

一种抗病毒偶联物

技术领域

本公开属于医药领域，具体涉及一种抗病毒偶联物。

5

背景技术

流行性感冒病毒(influenza virus)，包括人流感病毒和动物流感病毒，可引起人、禽、猪、马、蝙蝠等多种动物感染及发病，流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)、丁(D)四型。其中甲型流感病毒传播迅速，易在人与人之间传播，甚至跨物种传播。由于流感病毒抗原性易发生变异，屡次引起世界范围的大流行。流感大流行给人类健康和全球经济带来沉重的灾难。

10

目前临床上使用的抗流感药物主要分为神经氨酸酶(NA)抑制剂（例如奥司他韦(Oseltamivir)）和 M2 离子通道蛋白抑制剂（例如金刚烷胺(Amantadine)和金刚乙胺(Rimantadine)）。在流感早期对症使用此类药物可缩短病程及减轻症状，但此类药物也有弊端，现在耐药性问题已经成为抗流感病毒药物应用中不可忽视的重要问题。

15

有研究表明，于 2003 年起，全球范围内出现了耐药性 A 型流感病毒(H₃N₂)，于 2007 年，世界范围内出现对奥司他韦耐药的季节性 A 型流感病毒(H₁N₁)，对金刚烷胺耐药的 A 型流感病毒(H₃N₂)更是几乎可达 100%，对金刚烷胺耐药的 A 型流感病毒(H₁N₁)可达 15.5%。因此，急需开发新型抗流感药物。

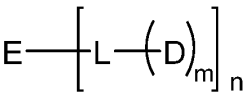
已经公开了若干用于抑制流感病毒生长的药物，包括新型的偶联物。例如 WO2020051498 公开了一系列抗病毒偶联药物。

20

发明内容

本公开的目的在于提供一种新的抗病毒偶联物。

本公开一方面提供了式 (I) 所示的偶联物，



(I)

25

其中，

E 包含蛋白或多肽；

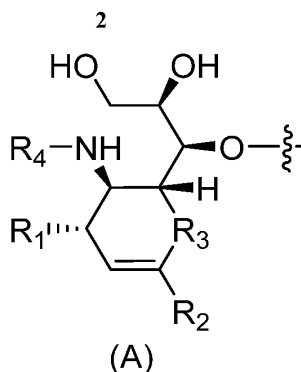
L 为将 E 共价连接于 D 的连接子；

m 选自 3、4、5、6、7、8、9 和 10；

30

n 为 1 至 20（包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意两数值之间任意数值）；

D 各自独立地选自式 (A) 所示结构，



R_1 选自 -OH、 $-NH_2$ 和 $-NHC(=NH)NHR_5$;

R_2 选自 $-CO_2H$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 和 $-SO_3H$;

R_3 为 -O- 或 -S-;

5 R_4 选自 $-COCH_3$ 、 $-COCF_3$ 和 $-SO_2CH_3$;

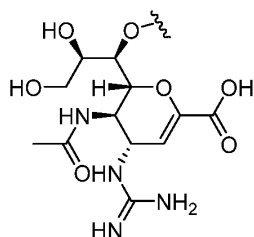
R_5 选自氢、羟基、巯基、硝基、氰基、 $-NR_iR_j$ 、 $-C(O)R_k$ 、 $-C(O)OR_k$ 、 $-S(O)R_k$ 、 $-S(O)OR_k$ 、 $-S(O)(O)R_k$ 、 $-C(S)R_k$ 、 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烷氧基、 C_2-C_{10} 烯基和 C_2-C_{10} 炔基，其中所述的烷基、烷氧基、烯基和炔基任选被选自 C_1-C_6 烷基、卤素、羟基、巯基、 $-NR_iR_j$ 、氧代、硫代、 $-C(O)R_k$ 、 $-C(O)OR_k$ 、 $-S(O)R_k$ 、 $-S(O)OR_k$ 、 $-S(O)(O)R_k$ 、 $-C(S)R_k$ 、硝基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷硫基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、3 至 10 元环烷基、3 至 10 元杂环基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代;

R_i 、 R_j 各自独立地选自氢原子、羟基、 C_1-C_6 烷基和 C_1-C_6 烷氧基;

15 R_k 独立地选自氢原子、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基、 $-NR_iR_j$ ，其中所述的烷基、烷氧基、卤代烷基任选被选自 C_1-C_6 烷基、卤素、羟基、巯基、 $-NR_iR_j$ 、氧代、硫代、羧基、硝基、氰基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷硫基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、3 至 10 元环烷基、3 至 10 元杂环基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

20 在一些实施方案中， R_5 选自氢、羟基、氨基和 $-C(O)R_k$ ，其中 R_k 选自氢原子、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基和羟基，其中所述的烷基和烷氧基任选被选自卤素、羟基、氧代、硫代、羧基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 烷硫基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

在一些实施方案中，D 选自式 (A-1) 所示结构，



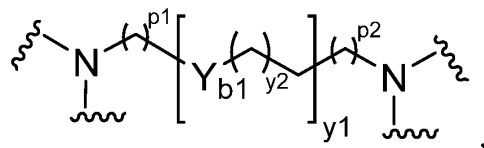
25 在一些实施方案中，m 为 3 或 4。

在一些实施方案中，所述连接子包含连接于 D 的骨架单元。所述骨架单元可包含核心

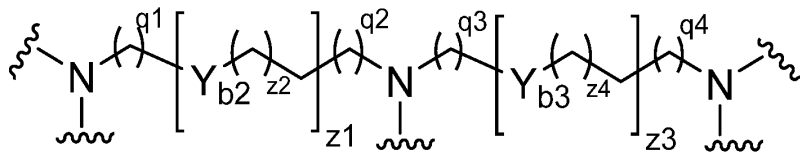
部分 L₂ 及分支部分 L₁ 和 L₃。所述分支部分 L₁ 用于将 E 与核心部分相连。所述分支部分 L₃ 用于将 D 与核心部分相连。可存在多个分支 L₃ 与核心部分相连。

在一些实施方案中，连接子包括具有 $(-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{x2}-\text{Y}_1-)_{x1}$ 的重复单元结构，其中 x₁ 为 0 至 100 的整数，x₂ 为 0-10 的整数，Y₁ 选自 O 或 CH₂，例如 O。在一些实施方案中，x₂ 为 1。在一些实施方案中，连接子包括聚乙二醇（PEG）结构。

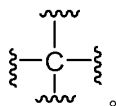
在一些实施方案中，所述核心部分结构 L₂ 选自



其中，y₁ 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，y₂ 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，Y_{b1} 选自 O 或 CH₂，例如 O，p₁、p₂ 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，或



其中，z₁ 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，z₂ 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，Y_{b2} 选自 O 或 CH₂，例如 O，z₃ 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，z₄ 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，Y_{b3} 选自 O 或 CH₂，q₁、q₂、q₃、q₄ 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数或



所述的 E 或 D 可与任意一个氮原子连接。

在一些实施方案中，连接子包含分支结构 L₁，其为一段通过碳原子与 E 共价连接而另一端任选通过重复单元结构与连接子的核心部分相连的化学结构片段。

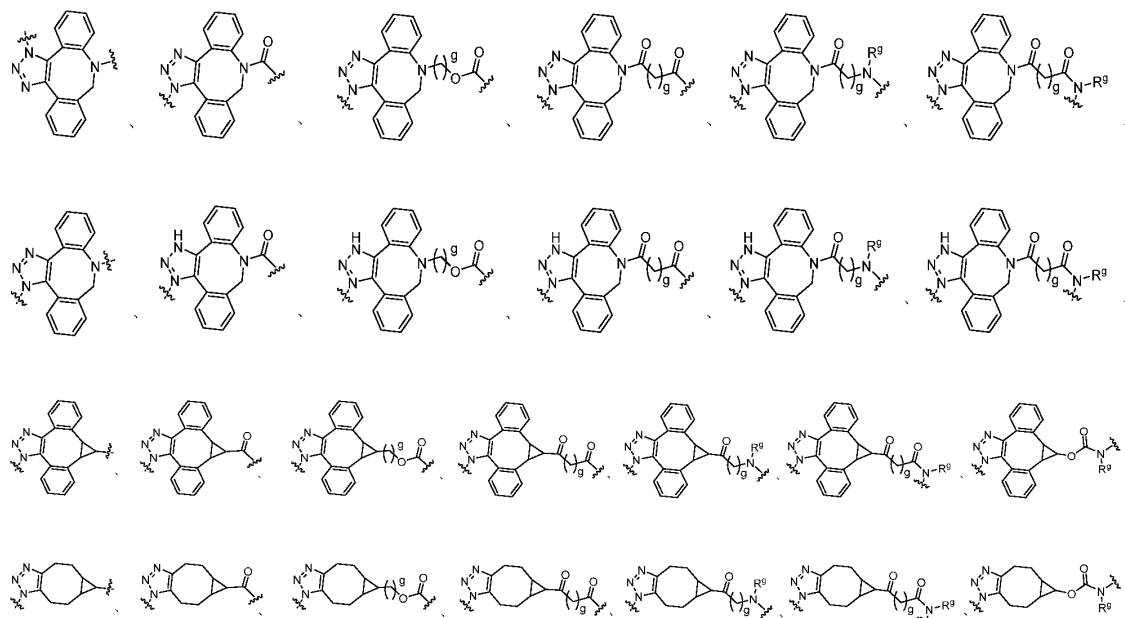
在一些实施方案中，含有叠氮基的分子可用于形成端基，其中所述叠氮基可与炔进行环加成以形成 1,2,3-三唑连接。在一些实施方案中，含有炔基的分子可用于形成端基，其中所述炔基可与叠氮化物进行环加成以形成 1,2,3-三唑连接。在一些实施方案中，含有马来酰亚胺基的分子可用于形成端基，其中所述马来酰亚胺基可与半胱氨酸反应以形成 C-S 连接。在一些实施方案中，含有一个或多个磺酸基的分子可用于形成端基，其中所述磺酸基可与神经氨酸酶抑制剂中的连接氮形成磺酰胺连接。在一些实施方案中，含有一个或多个异氰酸酯基的分子可用于形成端基，其中所述异氰酸酯基可与神经氨酸酶抑制剂中的连接氮形成脲连接。在一些实施方案中，含有一个或多个卤烷基的分子可用于形成端基，其中所述卤烷基可与神经氨酸酶抑制剂形成共价连接，例如 C-N 及 C-O 连接。

使用端基将偶联物中的两种或两种以上组分共价偶联可使用熟知有机化学合成技术及方法来实现。两种组分上的互补官能团可彼此反应以形成共价键。互补反应性官能团的实例包括但不限于例如马来酰亚胺与半胱氨酸、胺与经活化羧酸、硫醇与马来酰亚胺、经活化磺酸与胺、异氰酸酯与胺、叠氮化物与炔以及烯烃与四嗪。与多肽(例如, Fc 单体、Fc 结构域、Fc 结合肽、白蛋白或白蛋白结合结构域等)的位点特异性偶联可使用所属领域中已知的技术来实现。

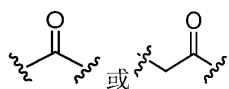
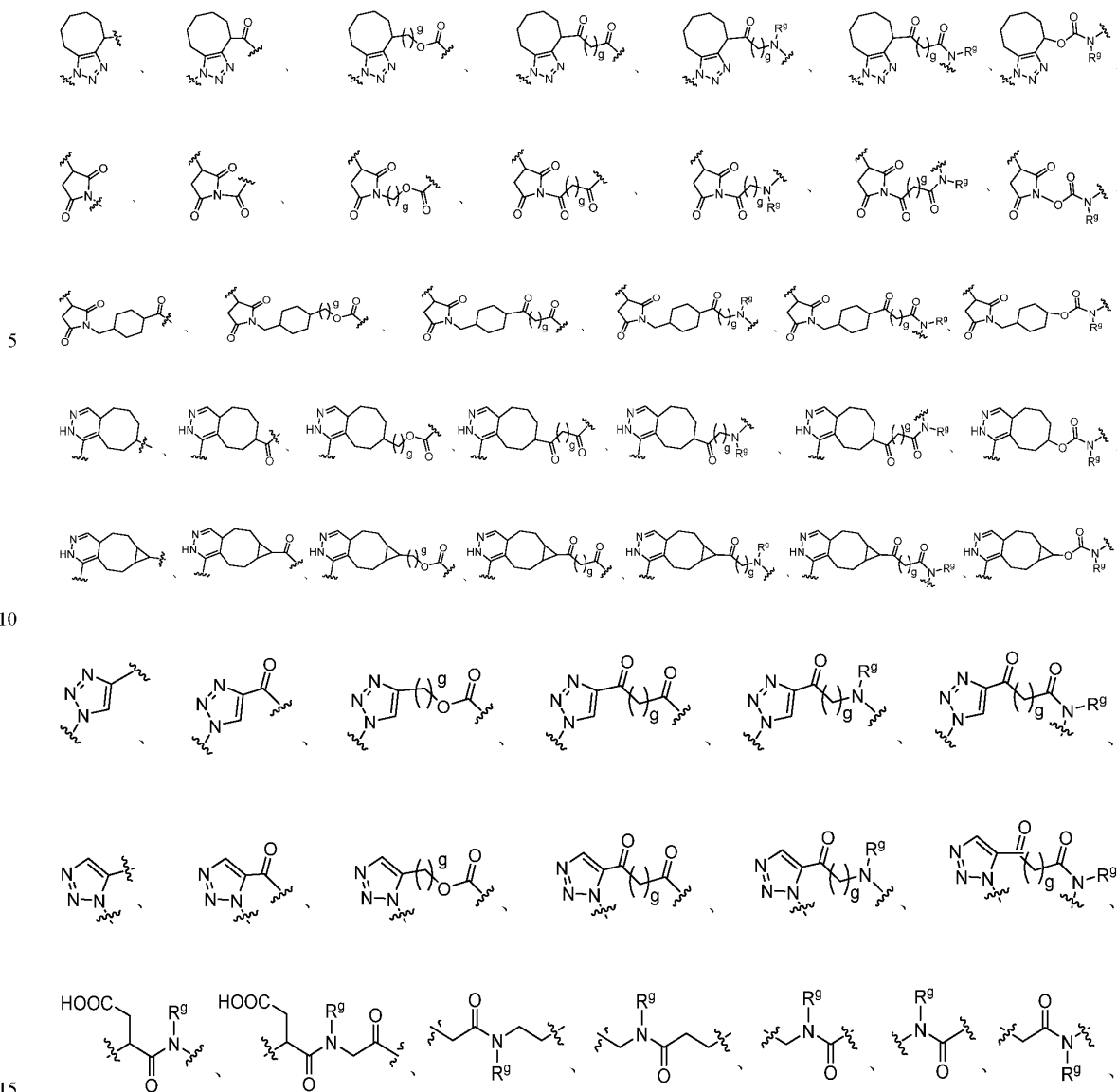
在一些实施方案中, 本公开所述多肽 E 与小分子 D 可借助于以下方式进行偶联: (a) 硫脲连接(即, $-\text{NH}(\text{C}=\text{S})\text{NH}-$)于 E 的赖氨酸; (b) 氨基甲酸酯连接(即, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$)于 E 的赖氨酸; (c) 在赖氨酸与 E 之间通过还原胺化实现的胺连接(即, $-\text{NHCH}_2-$); (d) 酰胺(即, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$)于 E 的赖氨酸; (e) 端基中的马来酰亚胺至 E 的半胱氨酸之间的半胱氨酸-马来酰亚胺结合; (f) 在端基与 E 的碳水化合物(例如, Fc 单体、Fc 结构域、Fc 结合肽、白蛋白或白蛋白结合结构域的糖基)之间通过还原胺化实现的胺连接(即, $-\text{NHCH}_2-$); (g) 再桥接半胱氨酸结合, 其中所述端基偶联于 E 的两个半胱氨酸; (h) 在端基与 E 的碳水化合物(例如, Fc 单体、Fc 结构域、Fc 结合肽、白蛋白或白蛋白结合结构域的糖基)之间的胍连接; (i) 在端基与 E 的氨基酸残基之间的胍连接; (j) 在端基与 E 之间的叠氮基连接; (k) 端基直接酰化为 E; 或(l)在端基与 E 之间的硫醚连接。

