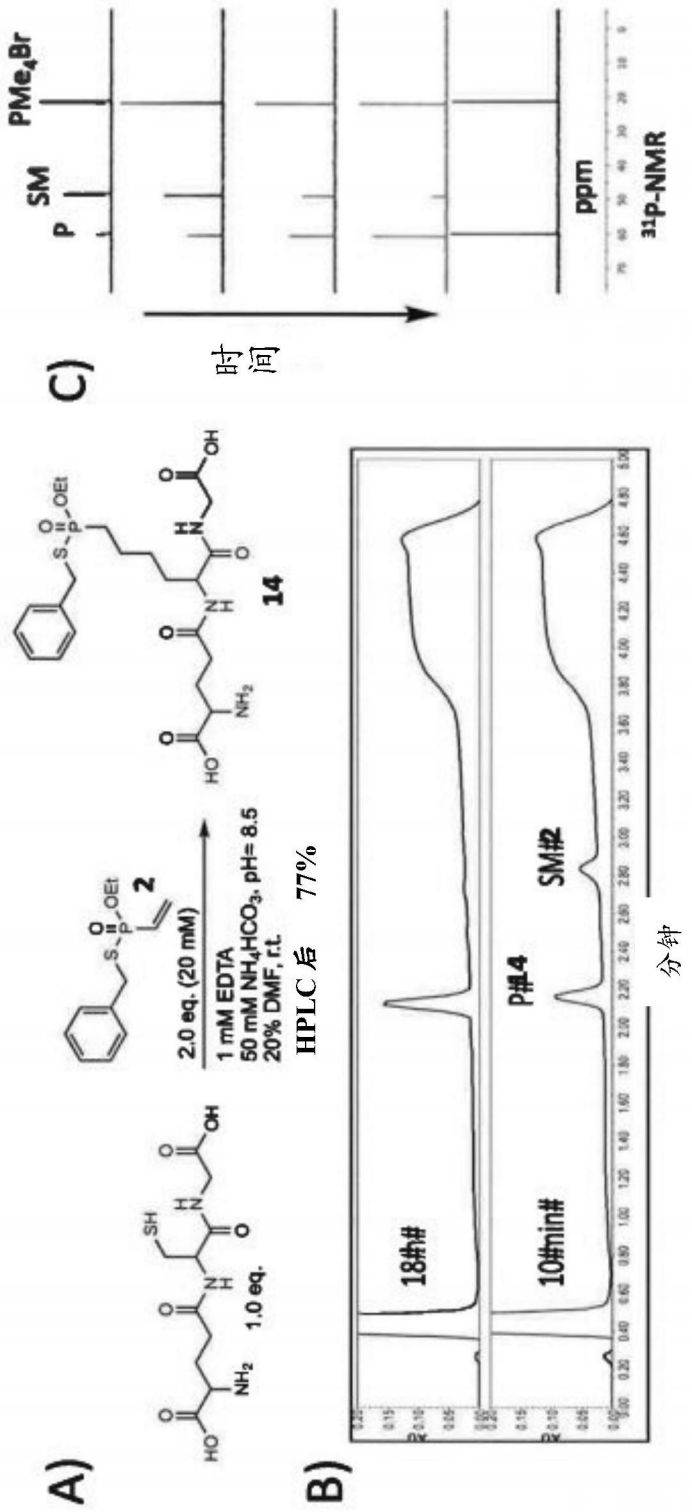

C)
PMe4Br
SM
P
时间
ppm
31P-NMR
A)
1.0 eq.
2.0 eq. (20 mM)
1 mM EDTA
50 mM NH4HCO3, pH= 8.5
20% DMF, r.t.
2
14
B)
HPLC后 77%
18h#
10#min#
P#4
SM#2
分钟

图1

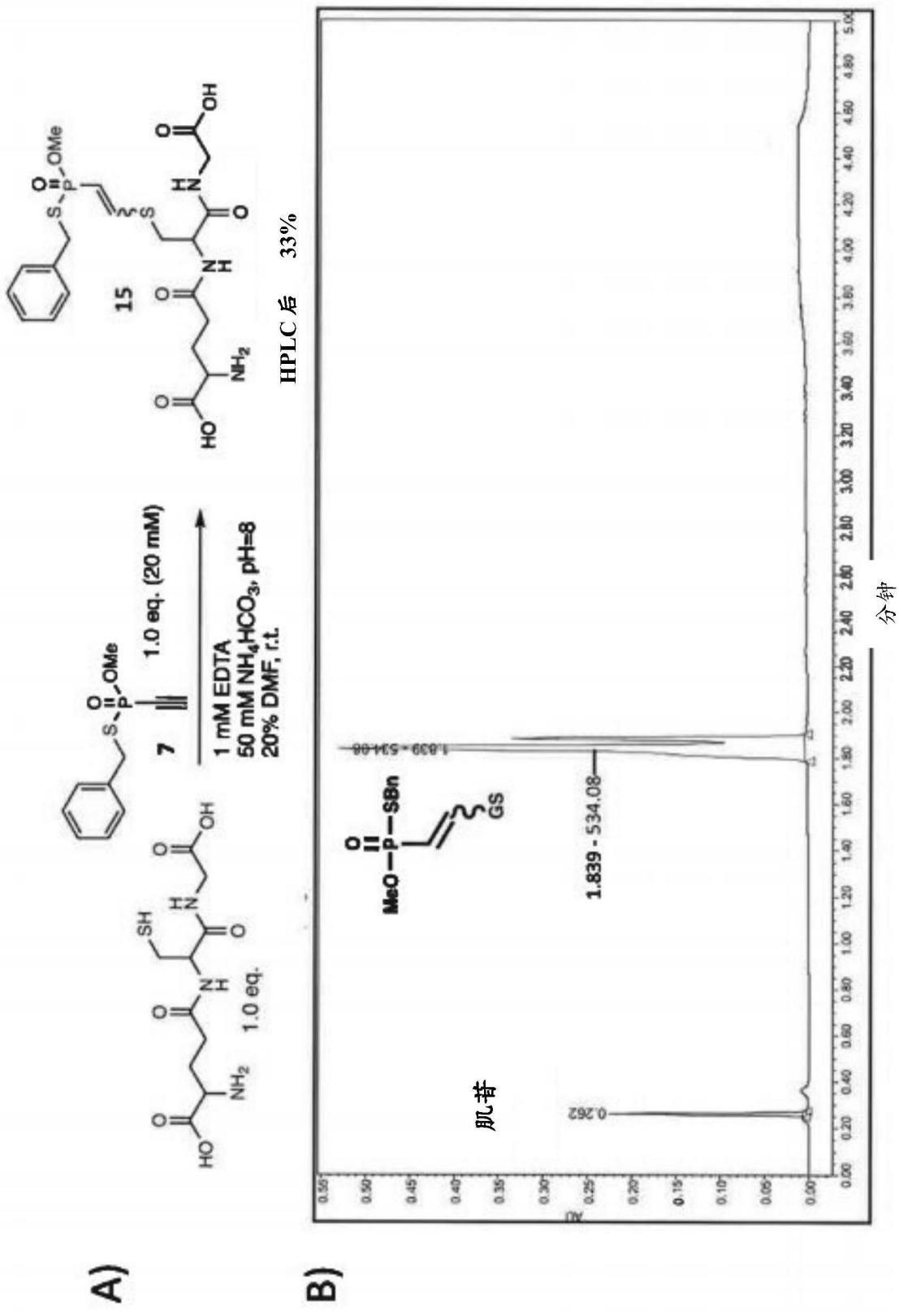

A)
B)
1.0 eq.
1.0 eq. (20 mM)
1 mM EDTA
50 mM NH4HCO3, pH=8
20% DMF, r.t.
7
15
HPLC 后 33%
肌苷
0.262
1.839 - 534.08
1.839 - 534.08
GS
SBn
MeO
分钟

图2

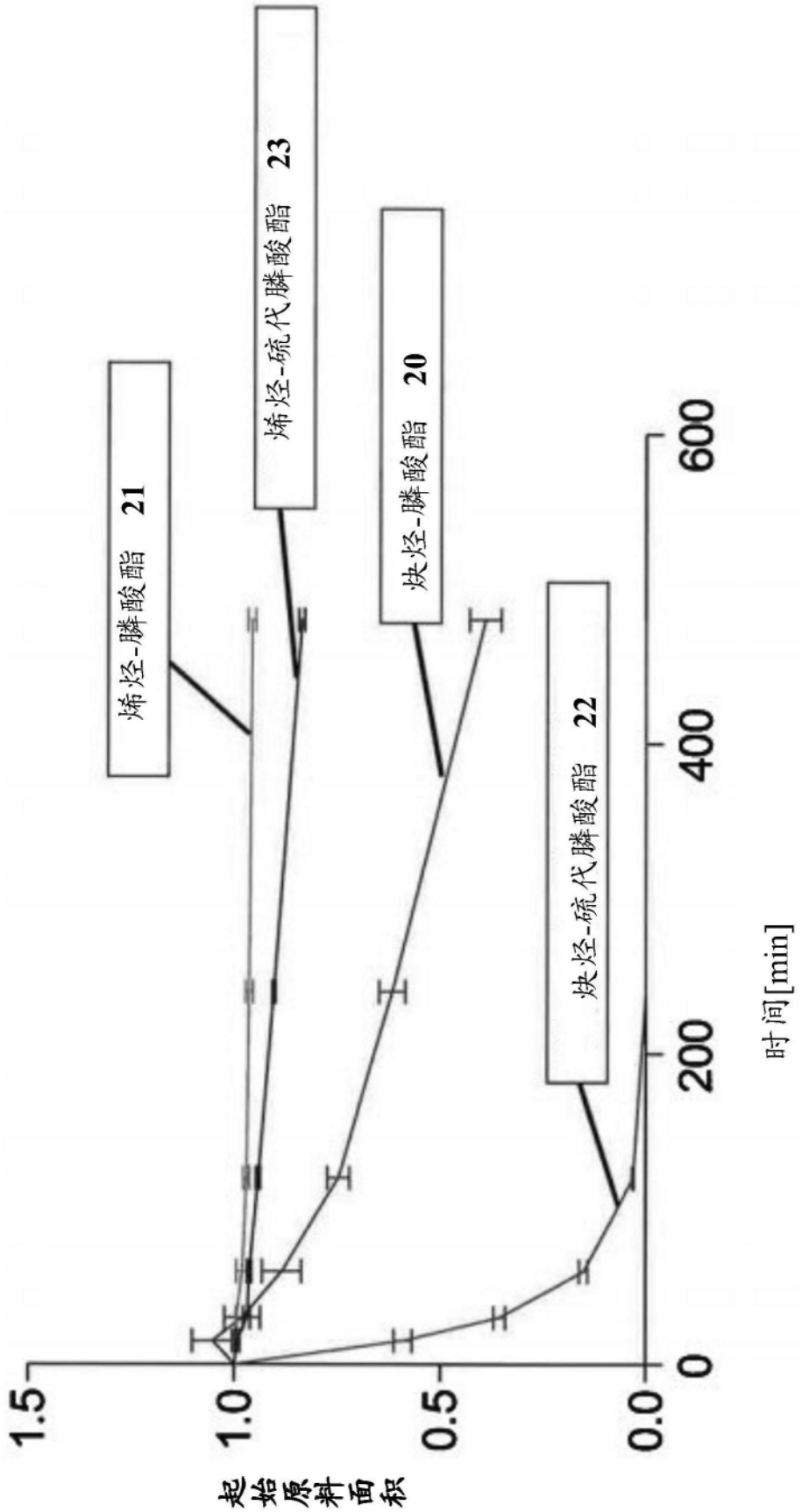

烯烃-膦酸酯 21
烯烃-硫代膦酸酯 23
炔烃-膦酸酯 20
炔烃-硫代膦酸酯 22
起始原料面积
1.5
1.0
0.5
0.0
0
200
400
600
时间[min]

图3

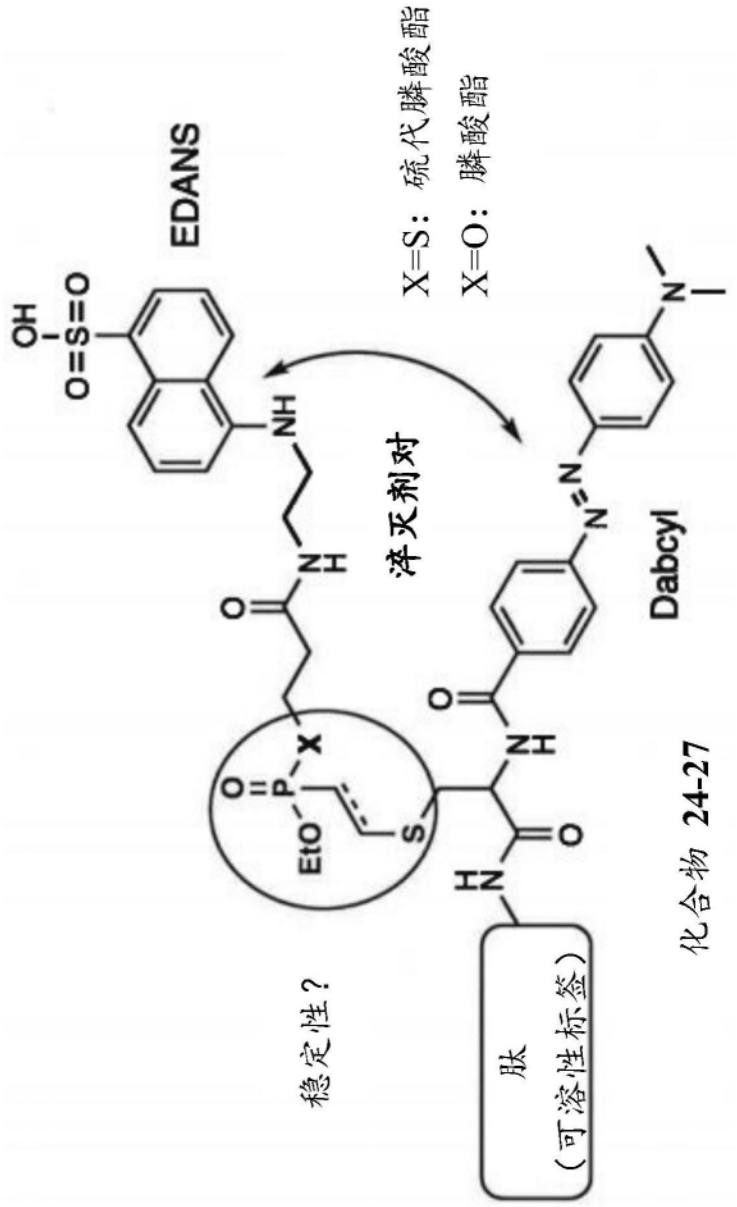

EDANS
OH
O=S=O
NH
O
N
H
X=S：硫代膦酸酯
X=O：膦酸酯
淬灭剂对
Dabcyl
N
N
N
O
O
P
X
EtO
S
N
H
O
N
H
O
肽
（可溶性标签）
稳定性？
化合物 24-27