在一些实施方案中, 通过活性酯等(例如硝基苯酯或 N-羟基丁二酰亚胺酯或其衍生物(例如, 官能化 PEG 接头(例如, 叠氮基-PEG₂-PEG₄₀-NHS 酯)缀合于 E。在这些情况下, E-(PEG₂-PEG₄₀)-叠氮化物可经由点击缀合于具有末端炔接头的中间体反应。在点击缀合期间, 经催化的叠氮化物(例如, Fc-(PEG₂-PEG₄₀)-叠氮化物)与中间体的末端炔基反应形成 5 元杂原子环。

在一些实施方案中, L₁ 可包含如下直接或间接地与 E 连接的反应基团 G_x,



5



或；g 各自独立地选自 0、1、2、3、4； R^g 各自独立地选自氢或甲基。

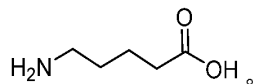
在一些实施方案中， L_1 与 E 形成 E- L_1 -结构， L_1 选自 $-G_{a1}-(CH_2)_{wa1}-[Y_{a1}-CH_2(CH_2)_{xa2}]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-G_{a2}-(CH_2)_{wa3}-[Y_{a2}-CH_2(CH_2)_{xa4}]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-G_{a3}-$ ，其中 $xa1$ 、 $xa3$ 各自独立地选自 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数， $xa2$ 、 $xa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2， $wa1$ 、 $wa2$ 、 $wa3$ 、 $wa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数， Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ，例如 O， G_{a1} 选自基团 G_x ， G_{a2} 、 G_{a3} 各自独立地选自基团 G_x 或不存在。

在一些实施方案中， L_1 选自 $-G_{a1}-(CH_2)_{wa1}-[O-CH_2CH_2]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-G_{a2}-(CH_2)_{wa3}-[O-CH_2CH_2]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-G_{a3}-$ 。

在一些实施方案中，连接子包含氨基酸单元，所述氨基酸单元例如包含由 2 至 7 个选自

苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、高赖氨酸、n-

甲基-缬氨酸、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_q\text{COOH}$ (q 为 1-6 的整数) 的氨基酸构成的肽残基, 示例性氨基酸单元包括但不限于缬氨酸-瓜氨酸(Val -Cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(Ala-Phe); 苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Lys)、苯丙氨酸-高赖氨酸(Phe-Homolys)、n-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-Val-Cit)、丙氨酸-丙氨酸(Ala-Ala)、甘氨酸-谷氨酸(Gly-Glu)、谷氨酸-丙氨酸-丙氨酸(Glu-Ala-Ala)和甘氨酸-赖氨酸(Gly-Lys)、甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glv-Val-Cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Gly)、



在一些实施方案中, 分支部分 L_3 包含与 D 连接的端基 G_{c1} , 形成 $-G_{c1}-D$ 结构。所述端基 G_{c1} 可选自 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{S})-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$ 或化学键, 其中 R_6 选自氢和 C_1 - C_6 烷基, 例如自 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{S})-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 和 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$ 。

在一些实施方案中, L_3 为 $-(\text{CH}_2)_{w_{c1}}-[\text{Y}_{c1}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{x_{c2}}]_{x_{c1}}-(\text{CH}_2)_{w_{c2}}-G_{c1}-$,

其中, x_{c1} 各自独立地为 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10,

x_{c2} 各自独立地为 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2,

Y_{c1} 各自独立地选自 O 或 CH_2 , 例如 O,

w_{c1} 、 w_{c2} 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 0、1、2 或 3,

G_{c1} 各自独立地选自 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{S})-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$ 或化学键, 其中 R_6 选自氢和 C_1 - C_6 烷基, 例如自 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{S})-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-$ 和 $-\text{NR}_6(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2-$;

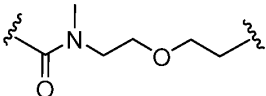
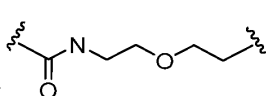
m 为 3 或 4。

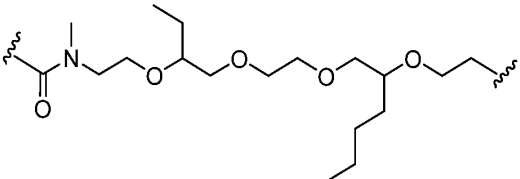
在一些实施方案中, L_3 为 $-(\text{CH}_2)_{w_{c1}}-[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_{x_{c1}}-(\text{CH}_2)_{w_{c2}}-G_{c1}-$ 。

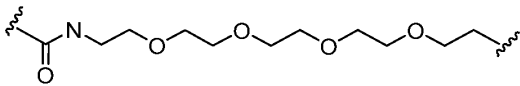
在一些实施方案中, x_{c1} 各自独立地为 2 至 30 的整数, 例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在一些实施方案中, L_3 主链的原子个数大于 7, 例如大于 8, 例如大于 9, 例如 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 或它们之间任意的数值范围, 例如 8-30, 或 8-20。

所述的 L_3 主链的原子个数, 可以理解为从基团 $-(\text{CH}_2)_{w_{c1}}$ 至基团 $-G_{c1}-$ 之间的直链部分的

原子个数。例如, 若 L_3 为 , 则主链为 , 主链原

子个数为 7; 若 L_3 为 , 则主链为

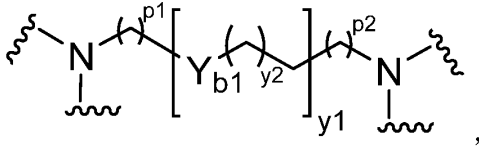


，主链原子个数为 16。

在一些实施方案中， $-L(-D)_m$ 为 $-L_1-L_2(-L_3-D)_m$ ，其中，

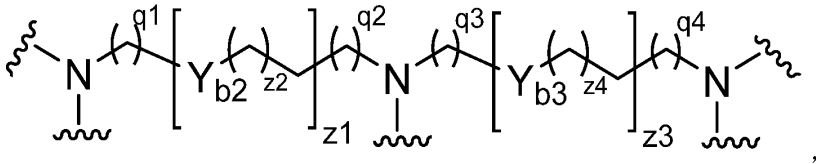
L_1 为与 E 连接的部分， L_1 选自 $-Ga_1-(CH_2)_{wa1}-[Y_{a1}-CH_2(CH_2)_{xa2}]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-Ga_2-(CH_2)_{wa3}-[Y_{a2}-CH_2(CH_2)_{xa4}]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-Ga_3-$ ，其中，

- 5 xa_1 、 xa_3 各自独立地选自 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，
 xa_2 、 xa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，
 wa_1 、 wa_2 、 wa_3 、 wa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 0、1、2，
 Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ，例如 O，
 G_{a1} 选自基团 G_x ， G_{a2} 、 G_{a3} 各自独立地选自基团 G_x 或不存在； G_x 如前所述；
10 L_2 选自



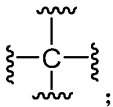
其中， y_1 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、
8、9 或 10，

- y_2 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，
15 Y_{b1} 选自 O 或 CH_2 ，例如 O，
 p_1 、 p_2 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2；或



其中， z_1 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、
8、9 或 10，

- 20 z_2 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，
 Y_{b2} 选自 O 或 CH_2 ，例如 O，
 z_3 为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或
10，
 z_4 为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，
25 Y_{b3} 选自 O 或 CH_2 ，优选 O，
 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数；或



L_3 为 $-(CH_2)_{wc1}-[Y_{c1}-CH_2(CH_2)_{xc2}]_{xc1}-(CH_2)_{wc2}-G_{c1}-$ ，

其中 xc1 各自独立地为 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10，

xc2 各自独立地为 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，

Y_{c1} 各自独立地选自 O 或 CH₂，例如 O，

5 wc1、wc2 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 0、1、2 或 3，

G_{c1} 各自独立地选自 -NR₆(C=O)-、-NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-、-NR₆(C=O)CH₂-或化学键，其中 R₆ 选自氢和 C₁-C₆ 烷基，例如自 -NR₆(C=O)-、-NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-和 -NR₆(C=O)CH₂；

m 为 3 或 4。

10 在一些实施方案中，xc1 各自独立地为 2 至 30 的整数，例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30，或它们之间任意的数值范围，例如 2-20 等。

在一些实施方案中，L₃ 主链的原子个数大于 7，例如大于 8，例如大于 9，例如 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30，或它们之间任意的数值范围，例如 8-30，或 8-20。在一些实施方案中，n 为 1-15 之间的任意数值，例如 2-12 之间的任意数值。n 可以为整数，也可以为小数。

在一些实施方案中，E 包含半衰期延长结构域；例如，所述 E 选自 Fc 结构域、白蛋白或白蛋白结合结构域。

在一些实施方案中，Fc 结构域为单体或二聚体。在一些实施方案中，Fc 结构域是 Fc 结构域单体，其包括 C_{H2} 抗体恒定结构域及 C_{H3} 抗体恒定结构域的至少一部分。在一些实施方案中，所述 Fc 结构域单体可具有免疫球蛋白抗体同型 IgG、IgE、IgM、IgA 或 IgD。所述 Fc 结构域单体也可具有任何免疫球蛋白抗体同型(例如，IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 或 IgG4)。所述 Fc 结构域单体可具有任何免疫球蛋白抗体同种异型(例如，IGHG1*01(即，G1m(za))、IGHG1*07(即，G1m(zax))、IGHG1*04(即，G1m(zav))、IGHG1*03(G1m(f))、IGHG1*08(即，G1m(fa))、IGHG2*01、IGHG2*06、IGHG2*02、IGHG3*01、IGHG3*05、IGHG3*10、IGHG3*04、IGHG3*09、IGHG3*11、IGHG3*12、IGHG3*06、IGHG3*07、IGHG3*08、IGHG3*13、IGHG3*03、IGHG3*14、IGHG3*15、IGHG3*16、IGHG3*17、IGHG3*18、IGHG3*19、IGHG2*04、IGHG4*01、IGHG4*03 或 IGHG4*02)。所述 Fc 结构域单体也可属任何物种，例如人、鼠科动物或小鼠。Fc 结构域单体的二聚体系可结合于 Fc 受体的 Fc 结构域，所述 Fc 受体系位于白细胞表面上的受体。在一些实施方案中，Fc 结构域包括铰链结构域；在一些实施方案中，Fc 结构域不包括铰链结构域。

在一些实施方案中，本公开所述的 Fc 结构域包括通过 C_{H3} 抗体恒定结构域之间的相互作用二聚化的两个 Fc 结构域单体，以及在两种二聚化 Fc 结构域单体的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键。在一些实施方案中，两个 Fc 结构域单体可以相同或不同。Fc 结构域包含能结合 Fc 受体，例如 Fc-γ 受体(即，Fcγ 受体(FcγR))、Fc-α 受体(即，Fcα 受体(FcαR))、Fc-ε 受体(即，Fcε 受体(FcεR))及/或新生儿 Fc 受体(FcRn)的最小结构。在一些实施方案中，本公开所述的 Fc 结构域结合 Fcγ 受体(例如，FcRn、FcγRI(CD64)、

FcγRIIa(CD32)、FcγRIIb(CD32)、FcγRIIIa(CD16a)、FcγRIIIb(CD16b))及/或 FcγRIV 及/或新生儿 Fc 受体(FcRn)。

在一些实施方案中，Fc 结构域包括天然的 Fc 区，或相对于天然 Fc 区具有一处或多处改变的 Fc 区变体。改变可以包括氨基酸取代、添加和/或缺失、附加部分的连接和/或天然聚糖的改变。在一些实施方案中，Fc 结构域还涵盖单链 Fc 区，其中组成 Fc 结构域通过接头部分连接在一起。

在一些实施方案中，本公开所述的 Fc 结构域为无糖基化 Fc 结构域 (例如，维持能结合 Fc 受体(例如，FcRn)的 Fc 结构域。例如，所述 Fc 结构域是维持能结合 Fc 受体的无糖基化 IgG1 变体(例如，在糖基化基序的 N297 及/或 T299 处具有氨基酸取代的 IgG1)。示例性无糖基化 Fc 结构域及用于制备无糖基化 Fc 结构域的方法为本领域中已知的。

本公开所述的 Fc 结构域可选自抗体。

抗体包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段以及包含抗体 CDR、VH 结构域(VH)或 VL 结构域(VL)的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异源偶联抗体、抗体-药物偶联物、单域抗体(sdAb)、单价抗体、单链抗体或单链 Fv (scFv)、骆驼抗体、亲和体分子、VHH 片段、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、二硫键连接的 Fv(sdFv)、以及上述任何抗体的抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗体为人、小鼠、骆驼科动物(例如，美洲驼、羊驼或骆驼)、山羊、绵羊、兔、鸡、豚鼠、仓鼠、马或大鼠抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，所述抗体为 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM。在一些实施方案中，所述抗原结合片段包括 Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体 (例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段。

在一些实施方案中，所述抗体对一种或多种靶标(例如，抗原)赋予结合特异性。

在一些实施方案中，由抗体结合的所述一种或多种靶标(例如，抗原)为病毒(例如，流感)蛋白，诸如神经氨酸酶或血球凝集素。在一些实施方案中，所述抗体或抗体片段识别病毒表面抗原。在一些实施方案中，所述抗体靶向血球凝集素。血球凝集素靶向抗体包括单株抗体，诸如 CR6261、CR8020、MEDI8852、MHAA4549A 及 VIS410。在一些实施方案中，所述抗体是靶向流感血球凝集素的广泛中和抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，所述抗体靶向病毒基质蛋白(例如，基质 2 蛋白)。TCN032 为基质 2 蛋白靶向性单株抗体。在一些实施方案中，所述抗体靶向人血清白蛋白。

在一些实施方案中，所述抗体包括一种或多种单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中，所述含 Fc 结构域组合物为如下抗体或抗体片段，其包括具有流感 A 反应性的 sdAb，诸如缀合于流感 A 的血球凝集素的 sdAb。在一些实施方案中，所述抗体包括具有流感 B 反应性的 sdAb，诸如缀合于流感 B 的血球凝集素的 sdAb。

在一些实施方案中，所述抗体是包括 2 种或 2 种以上(例如，2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 种或 10 种以上)sdAb 的多结构域抗体(MDAb)或多结构域抗体片段。在一些实施方案中，所述 MDAb 或其片段包括缀合于流感 A 的血球凝集素的一种或多种 sdAB，及缀合于流感 B 的血球凝集素的一种或多种 sdAb。

5 在一些实施方案中，所述 Fc 结构域具有增强的效应子功能，例如，所述效应子功能选自：C1q 结合和依赖补体的细胞毒性、Fc 受体(例如 Fc γ R)结合、依赖抗体的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如 B 细胞受体)的下调和 B 细胞激活。

在一些实施方案中，Fc 结构域可以是如下序列：

(I) 如 SEQ ID NO: 1 所示或与 SEQ ID NO: 1 具有至少 70%、80%、90%、95%、
10 98%或 99%同一性的序列；或

(II) 如 SEQ ID NO: 2 所示或与 SEQ ID NO: 2 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；

(III) 如 SEQ ID NO: 3 所示或与 SEQ ID NO: 3 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；或

15 (IV) 如 SEQ ID NO: 4 所示或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；或

(V) 如 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 2 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；

(VI) 如 SEQ ID NO: 6 所示或与 SEQ ID NO: 3 具有至少 70%、80%、90%、95%、
20 98%、或 99%同一性的序列；或

(VII) 如 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；或，

(VIII) 如 SEQ ID NO: 8 所示或与 SEQ ID NO: 8 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列。