图4

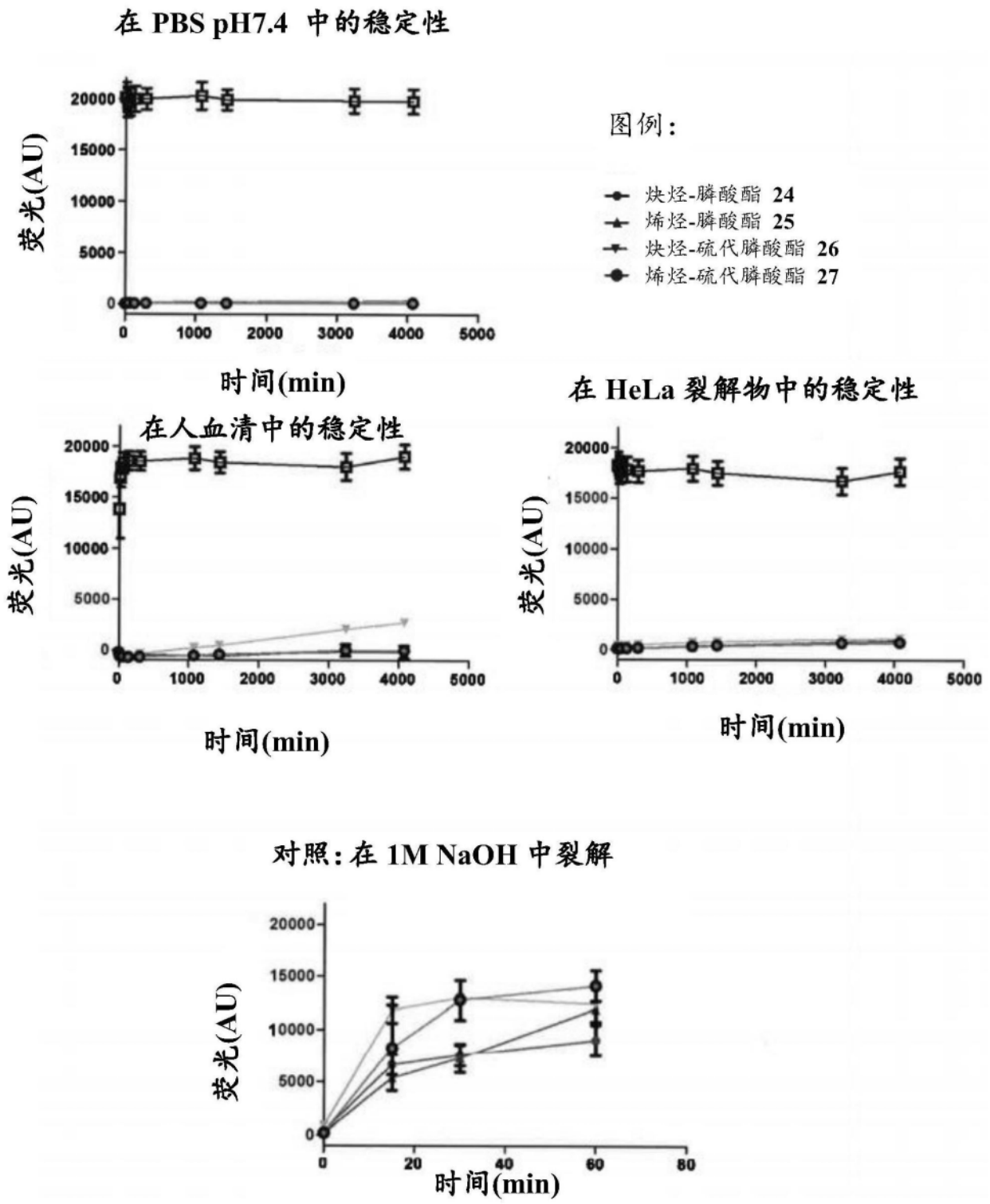

在 PBS pH7.4 中的稳定性
荧光(AU)
时间(min)
图例:
炔烃-膦酸酯 24
烯烃-膦酸酯 25
炔烃-硫代膦酸酯 26
烯烃-硫代膦酸酯 27
在人血清中的稳定性
荧光(AU)
时间(min)
在 HeLa 裂解物中的稳定性
荧光(AU)
时间(min)
对照:在 1M NaOH 中裂解
荧光(AU)
时间(min)

图5

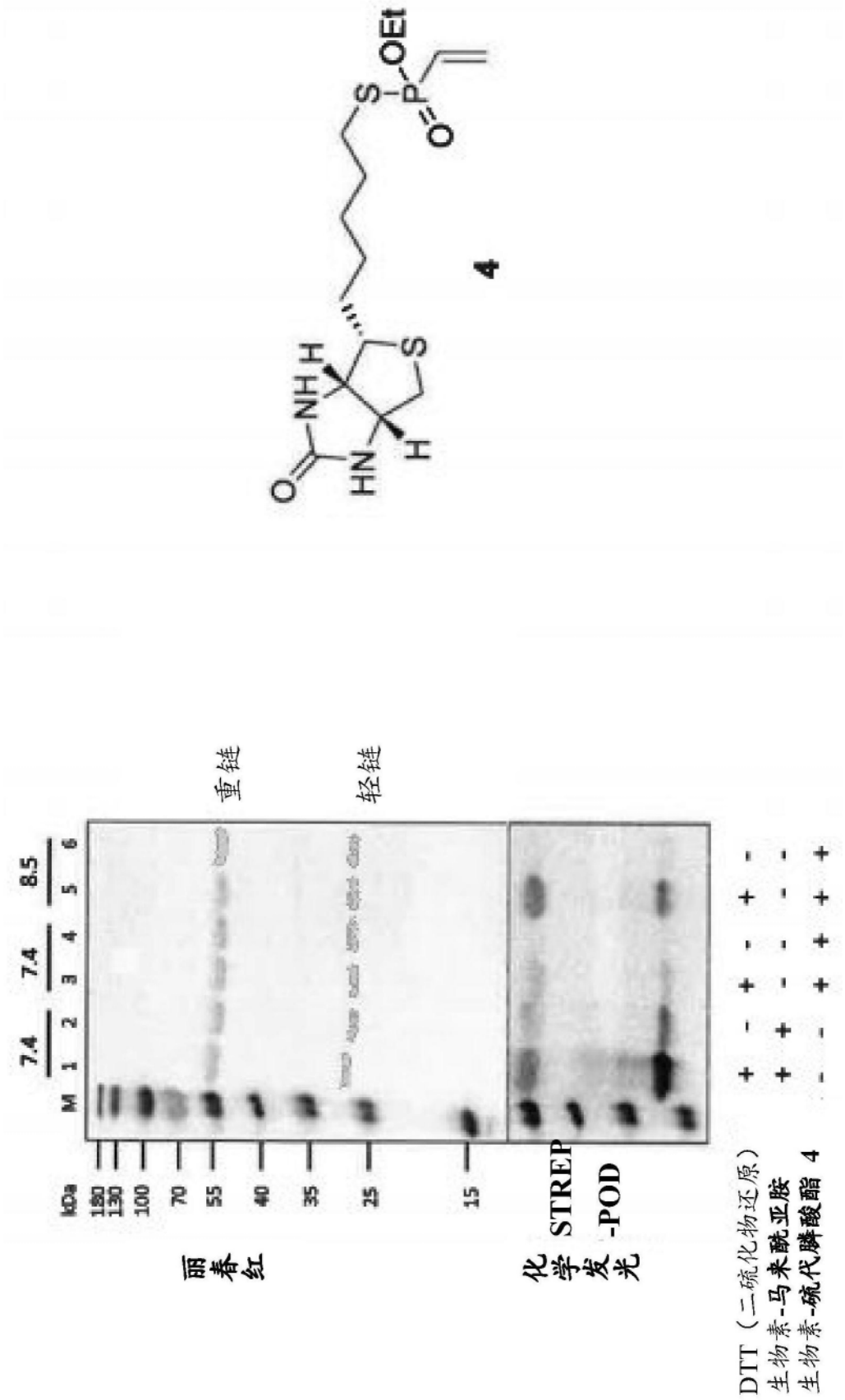

4
重链
轻链
丽春红
化学发光
STREP
-POD
kDa
180
130
100
70
55
40
35
25
15
M
7.4
7.4
8.5
DTT（二硫化物还原）
生物素-马来酰亚胺
生物素-硫代膦酸酯 4

图6

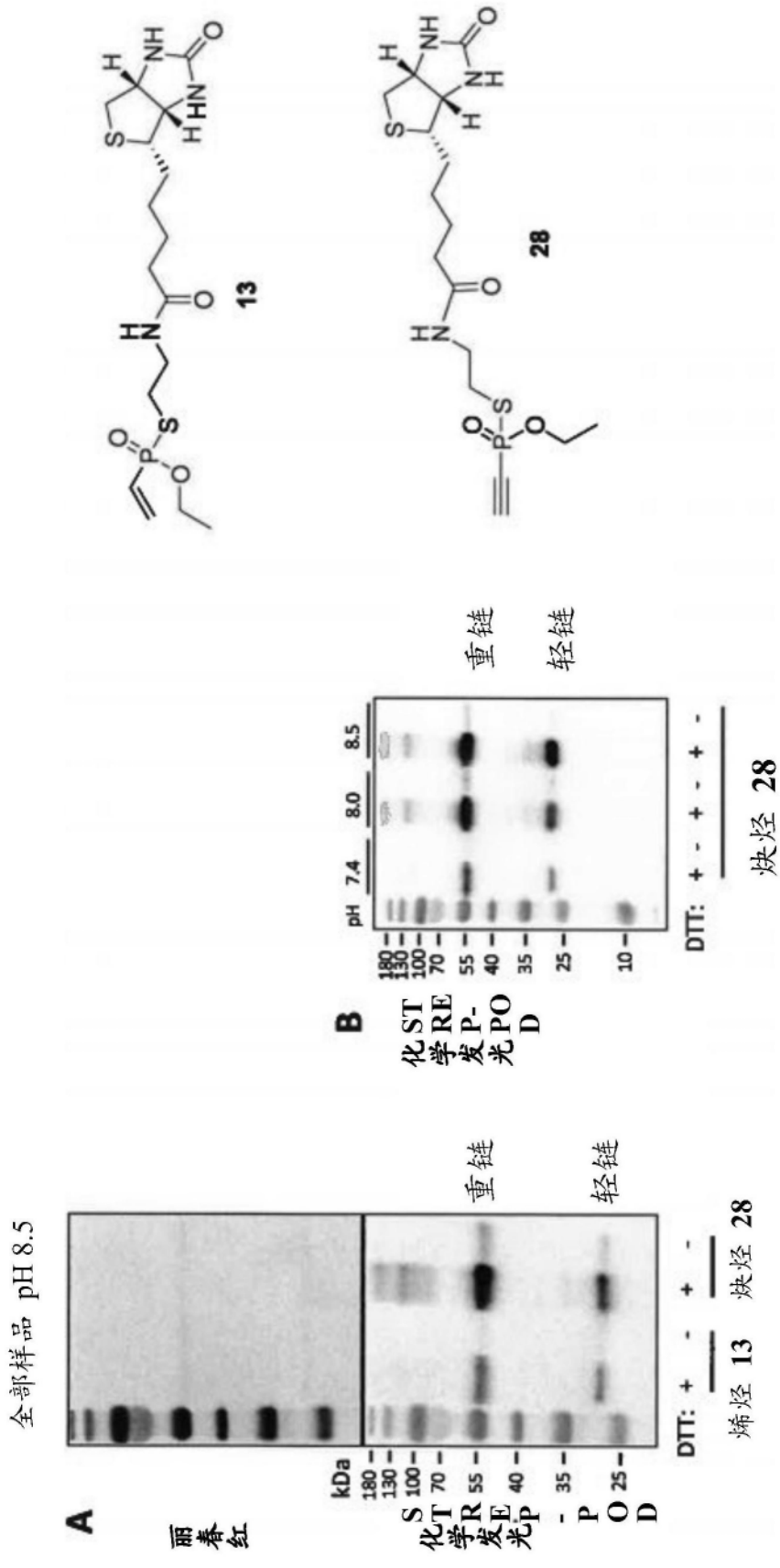

13
28
A
丽春红
全部样品 pH 8.5
kDa
180
130
100
70
55
40
35
25
化学发光PDS
重链
轻链
DTT: + - + -
烯烃 13 炔烃 28
B
化学发光PDS
pH 7.4 8.0 8.5
重链
轻链
DTT: + - + - + -
炔烃 28