25 在一些实施方案中，Fc 结构域为抗体。示例性的，所述抗体包括重链和轻链。示例性地，所述重链包含如 SEQ ID NO: 9 所示或与 SEQ ID NO: 9 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列；所述轻链包含如 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 具有至少 70%、80%、90%、95%、98%、或 99%同一性的序列。

30 所有突变根据 EU numbering 系统命名编号，粗体下划线为具体突变位点。

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446)，带有 C220S、M252Y、S254T、T256E 突变

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
35 TVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 1

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、H268C、L443C 突变

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSC~~ED~~P
5 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS~~C~~SPG
SEQ ID NO: 2

10 >人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、K290C、L443C 突变

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTK~~C~~PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
15 TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS~~C~~SPG
SEQ ID NO: 3

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、L398C、L443C 突变

20 NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV~~C~~DSGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS~~C~~SPG
SEQ ID NO: 4

25

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、T223Y、P329Y 突变

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DK~~Y~~YHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL~~Y~~YAPIEKTISK
30 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 5

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、P329Y 突变, 并在 C 端添加 GGGGY 序列

35 NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL~~Y~~YAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGY
40 SEQ ID NO: 6

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220S、M252Y、S254T、T256E、T223Y 突变, 并在 C 端添加 GGGGY 序列

NVNHKPSNTKVDKKVEPKS~~S~~DK~~Y~~YHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLY~~I~~ITREPEVTCVVVDVSHED

PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGY

SEQ ID NO: 7

5

>人源 IgG1 Fc 片段 (Asn201-Gly446), 带有 C220A、M252Y、S254T、T256E 突变

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

SEQ ID NO: 8

>hIgG 抗体重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNSWIGWFRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEIFKGKAT
MTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRGPYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

SEQ ID NO: 9

>hIgG 抗体轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSLLSGDSQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTGESGVPSRFSG
SGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQNDYSYPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

25

SEQ ID NO: 10

30

在一些实施方案中, 所述白蛋白为人白蛋白, 例如人血清白蛋白。

在一些实施方案中, 所述白蛋白结合结构域为能结合白蛋白的多肽, 或结合白蛋白的结
构域, 例如是抗体或其抗原结合片段(例如, VHH)。

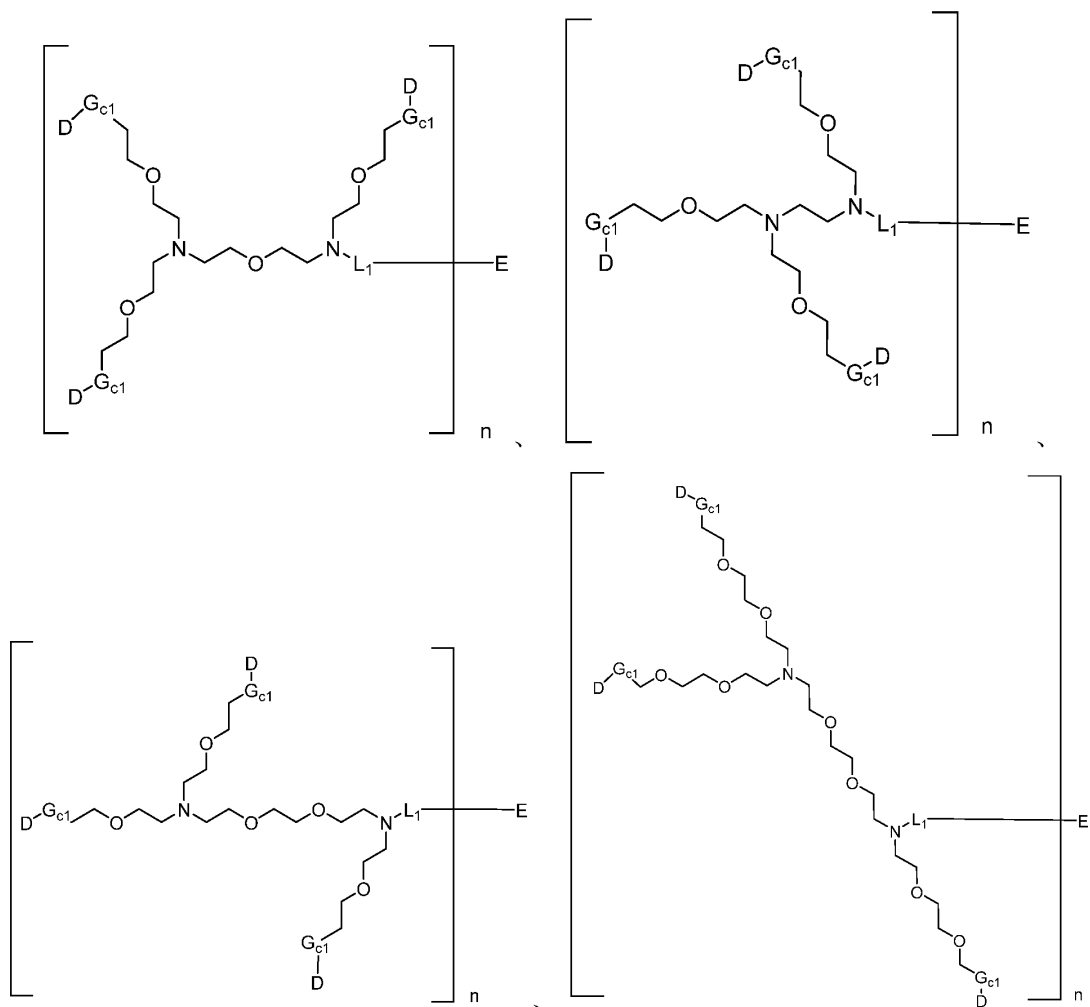
35

在一些实施方案中, 所述白蛋白或白蛋白结合结构域是经修饰的。例如, 经修饰后含有
一个或多个(例如, 2、3、4、5、6、7、8 个)溶剂暴露半胱氨酸(Cys)或赖氨酸(Lys)残基。一
些实施方案中, 修饰方式是氨基酸突变(例如, 取代)。一些实施方案中, 所述白蛋白或白蛋
白结合结构域通过经修饰的或天然存在的 Cys 和/或 Lys 与本公开的化合物(例如, 神经氨酸
酶抑制剂单体或二聚体)缀合。

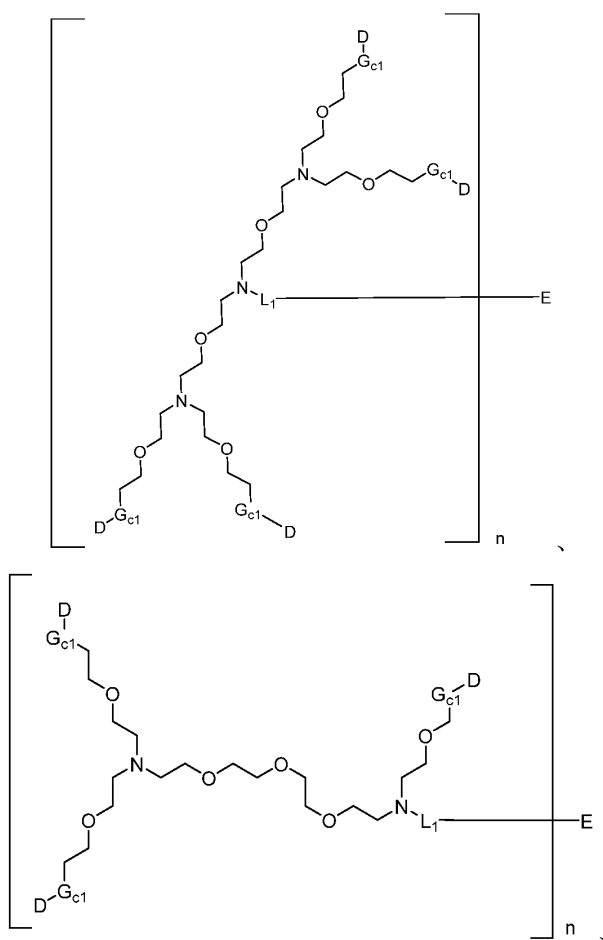
40

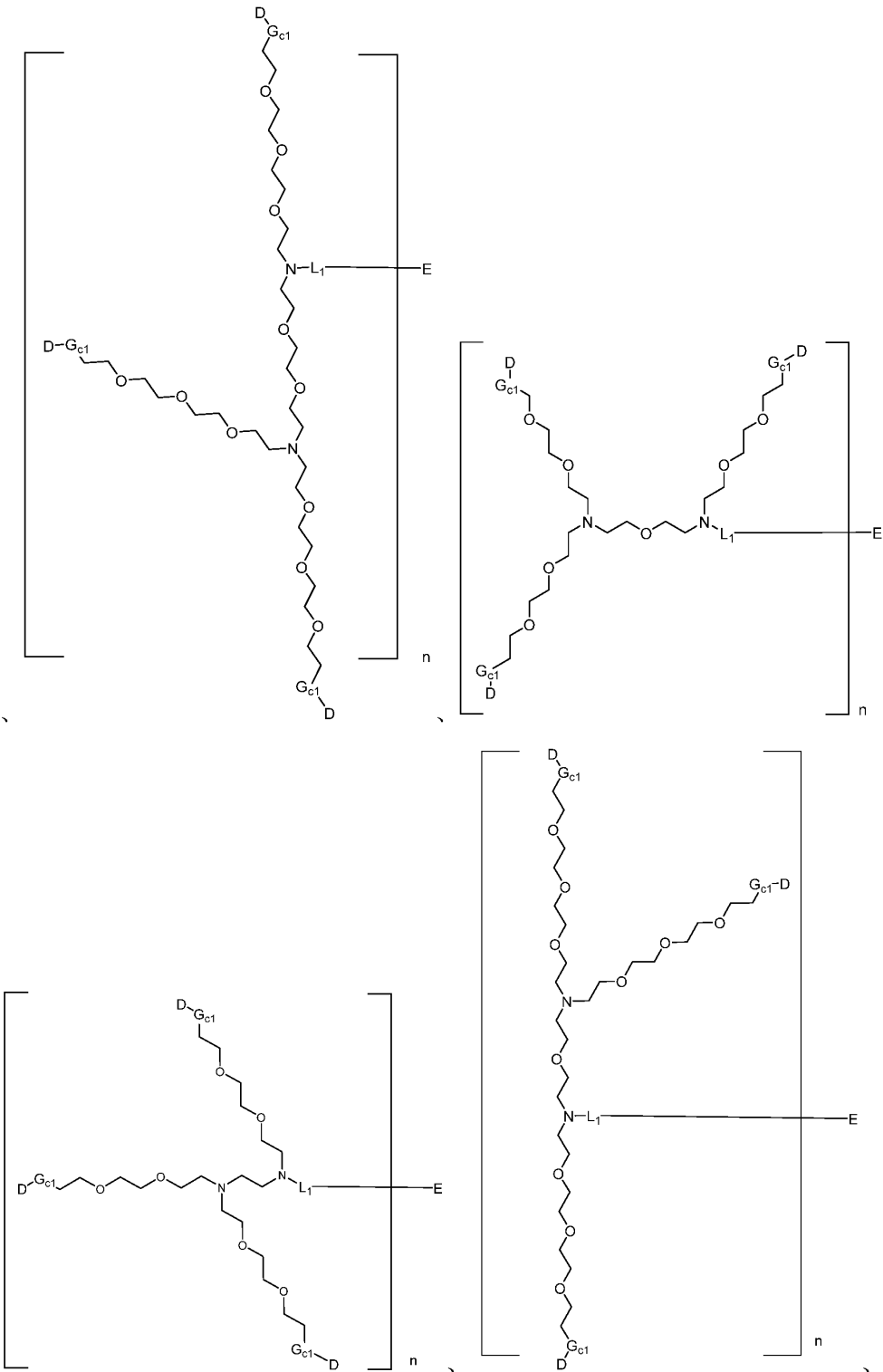
在一些实施方案中, 一个前述本公开的偶联物中可含有一个或多个(例如 2、3、4 个)
蛋白或多肽, 所述蛋白或多肽可以为前述任意本公开的 Fc 结构域、白蛋白或白蛋白结合结
构域。在一些实施方案中, 一个前述本公开的偶联物中可以含有一个或多个(例如 2、3、4
个)相同的蛋白或多肽; 另一些实施方案中, 一个前述本公开的偶联物中可以含有多个(例
如 2、3、4 个)不同的蛋白或多肽。

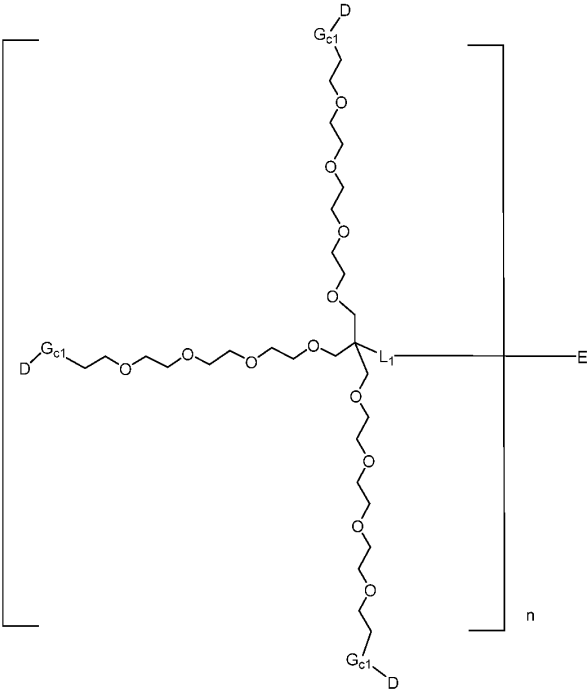
在一些实施方案中，本公开的抗病毒偶联物选自：



14

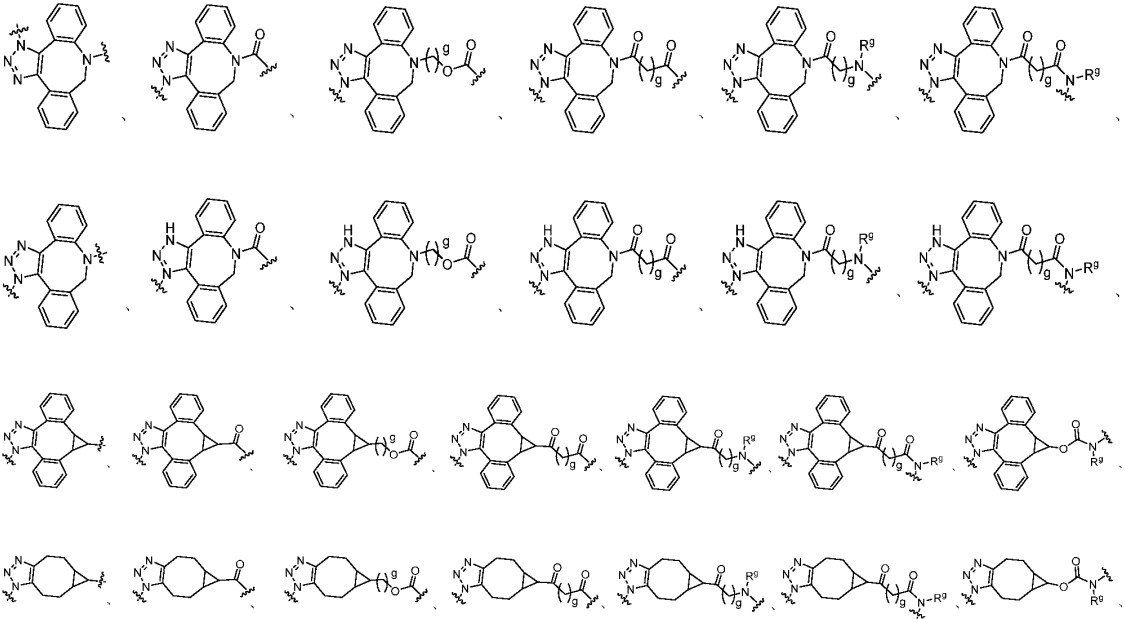






L_1 与 E 形成 $E-L_1$ -结构, L_1 选自 $-G_{a1}-(CH_2)_{wa1}-[Y_{a1}-CH_2(CH_2)_{xa2}]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-G_{a2}-(CH_2)_{wa3}-[Y_{a2}-CH_2(CH_2)_{xa4}]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-G_{a3}-$, 其中 $xa1$ 、 $xa3$ 各自独立地选自 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, $xa2$ 、 $xa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2, $wa1$ 、 $wa2$ 、 $wa3$ 、 $wa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 , G_{a1} 选自基团 G_x , G_{a2} 、 G_{a3} 各自独立地选自基团 G_x 或不存在;

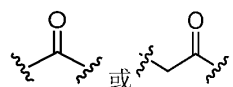
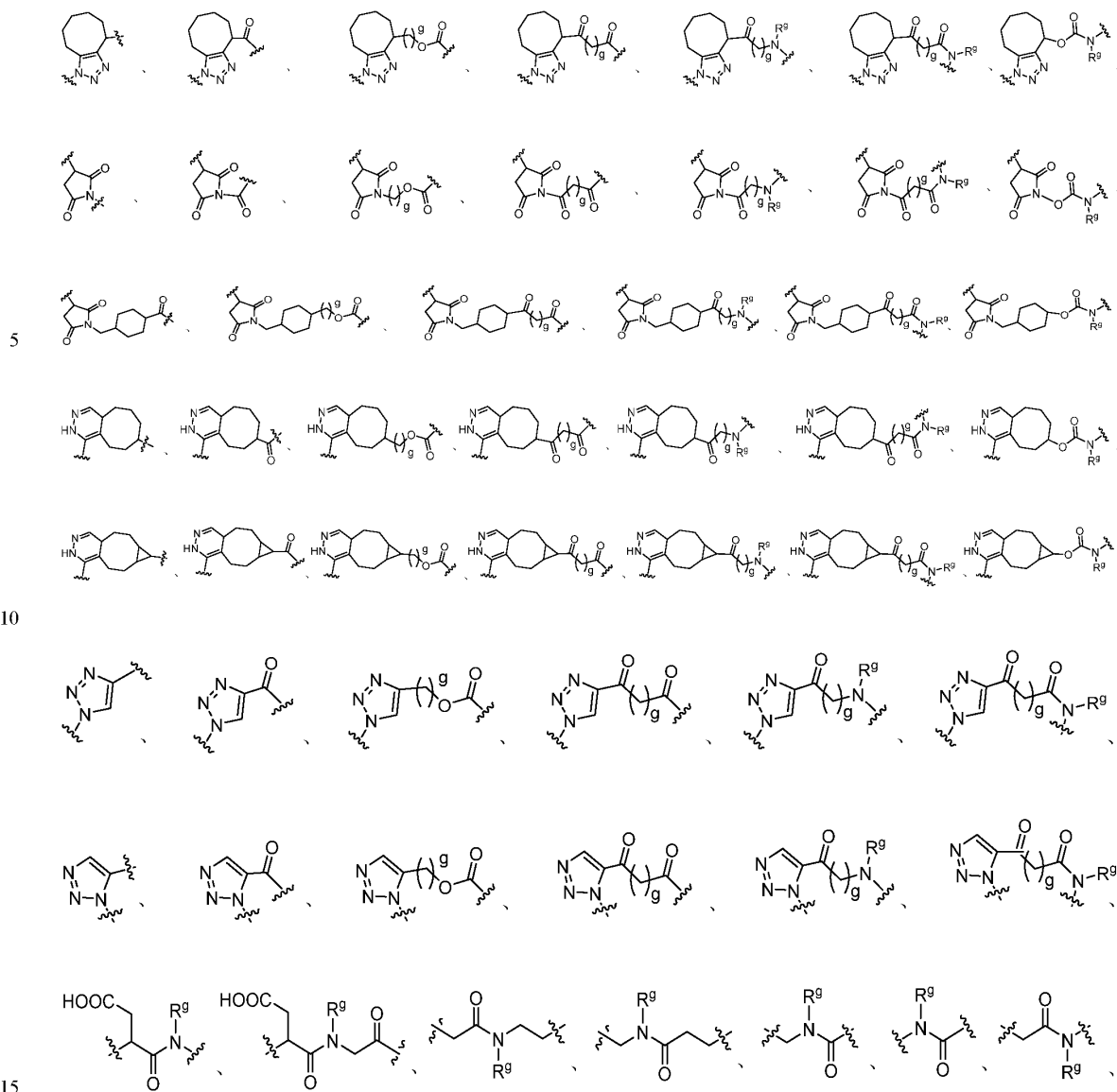
G_x 选自:



10

15

18

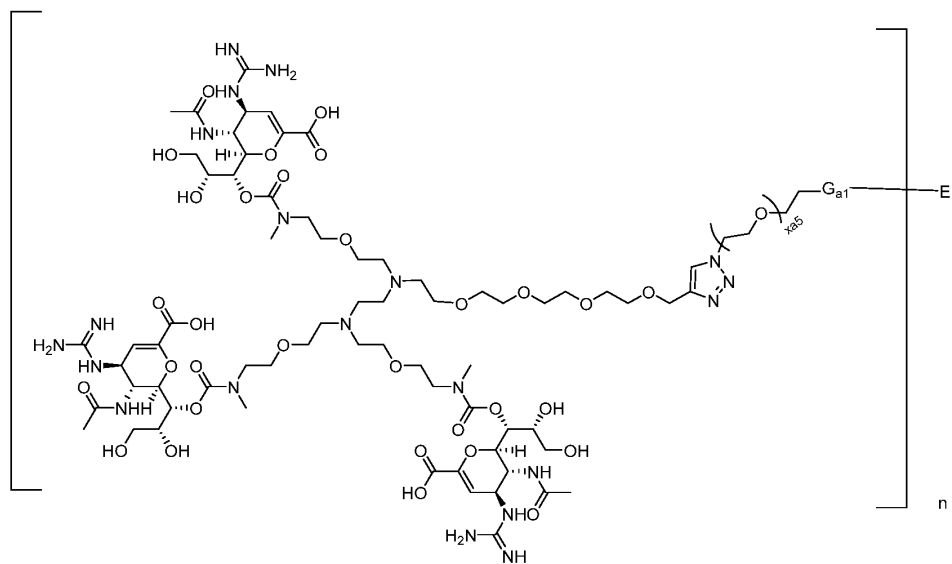
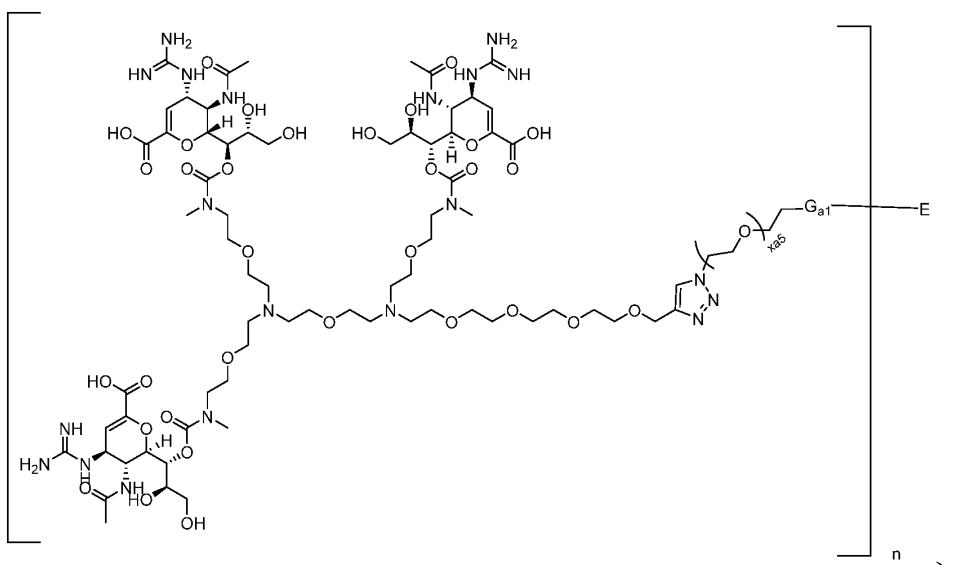


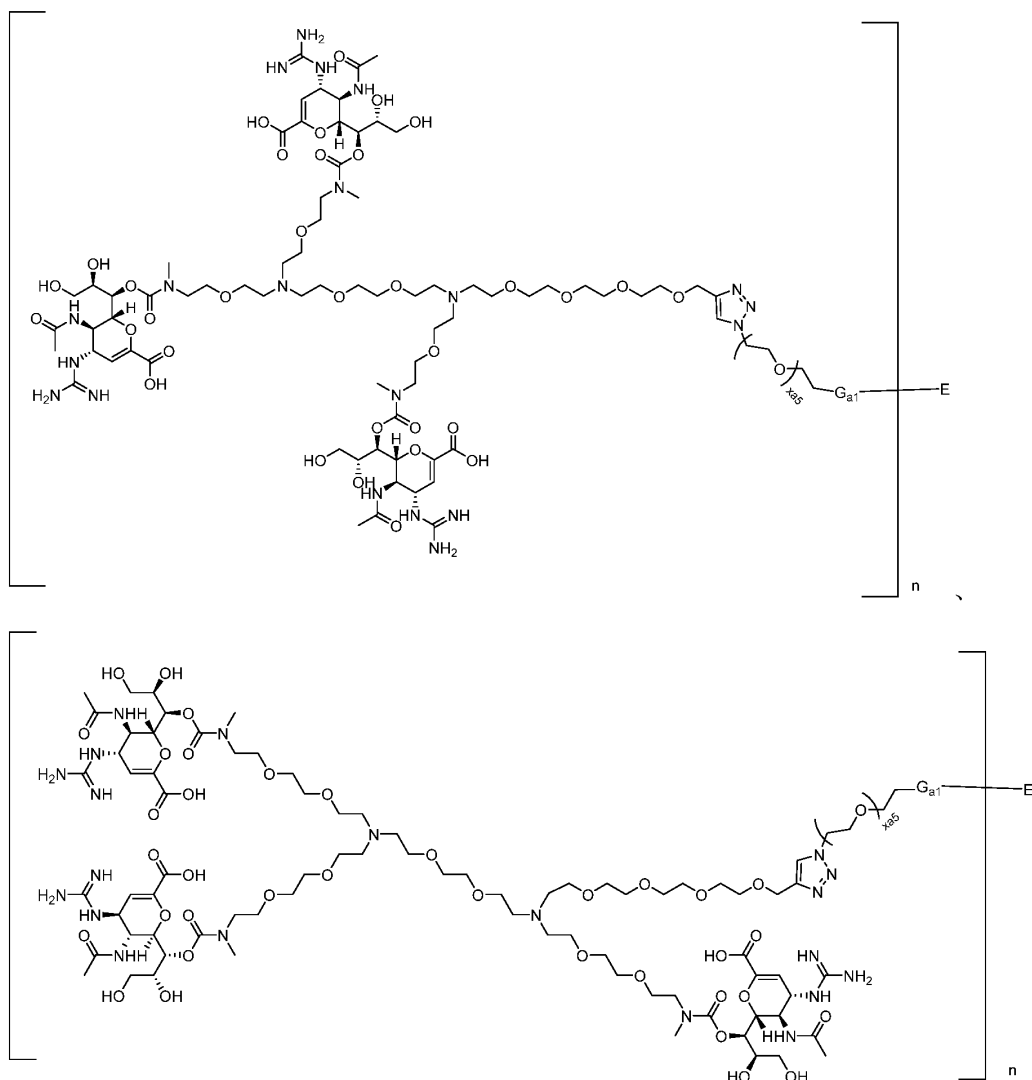
或 ; g 各自独立地选自 0、1、2、3、4；R^g 各自独立地选自氢或甲基；

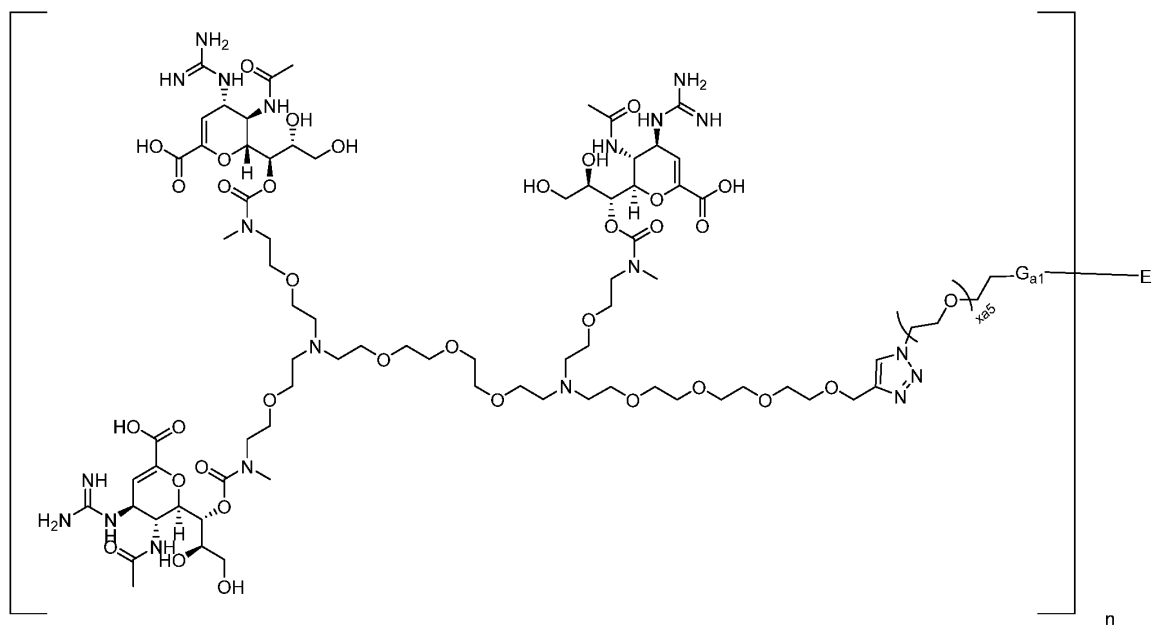
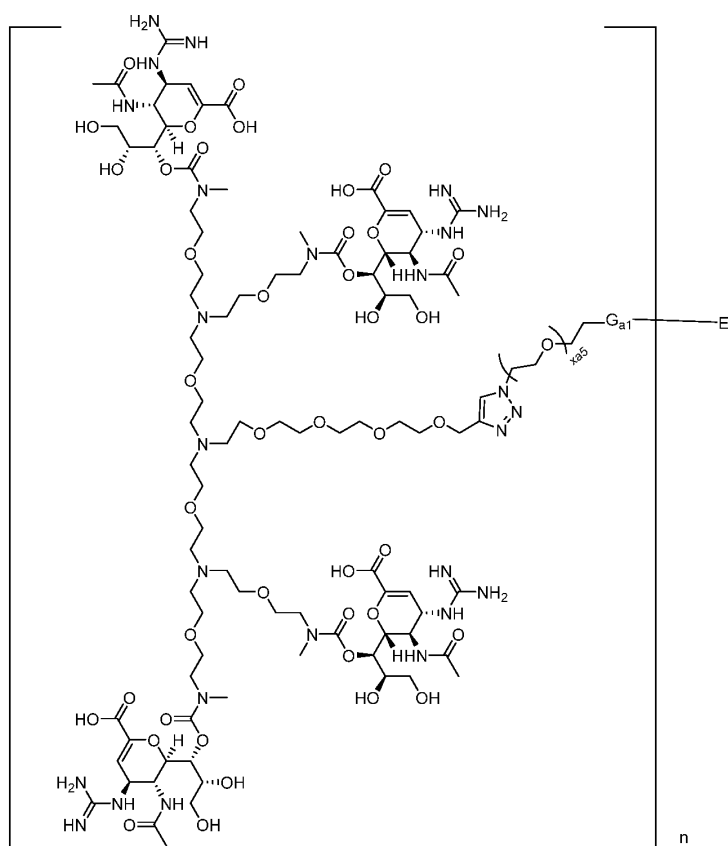
G_{cl} 选自 -NR₆(C=O)-、-NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-和 -NR₆(C=O)CH₂-，其中 R₆ 选自氢和 C₁-C₆ 烷基；