图7

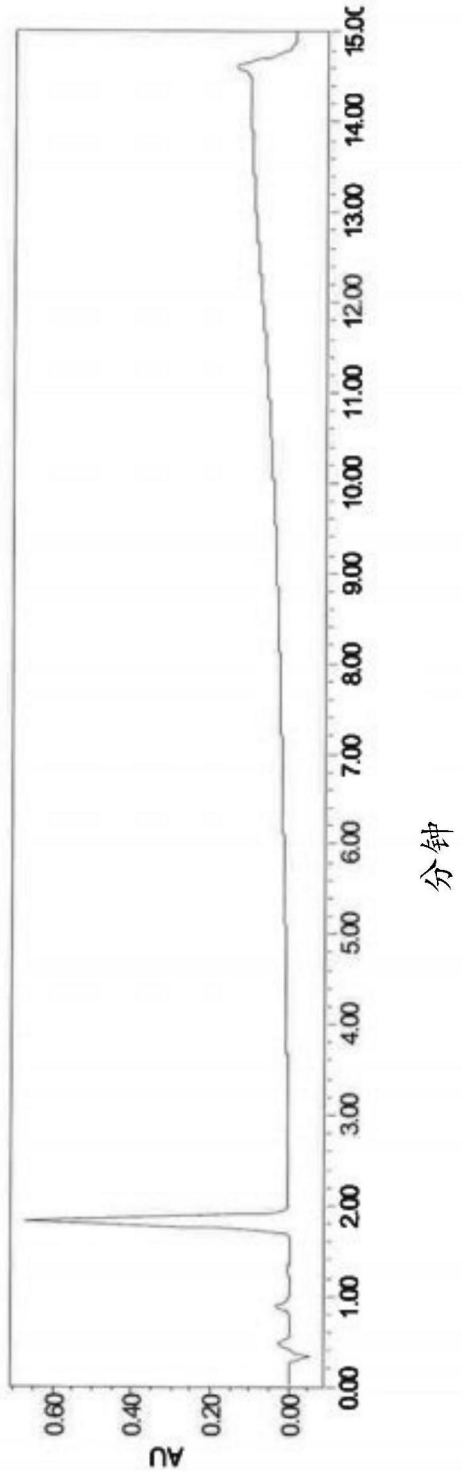

AU
0.60
0.40
0.20
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图8

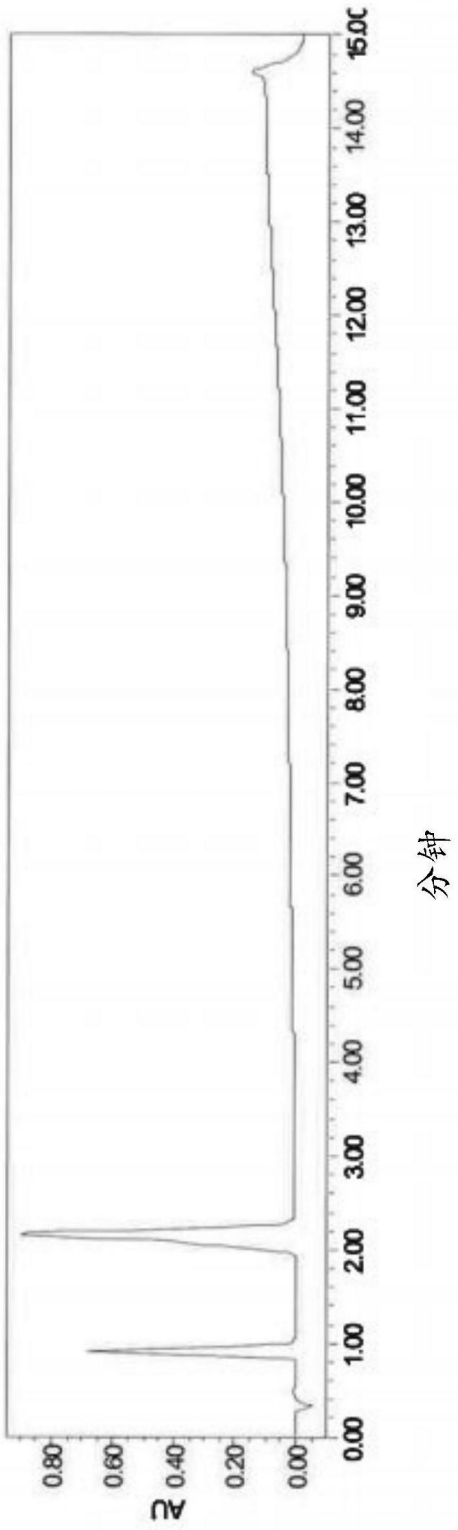

AU
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图9

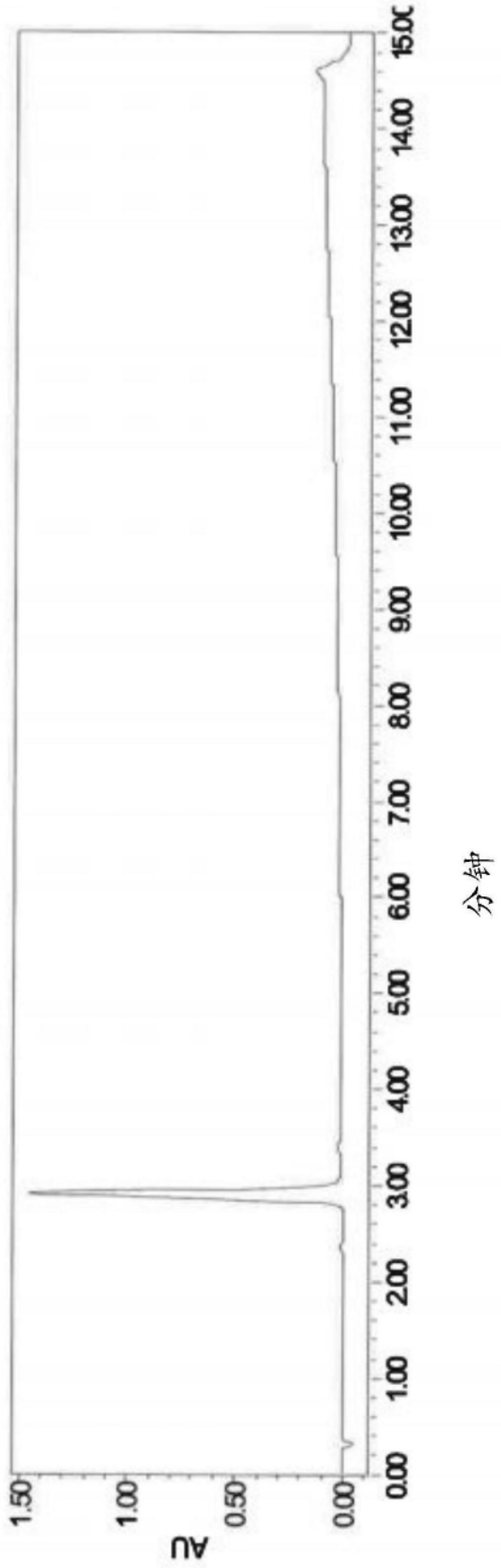

AU
1.50
1.00
0.50
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图10

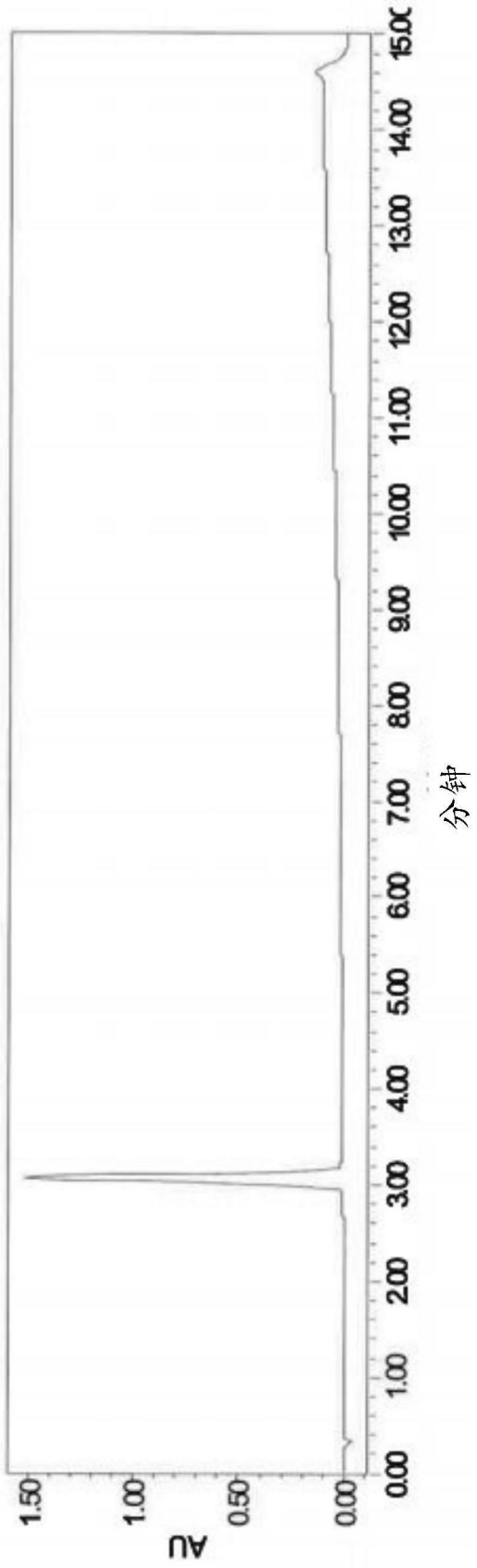

AU
1.50
1.00
0.50
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图11

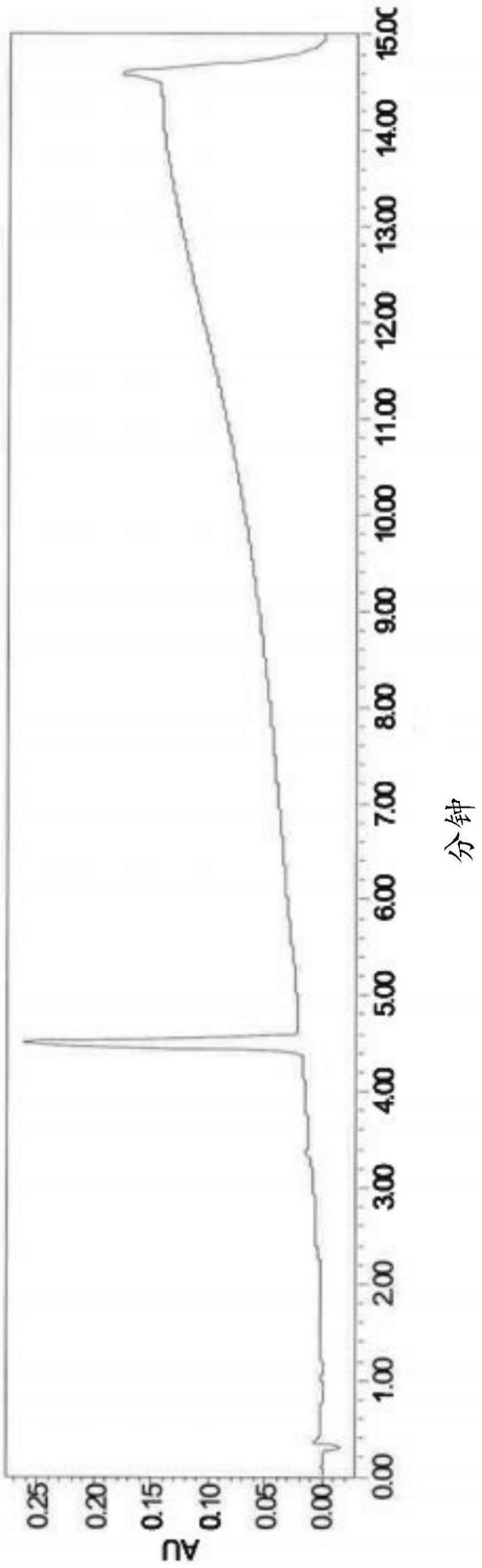

AU
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图12

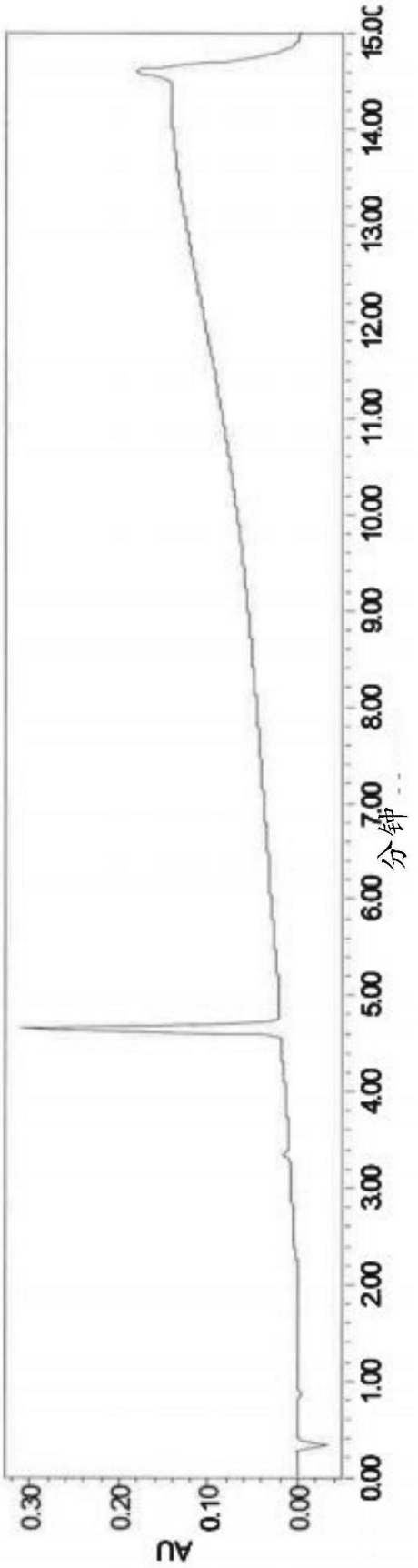

AU
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图13

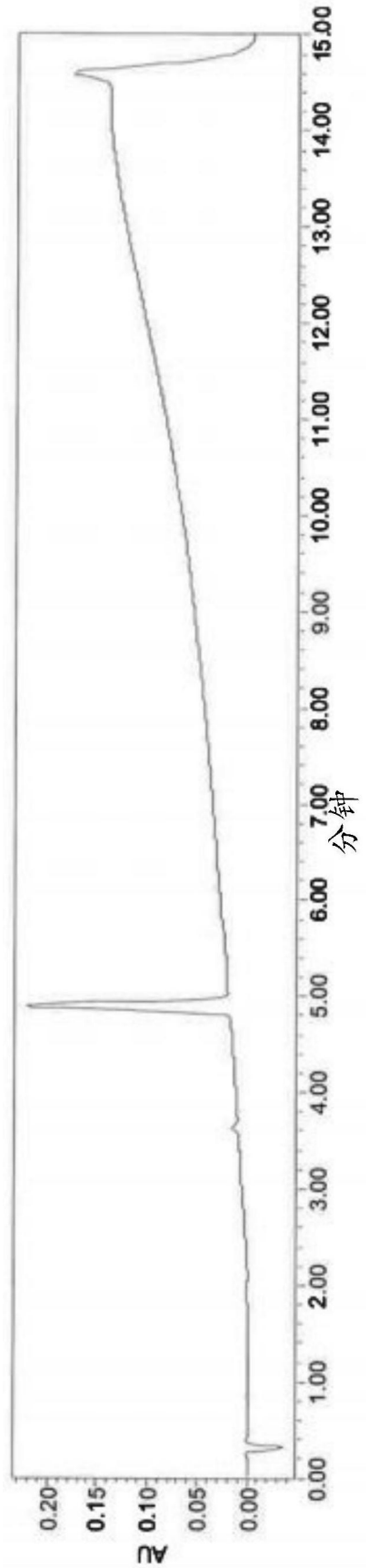

15.00
14.00
13.00
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
分钟
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU

图14

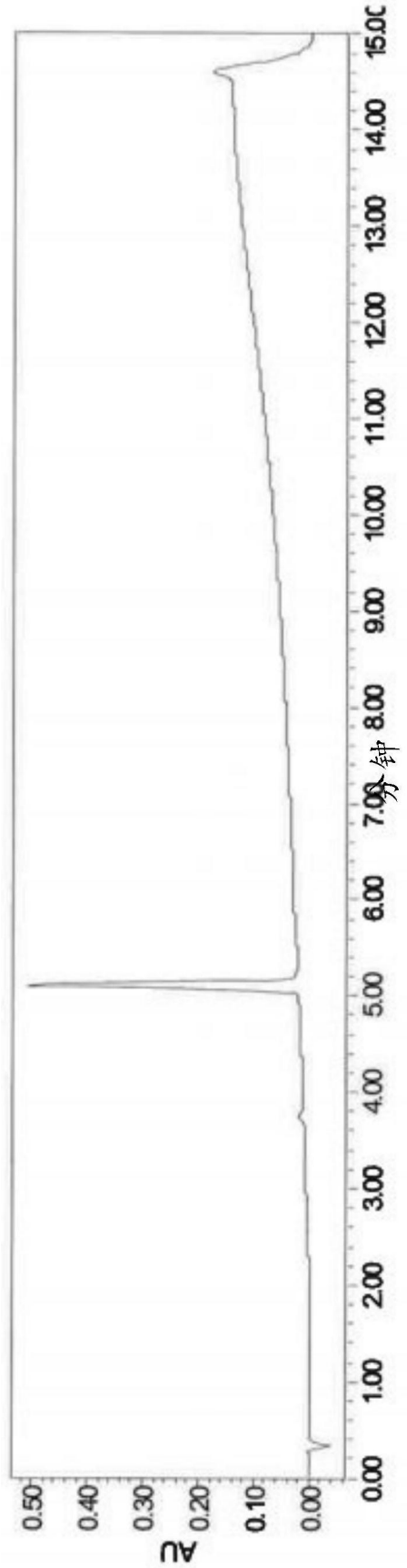

AU
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
分钟

图15

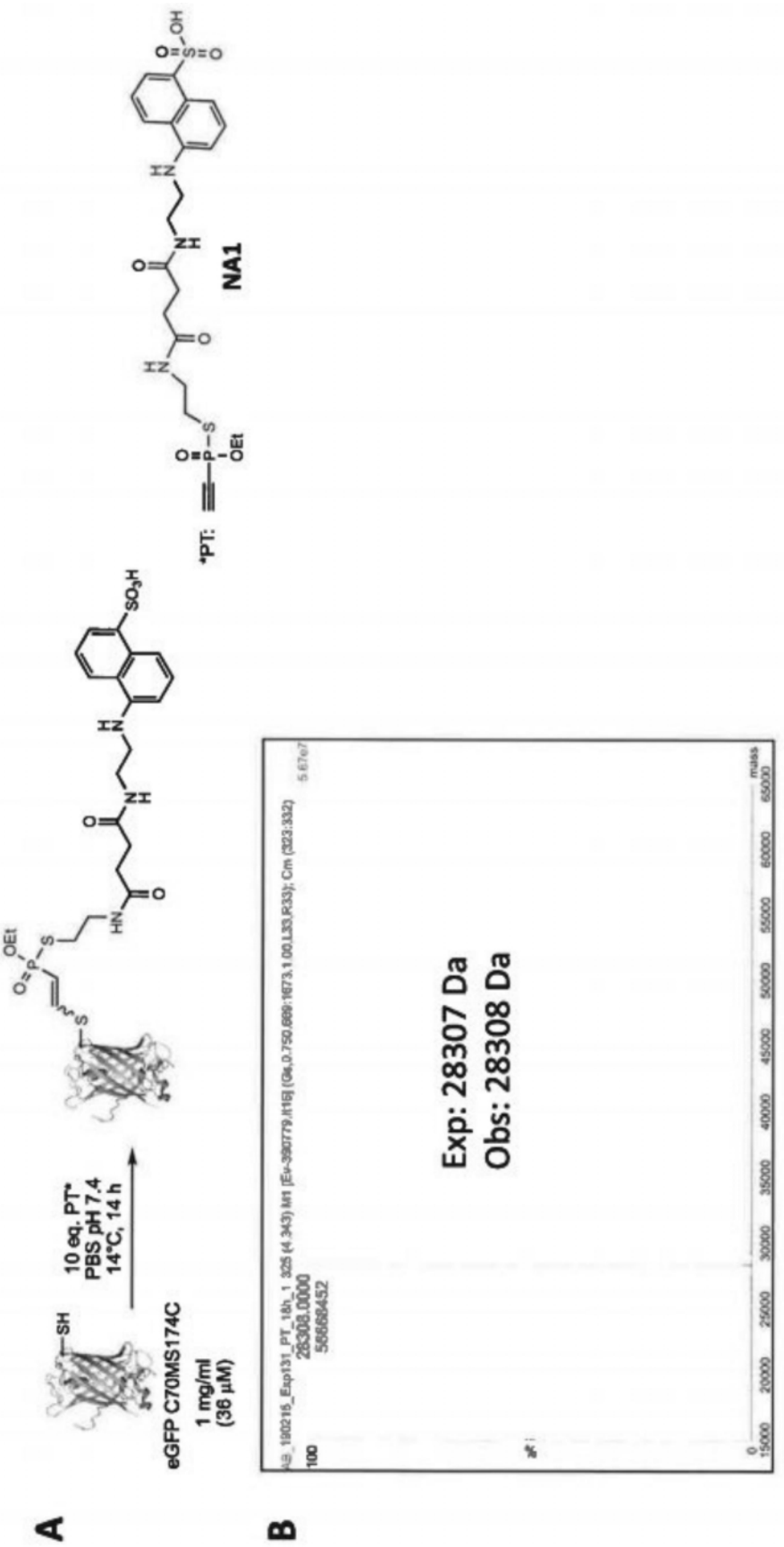
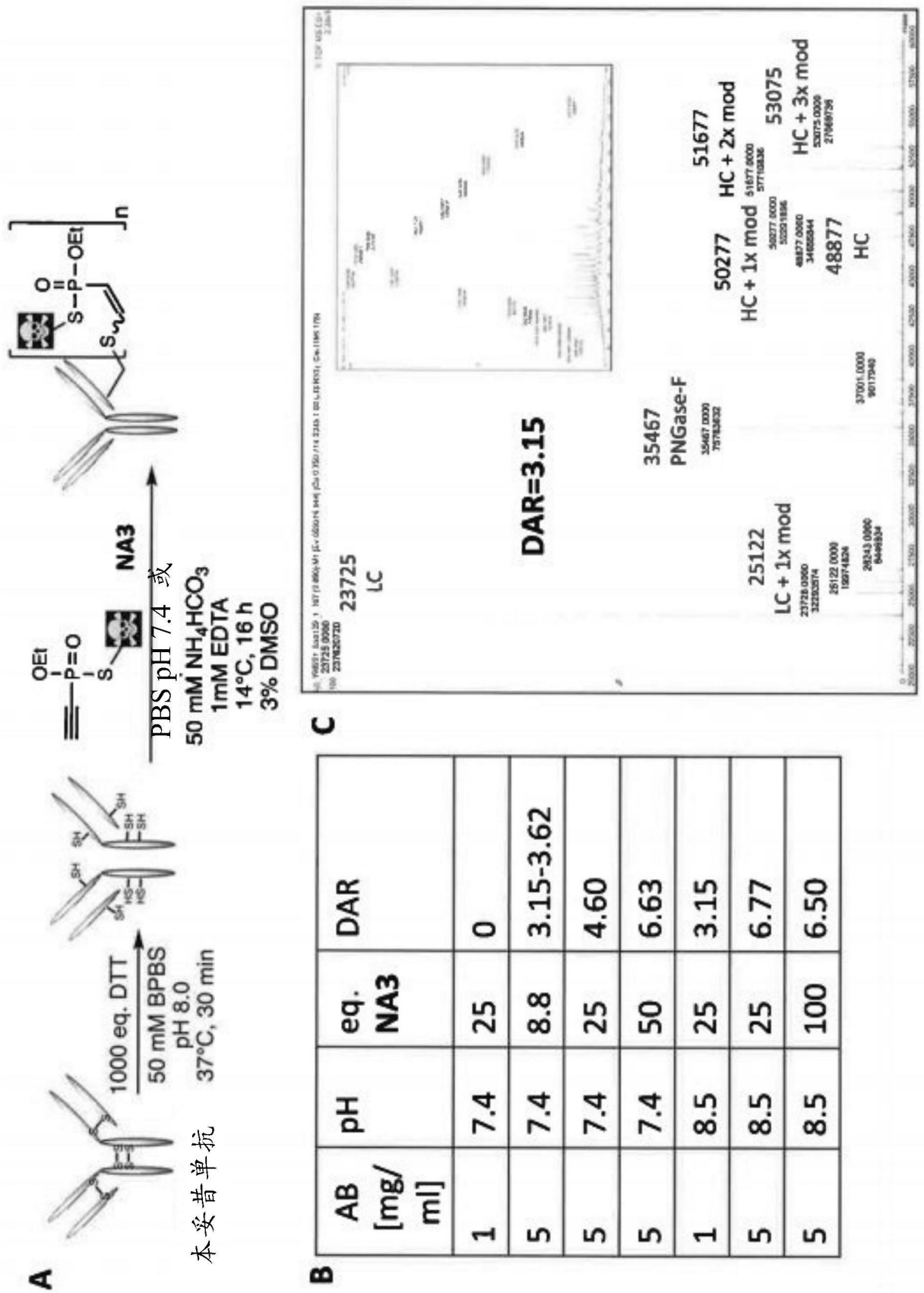