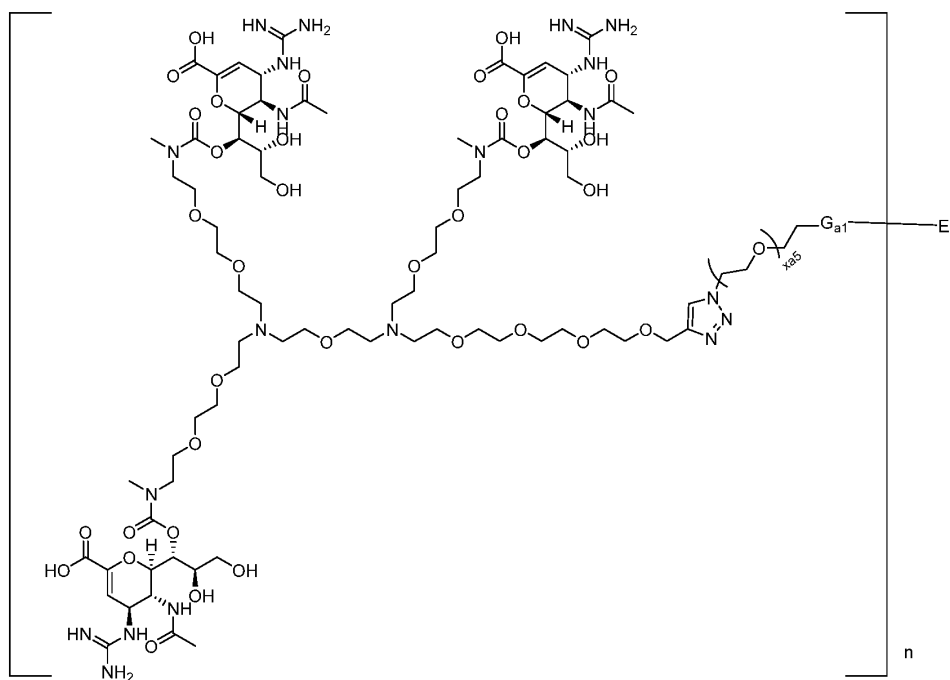
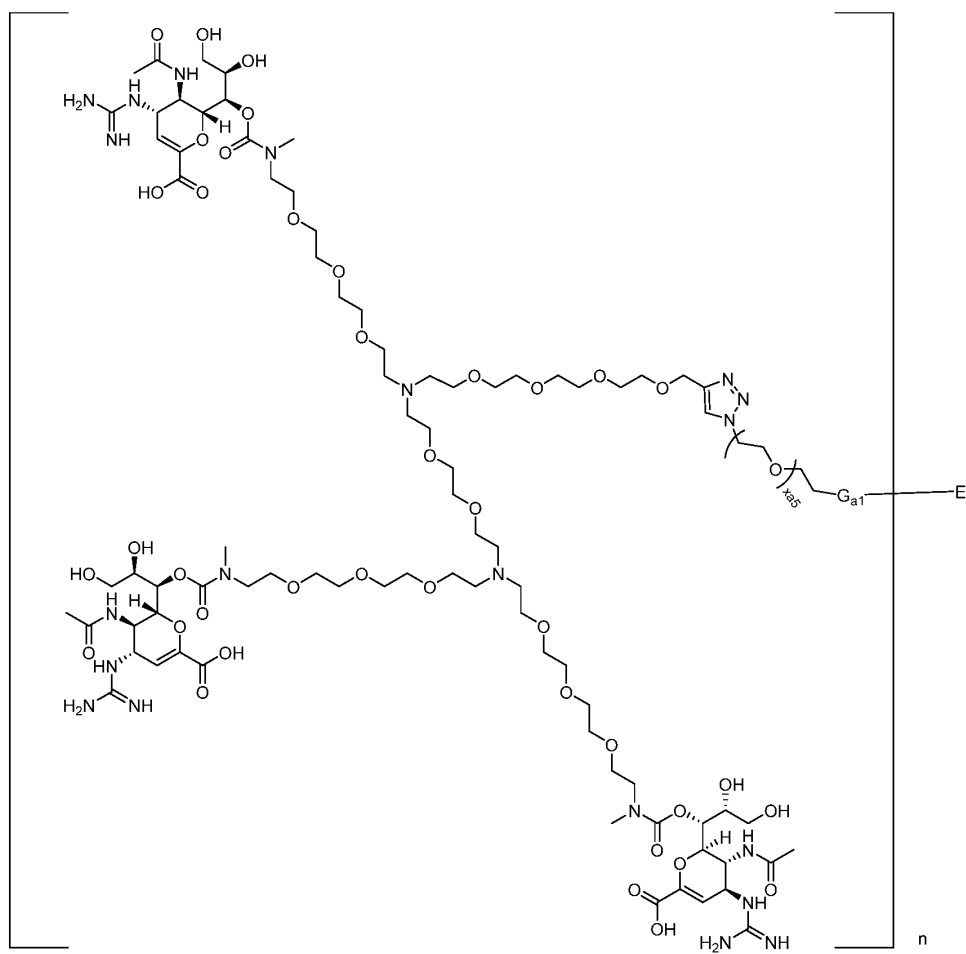
20 n 为 1-15 之间的任意数值。

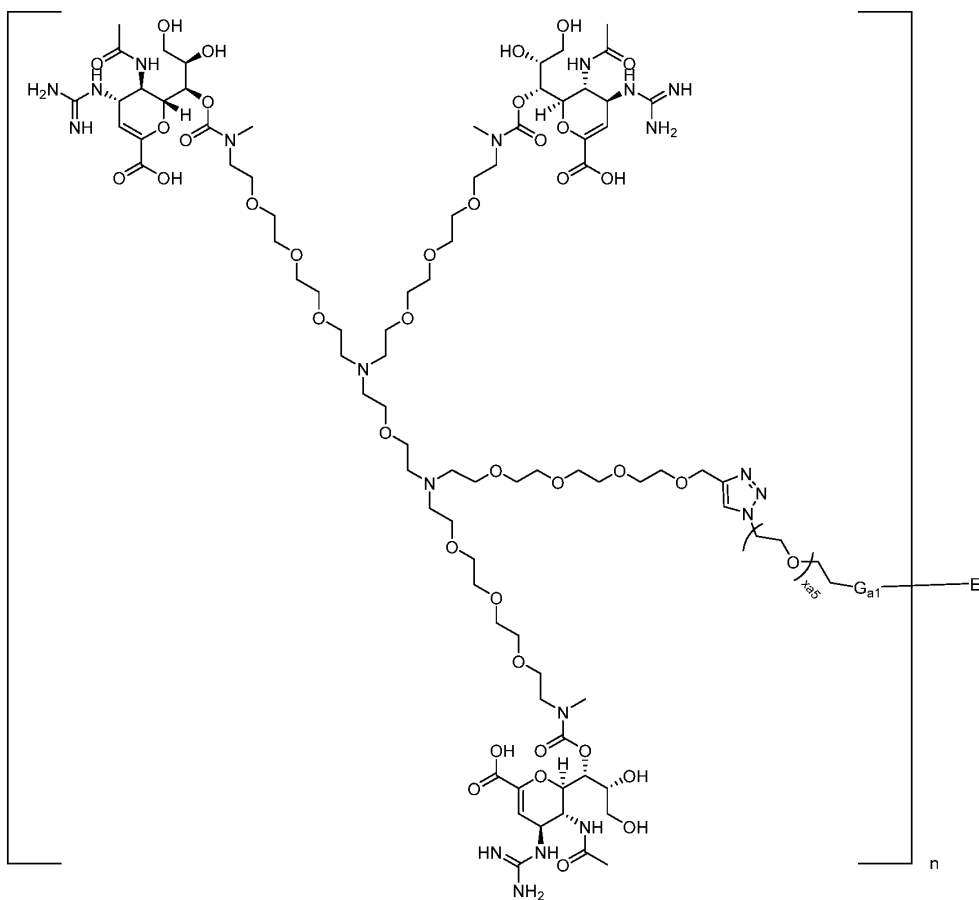
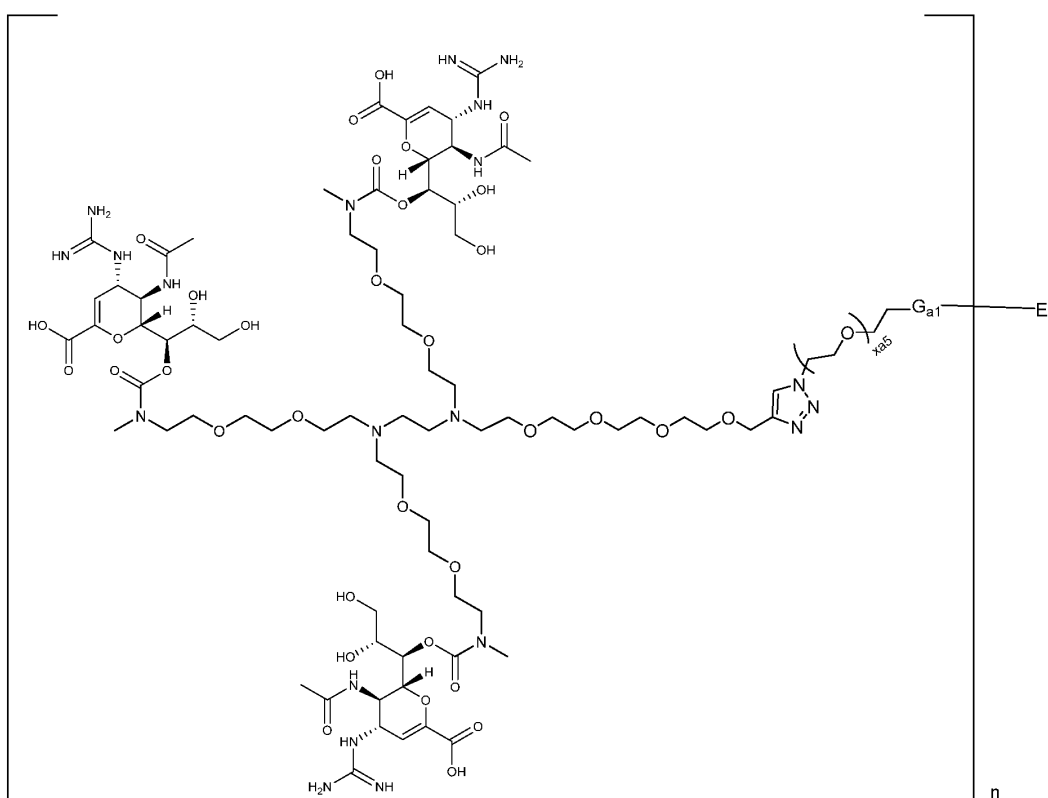
在一些实施方案中，本公开的抗病毒偶联物选自：

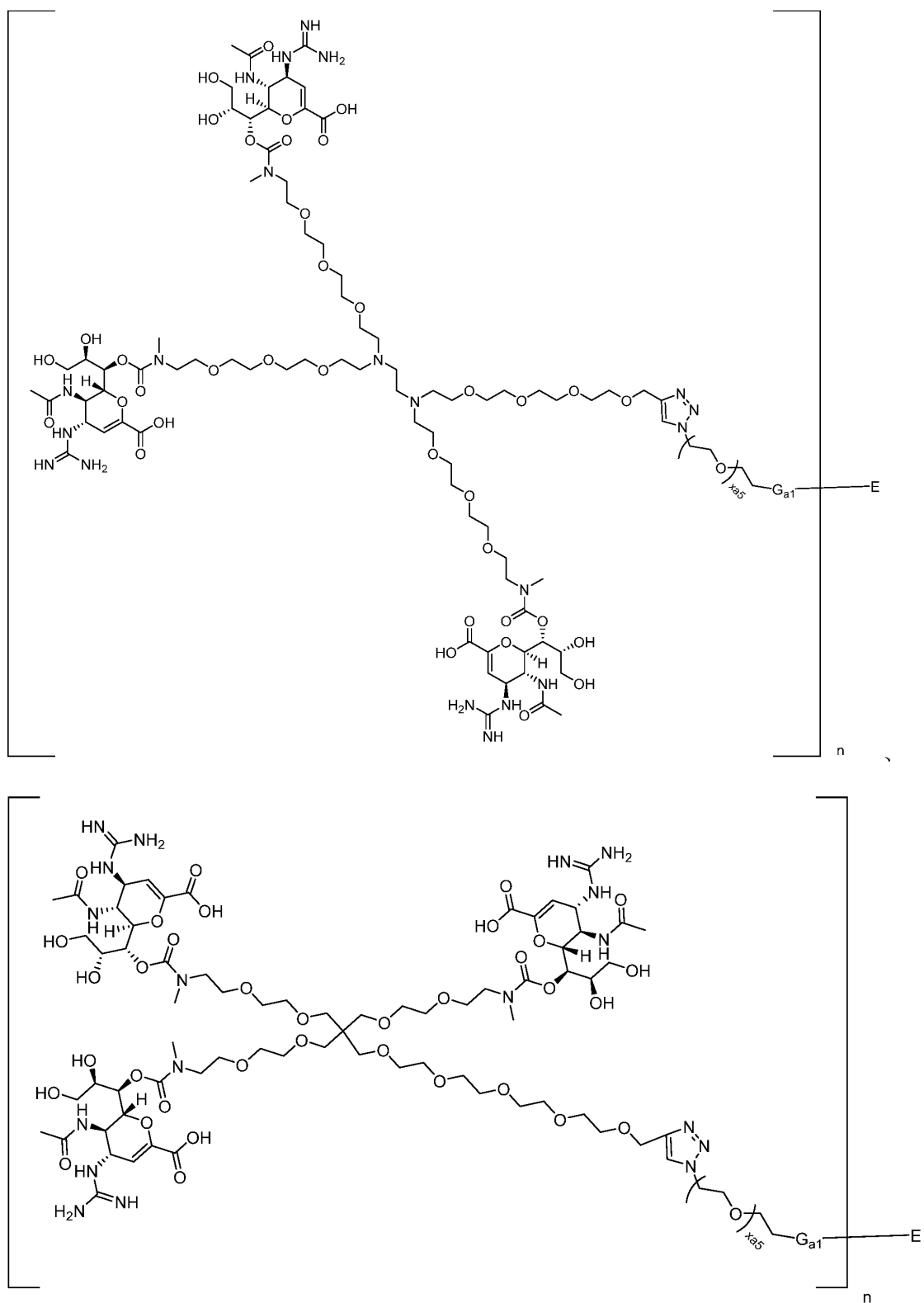


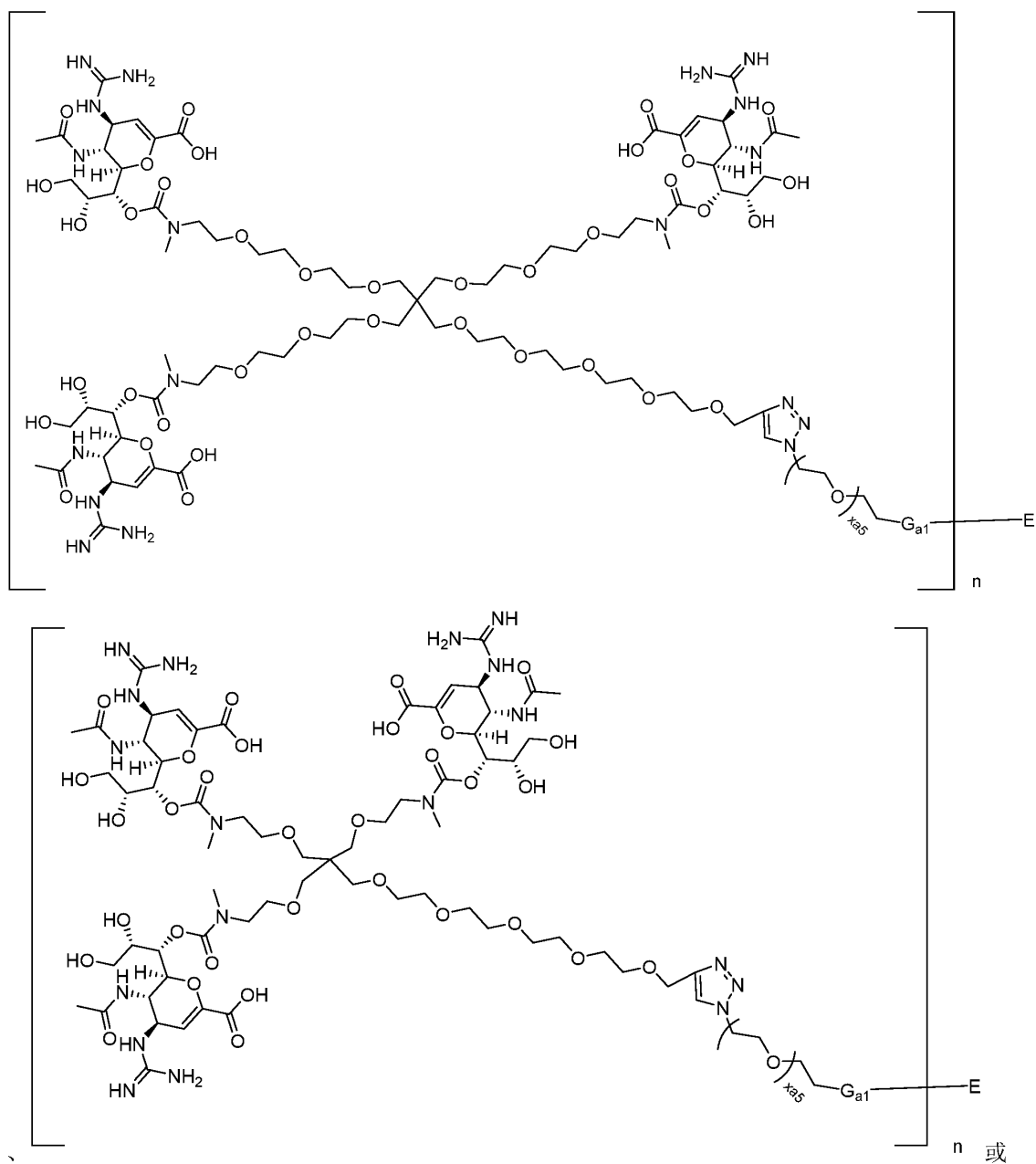


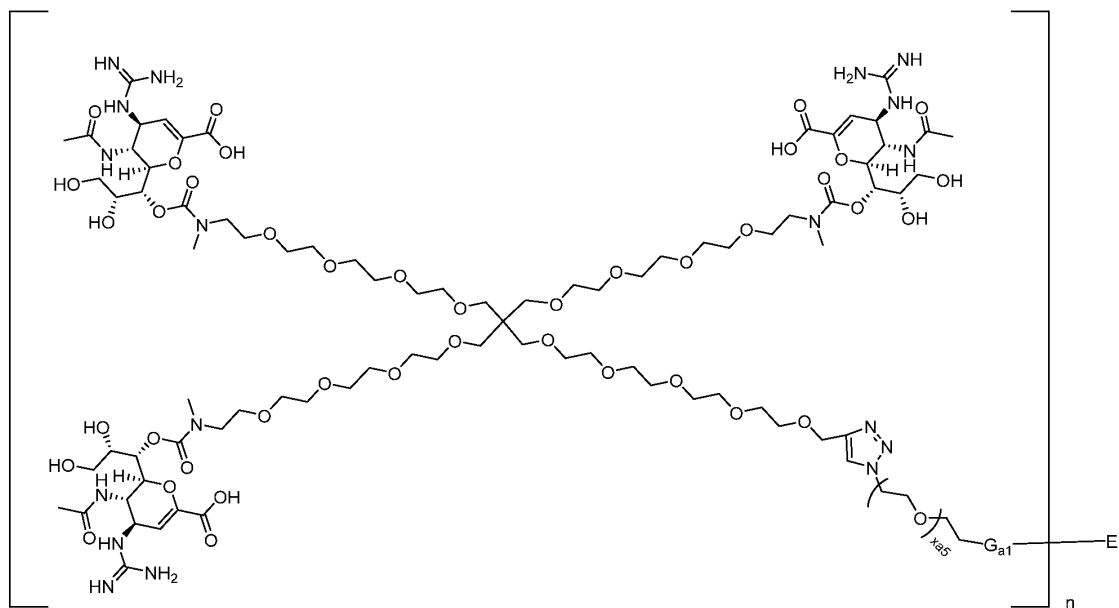








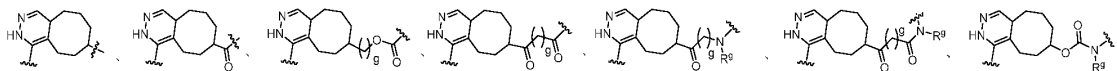
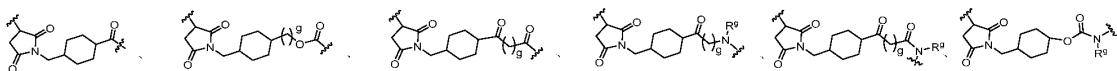
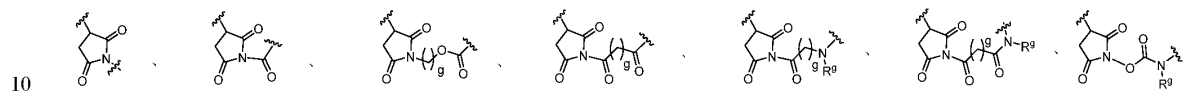
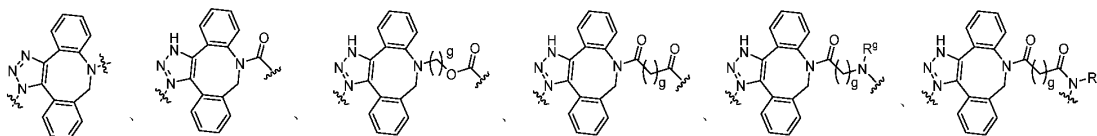
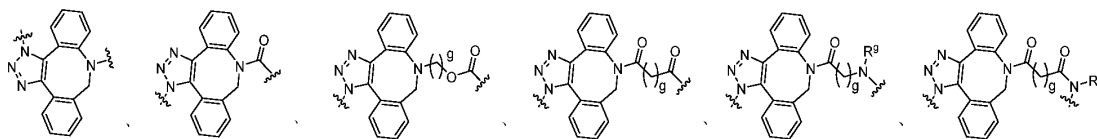




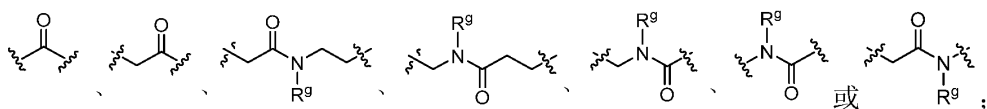
其中,

xa5 各自独立地选自 2-8 之间的整数,

5 Ga1 各自独立地选自



15



g 各自独立地选自 0、1、2、3、4； R^g 各自独立地选自氢或甲基；

n 为 1-15 之间的任意数值。

本公开还提供了一种如下所示的化合物，



其中，

L_1' 选自 $G_X'-(CH_2)_{wa1}-[Y_{a1}-CH_2(CH_2)_{xa2}]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-G_{a2}-(CH_2)_{wa3}-[Y_{a2}-CH_2(CH_2)_{xa4}]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-G_{a3}$ ，其中，

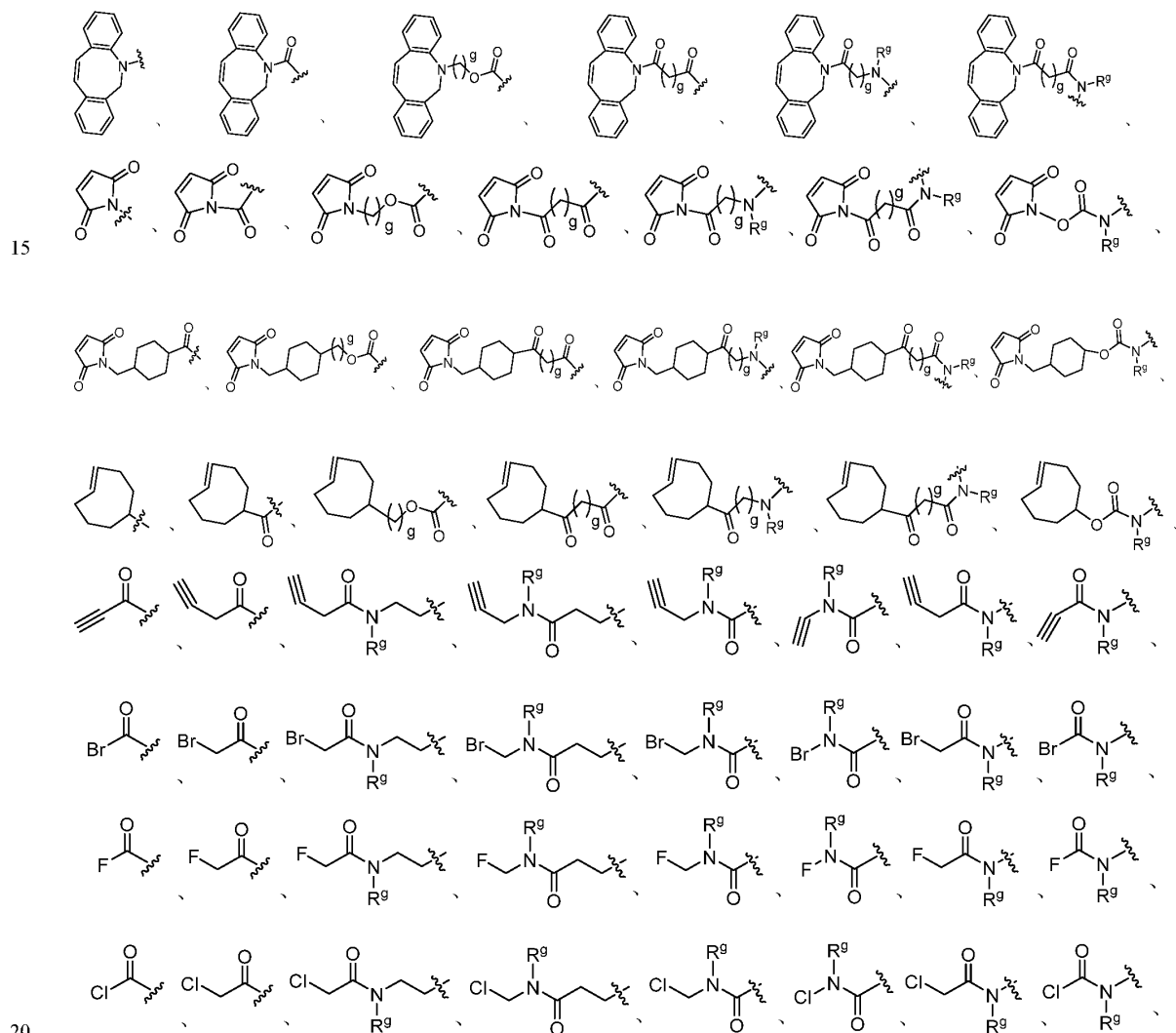
xa_1 、 xa_3 各自独立地选自 0 至 100 的整数，例如 0 至 30 的整数，

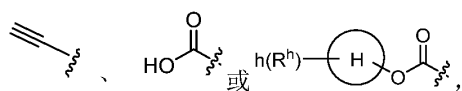
10 xa_2 、 xa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 1 或 2，

wa_1 、 wa_2 、 wa_3 、 wa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，例如 0-6 的整数，例如 0、1、2，

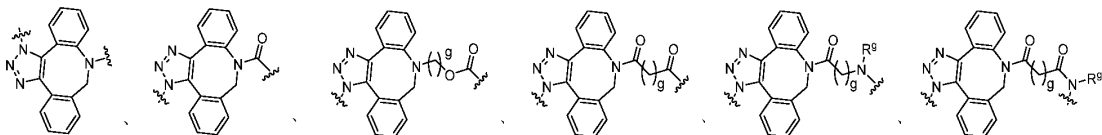
Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ，例如 O，

G_X' 各自独立地选自

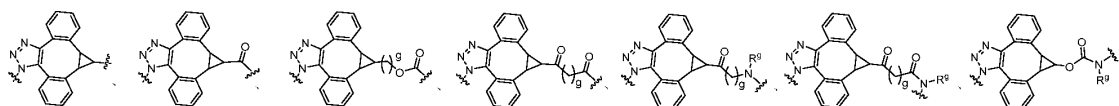
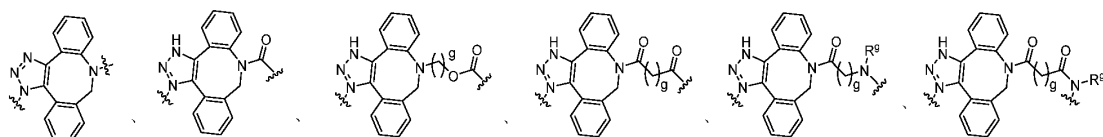




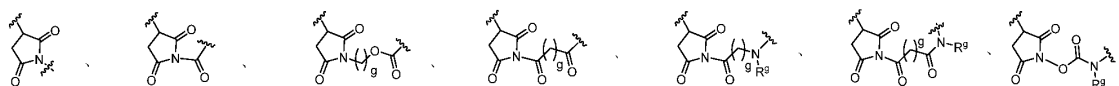
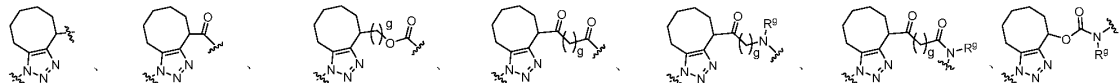
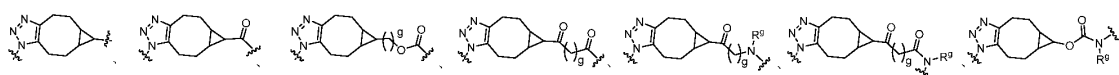
;

Ga₂、Ga₃ 各自独立地选自:

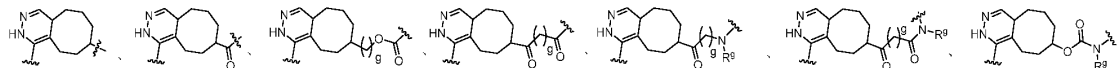
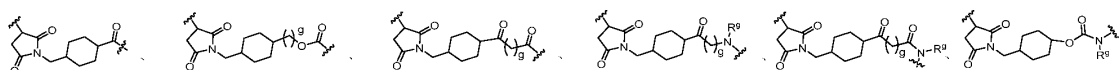
5