A
B
eGFP C70MS174C
1 mg/ml
(36 µM)
10 eq. PT*
PBS pH 7.4
14°C, 14 h
*PT:
NA1
Exp: 28307 Da
Obs: 28308 Da
28308.0000
586668452
100
mass

图16



AB [mg/ml]	pH	eq. NA3	DAR
1	7.4	25	0
5	7.4	8.8	3.15-3.62
5	7.4	25	4.60
5	7.4	50	6.63
1	8.5	25	3.15
5	8.5	25	6.77
5	8.5	100	6.50

图17

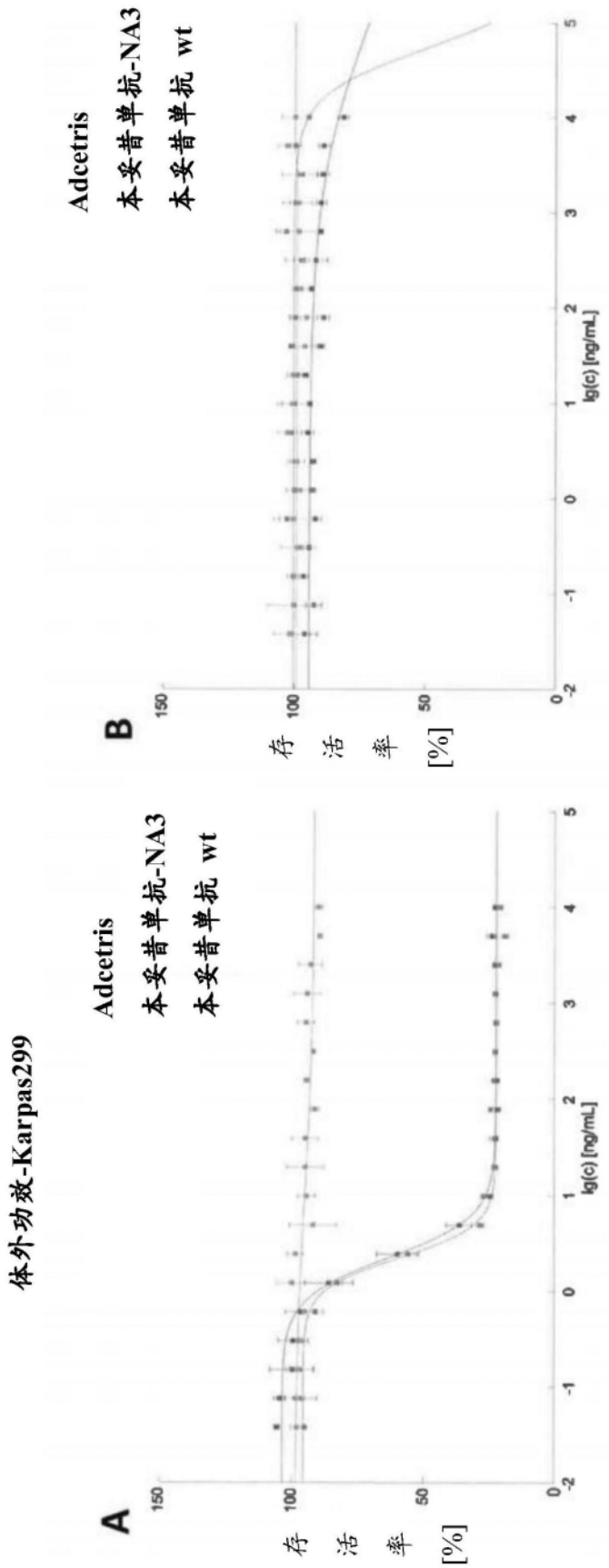

体外功效-Karpas299
A
Adcetris
本妥昔单抗-NA3
本妥昔单抗 wt
存活率 [%]
lg(c) [ng/mL]
体外功效-HL 60
B
Adcetris
本妥昔单抗-NA3
本妥昔单抗 wt
存活率 [%]
lg(c) [ng/mL]