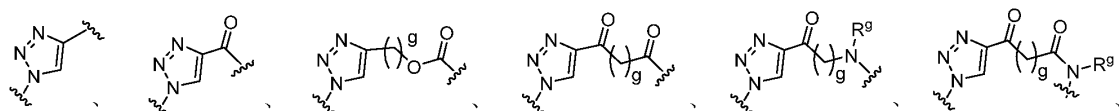
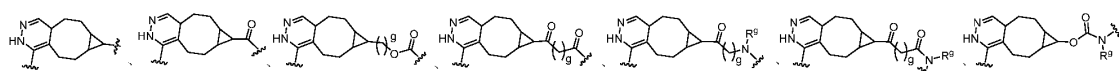
10

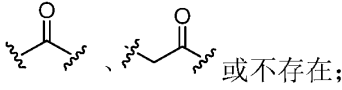
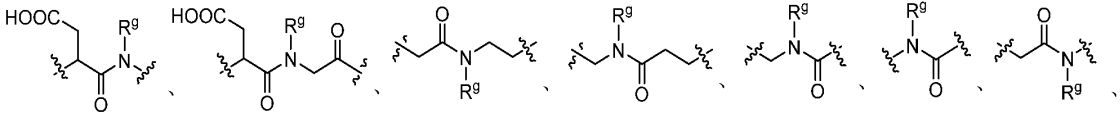
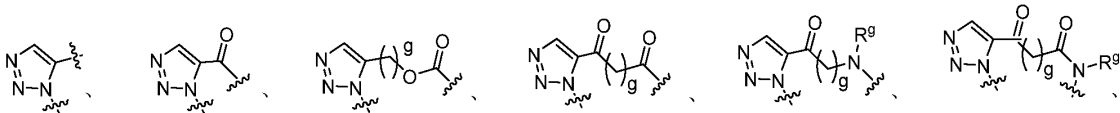


15



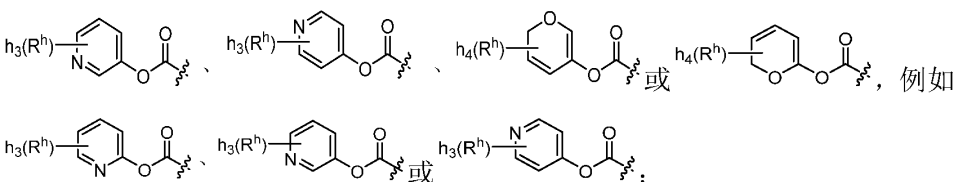
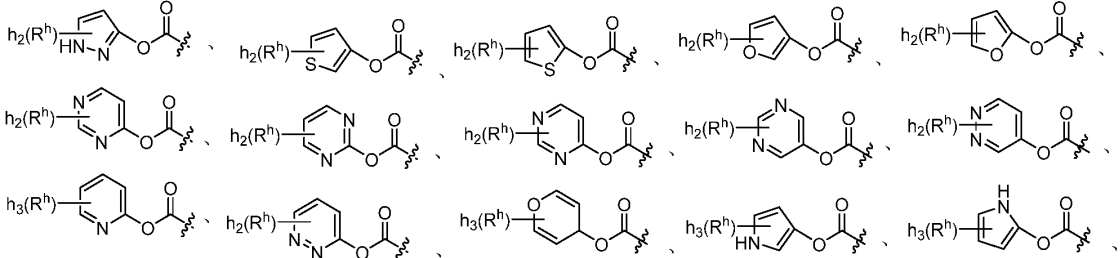
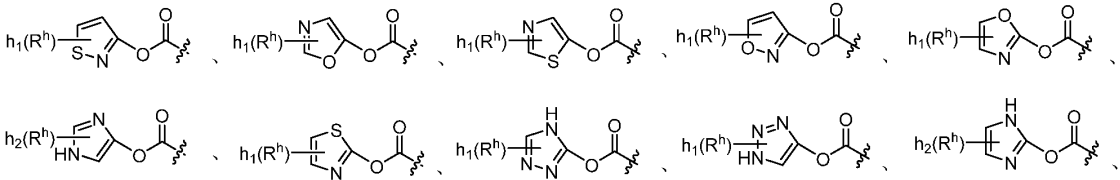
20





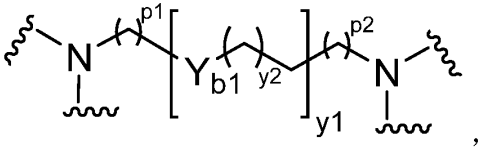
5 g 各自独立地选自 0、1、2、3、4； R^g 各自独立地选自氢或甲基；

环 H 为 5 至 10 元杂芳基， $h(R^h)-\text{H}$ 可选自



15 R_h 各自独立地选自卤素；
 h 选自 0、1、2、3、4、5；
 h_1 各自独立地选自 0、1、2；
 h_2 各自独立地选自 0、1、2、3；
 h_3 各自独立地选自 0、1、2、3、4；
 h_4 各自独立地选自 0、1、2、3、4、5；

L₂选自

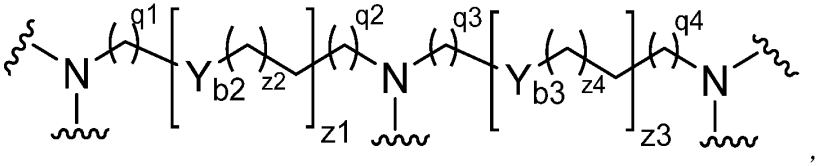


其中, y₁ 为 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10,

5 y₂ 为 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2,

Y_{b1} 选自 O 或 CH₂, 例如 O,

p₁、p₂ 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2; 或



10 其中, z₁ 为 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10,

z₂ 为 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2,

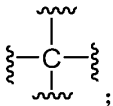
Y_{b2} 选自 O 或 CH₂, 例如 O,

z₃ 为 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10,

15 z₄ 为 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2,

Y_{b3} 选自 O 或 CH₂, 例如 O,

q₁、q₂、q₃、q₄ 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数; 或



L₃ 为 -(CH₂)_{wc1}-[Y_{c1}-CH₂(CH₂)_{xc2}]_{xc1}-(CH₂)_{wc2}-G_{c1}-, 其中,

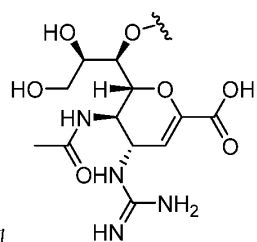
20 xc₁ 各自独立地为 0 至 100 的整数, 例如 0 至 30 的整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10,

xc₂ 各自独立地为 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 1 或 2,

Y_{c1} 各自独立地选自 O 或 CH₂, 例如 O,

wc₁、wc₂ 各自独立地选自 0-10 的整数, 例如 0-6 的整数, 例如 0、1、2 或 3,

25 G_{c1} 各自独立地选自 NR₆(C=O)-、-NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-、-NR₆(C=O)CH₂-或化学键, 其中 R₆ 选自氢和 C₁-C₆ 烷基, 例如自-NR₆(C=O)-、-NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-和-NR₆(C=O)CH₂;



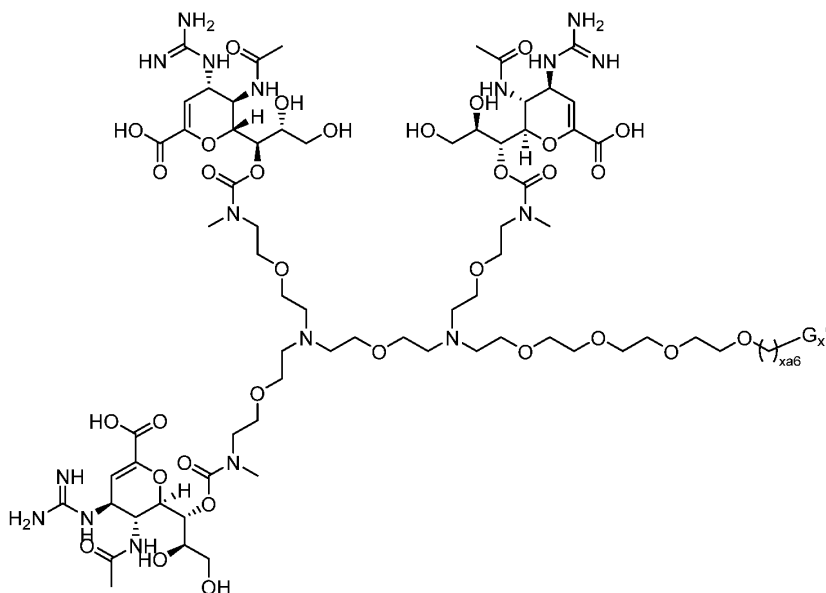
D 为 ;

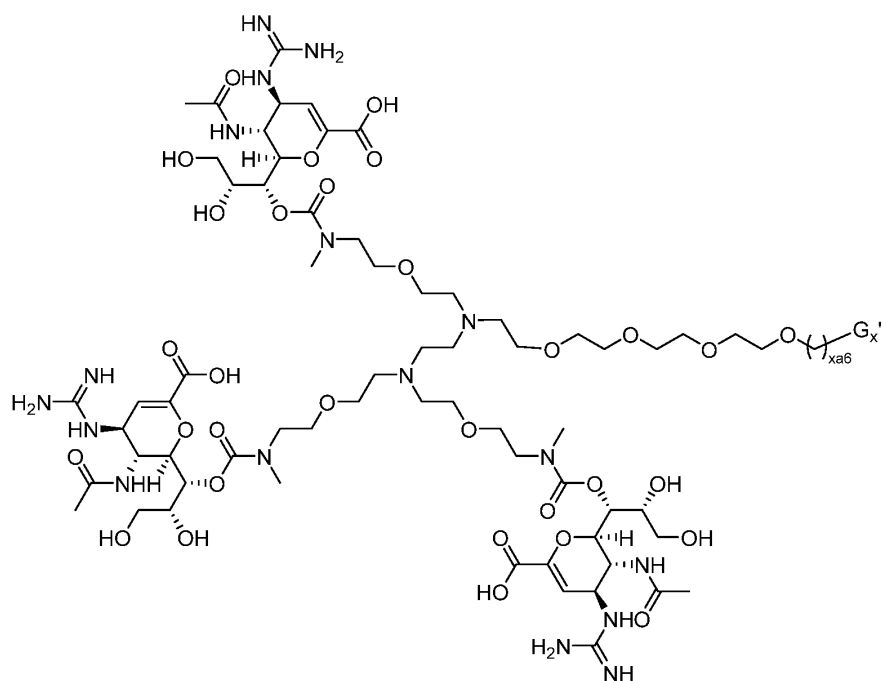
m 为 3 或 4。

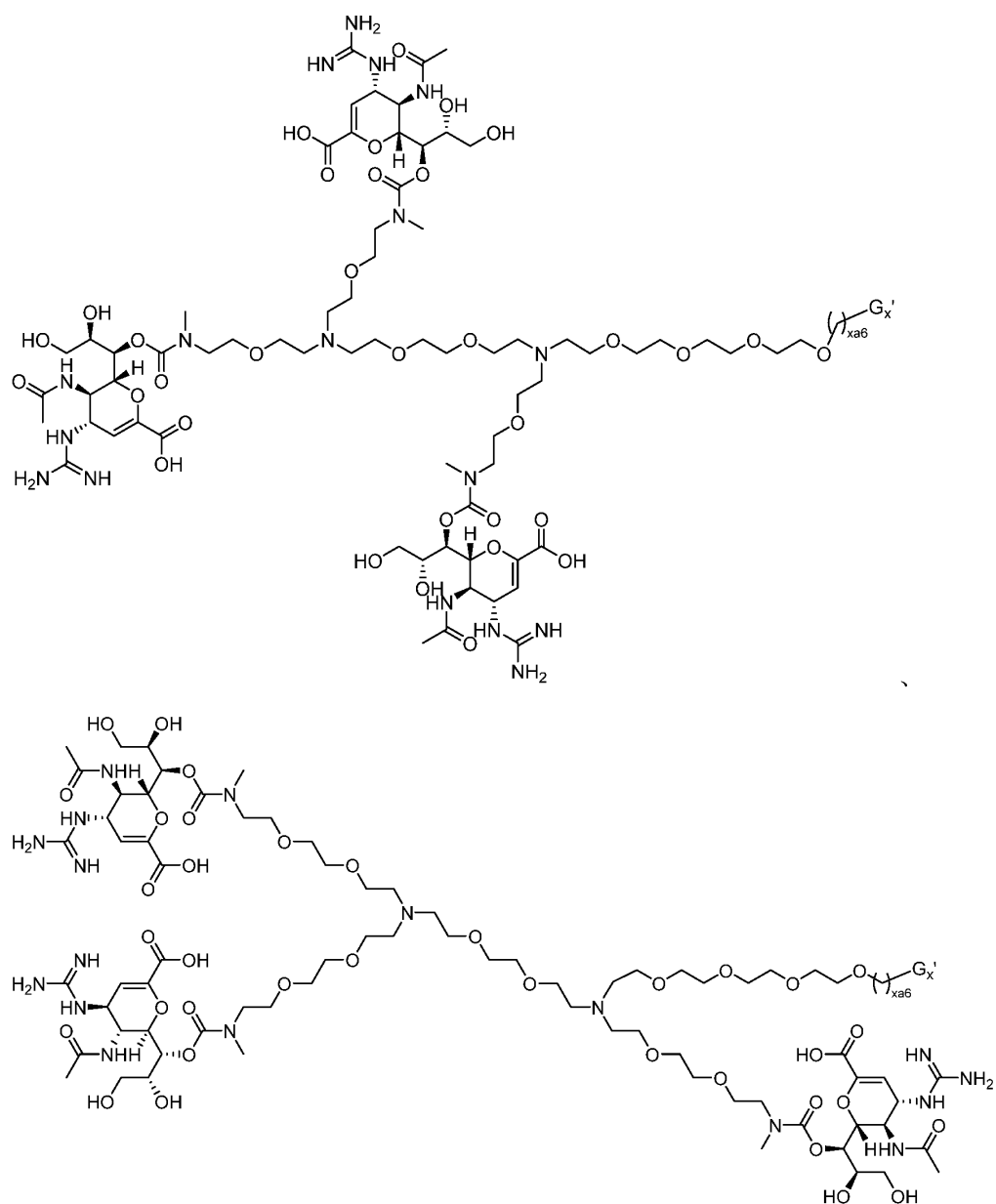
在一些实施方案中，xc1 各自独立地为 2 至 30 的整数，例如 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 或它们之间任意的数值范围，例如 2-20 等。