图18

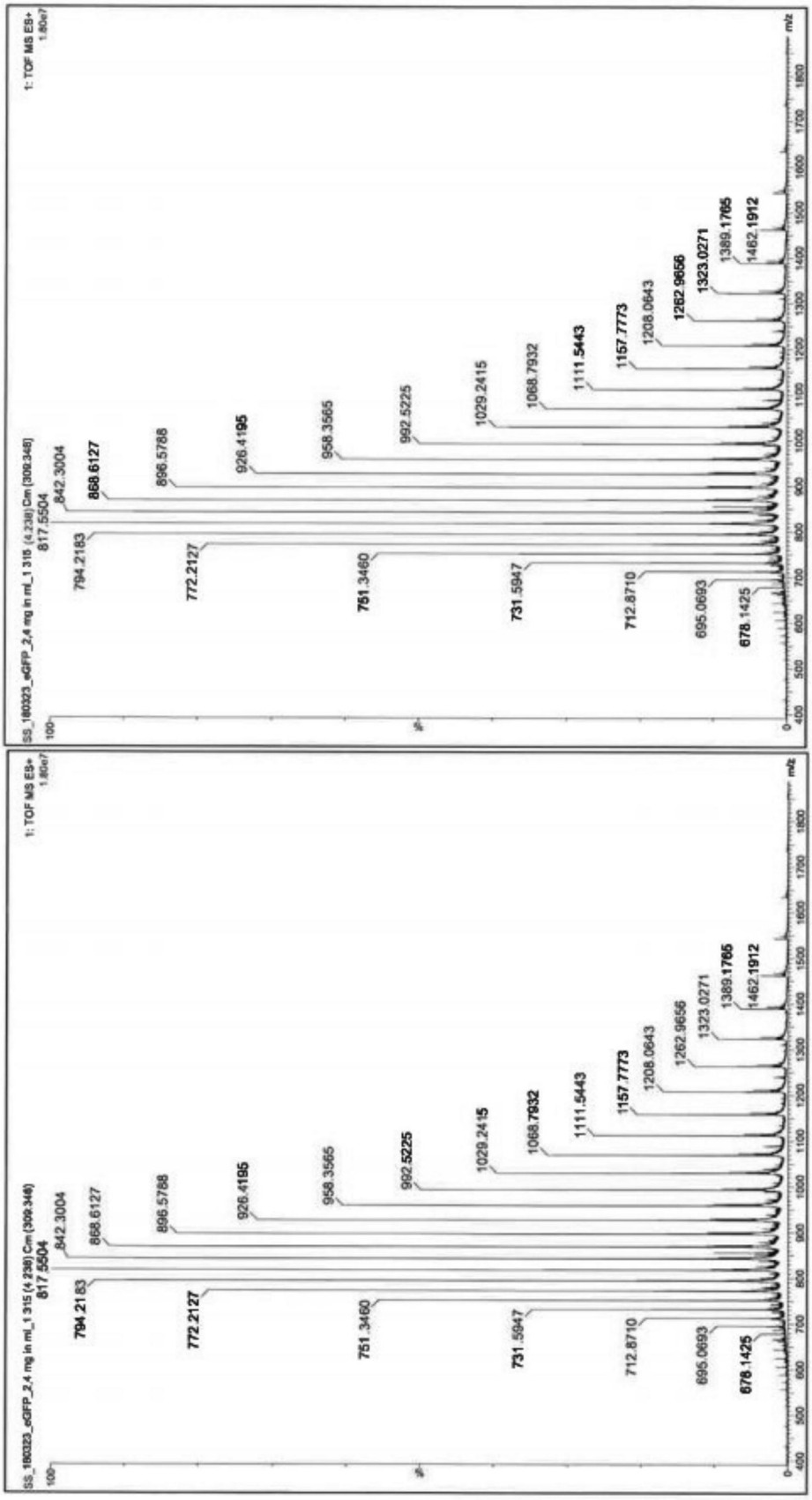

SS_180323_eGFP_2,4 mg in mL_1 315 (4.238) Cm (309:348)
1: TOF MS ES+
1.80e7
817.5504
842.3004
868.6127
794.2183
896.5788
772.2127
926.4195
751.3460
958.3565
731.5947
992.5225
712.8710
1029.2415
695.0693
1068.7932
678.1425
1111.5443
1157.7773
1208.0643
1262.9656
1323.0271
1389.1765
1462.1912
m/z

图19

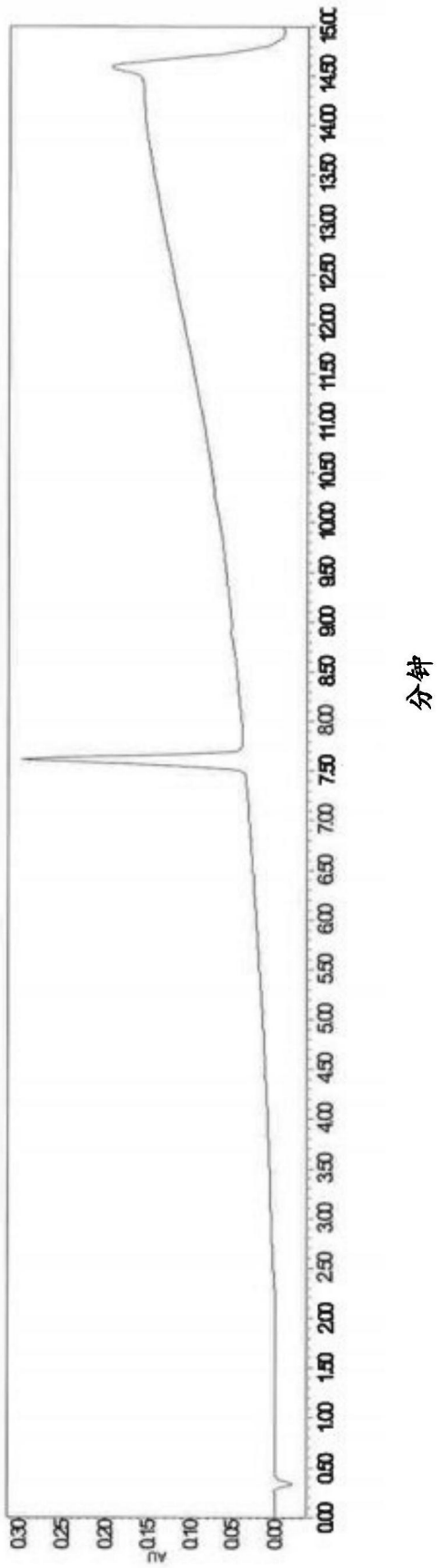

0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
AU
0.00 0.50 1.00 1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50 8.00 8.50 9.00 9.50 10.00 10.50 11.00 11.50 12.00 12.50 13.00 13.50 14.00 14.50 15.00
分钟

图20

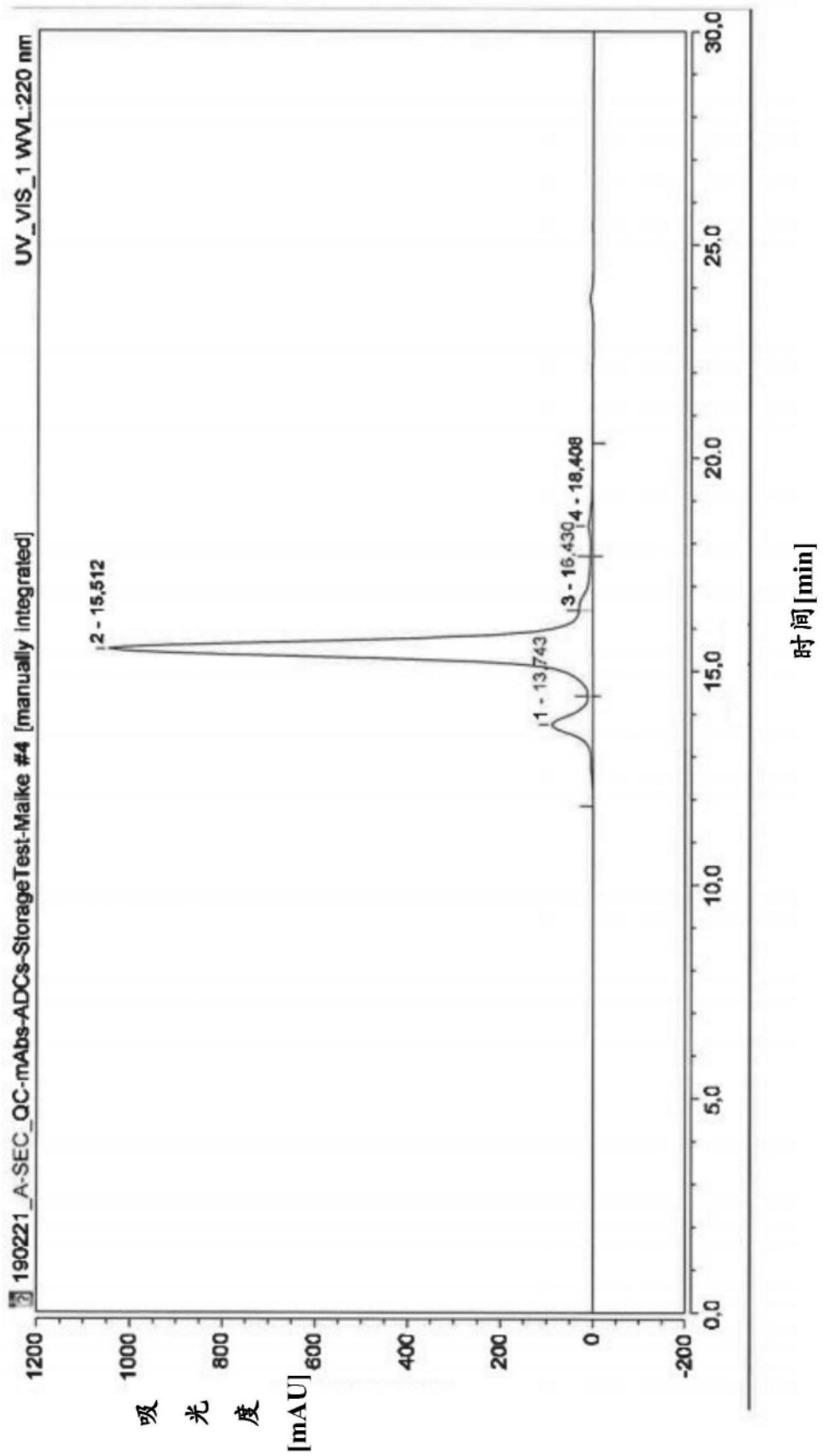

UV_VIS_1 WVL:220 nm
190221_A-SEC_QC-mAbs-ADCs-StorageTest-Maike #4 [manually integrated]
2 - 15,512
1 - 13,743
3 - 16,430
4 - 18,408
吸光度 [mAU]
时间 [min]
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
25,0
30,0

图21


0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
AU
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00
11.50
12.00
12.50
13.00
13.50
14.00
14.50
15.00
分钟

图22