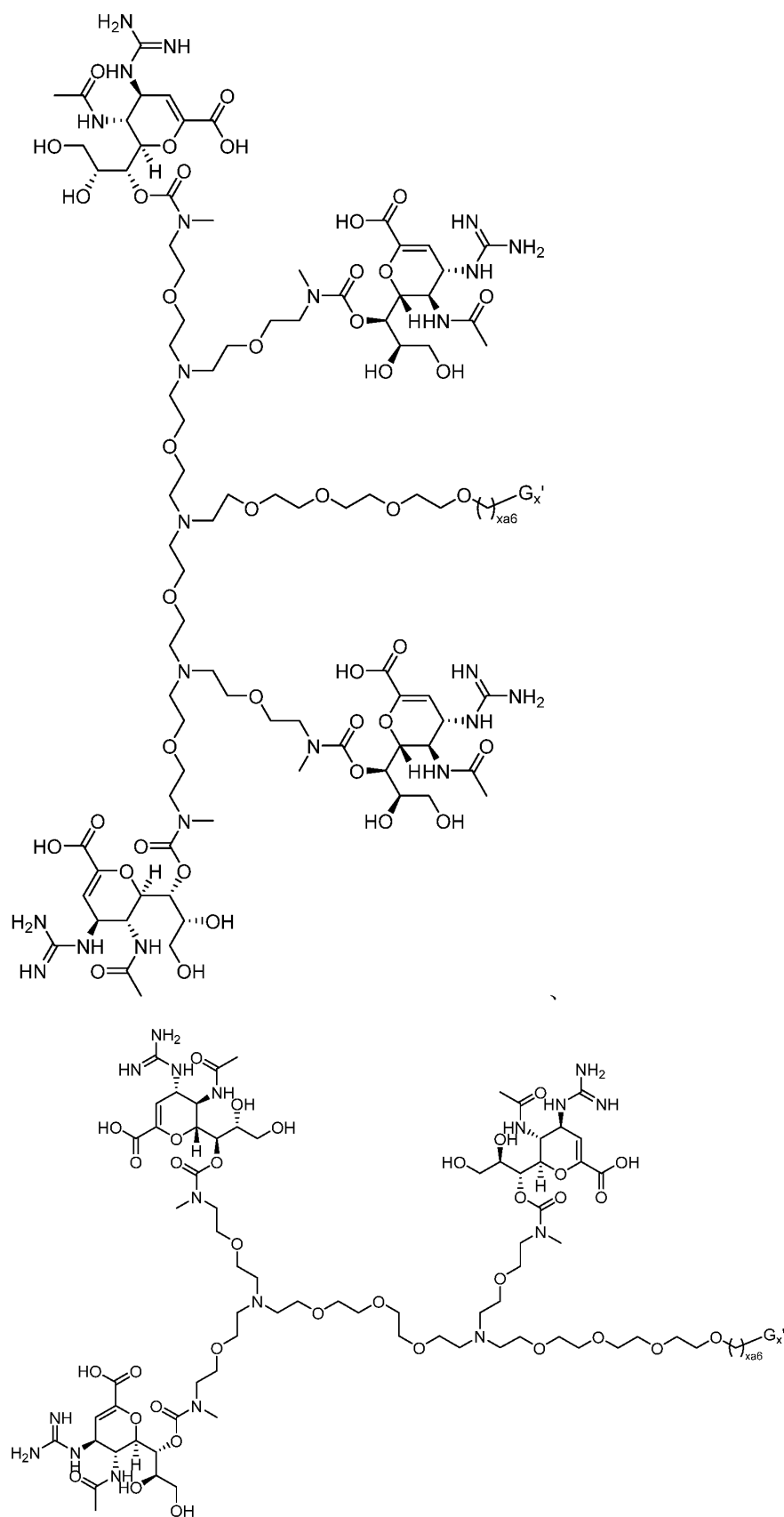
在一些实施方案中，L₃ 主链的原子个数大于 7，例如大于 8，例如大于 9，例如 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 或它们之间任意的数值范围，例如 8-30, 或 8-20。

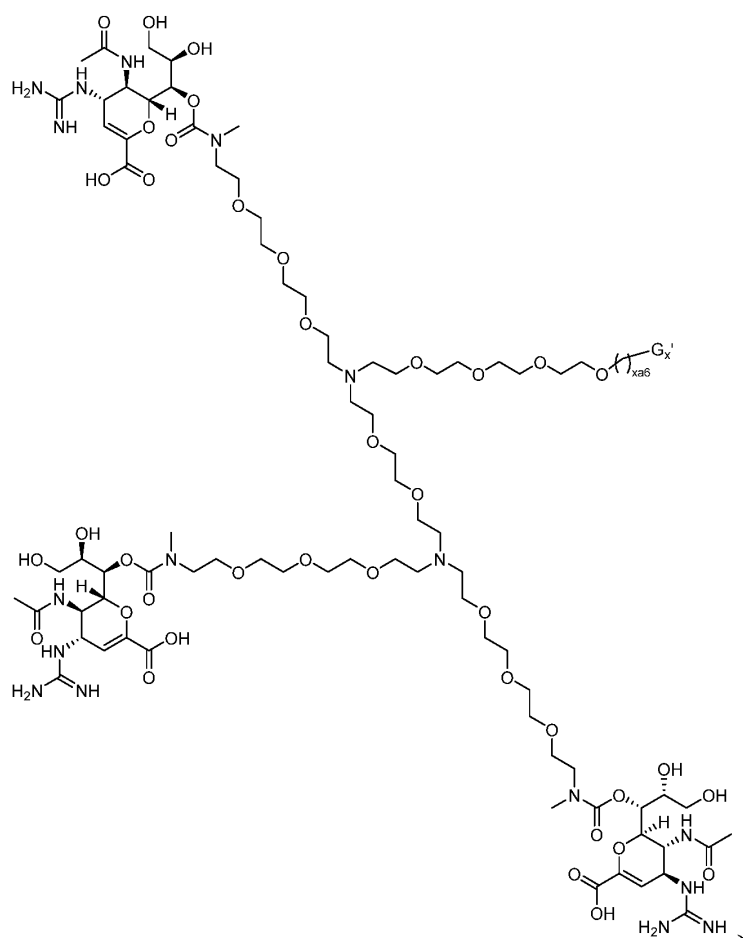
在一些实施方案中，所述化合物选自：



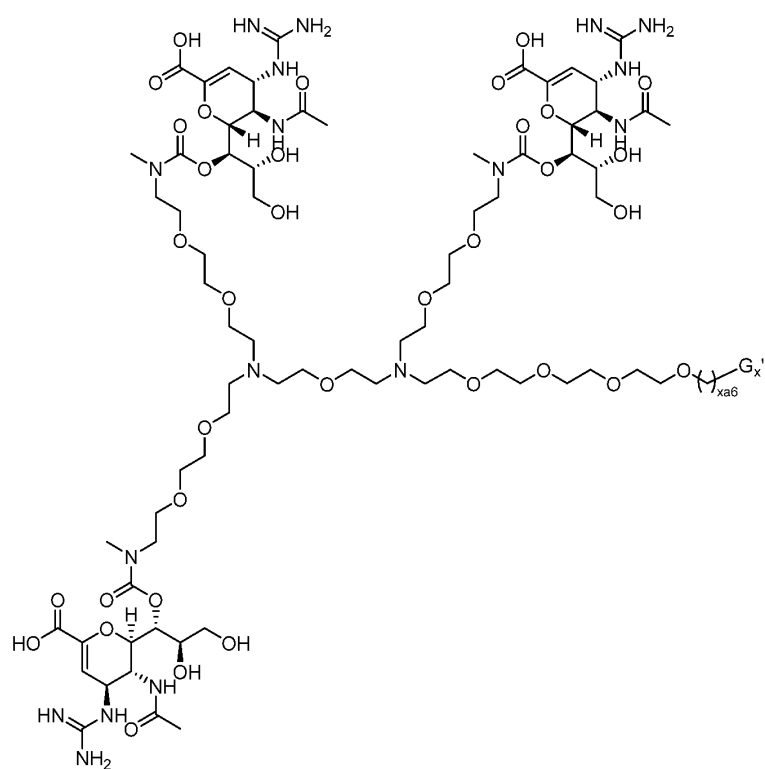




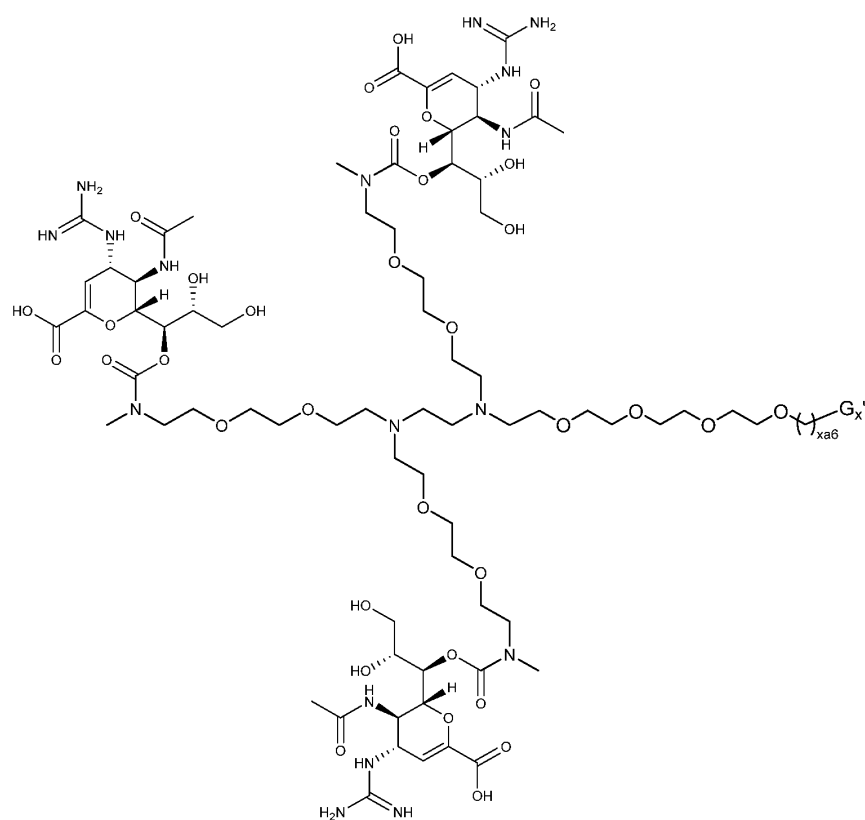




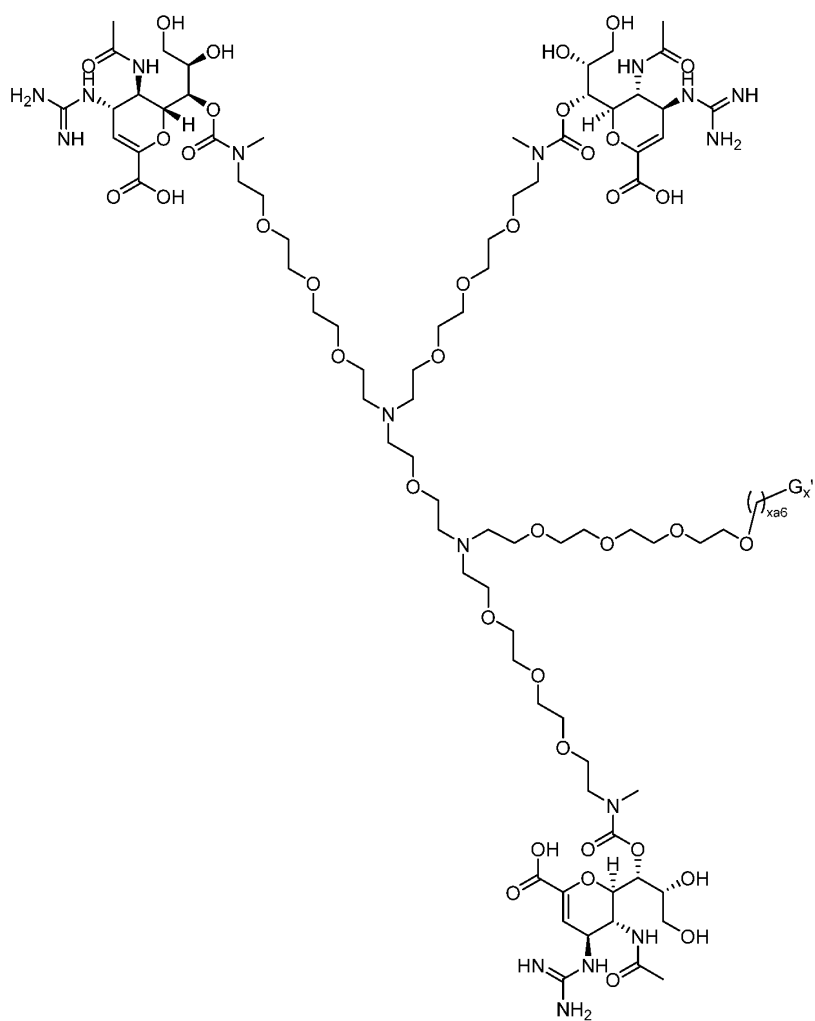
36

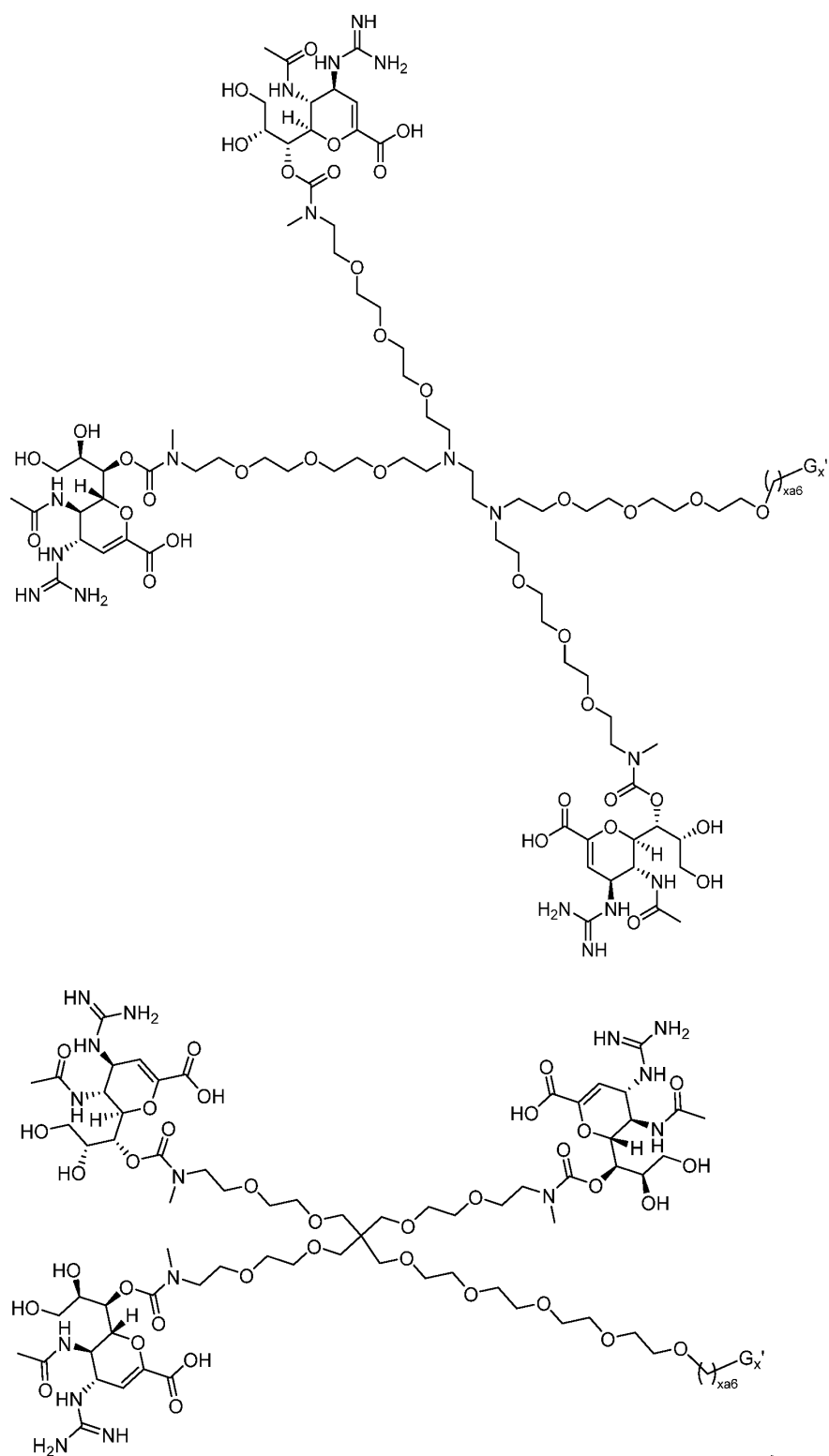


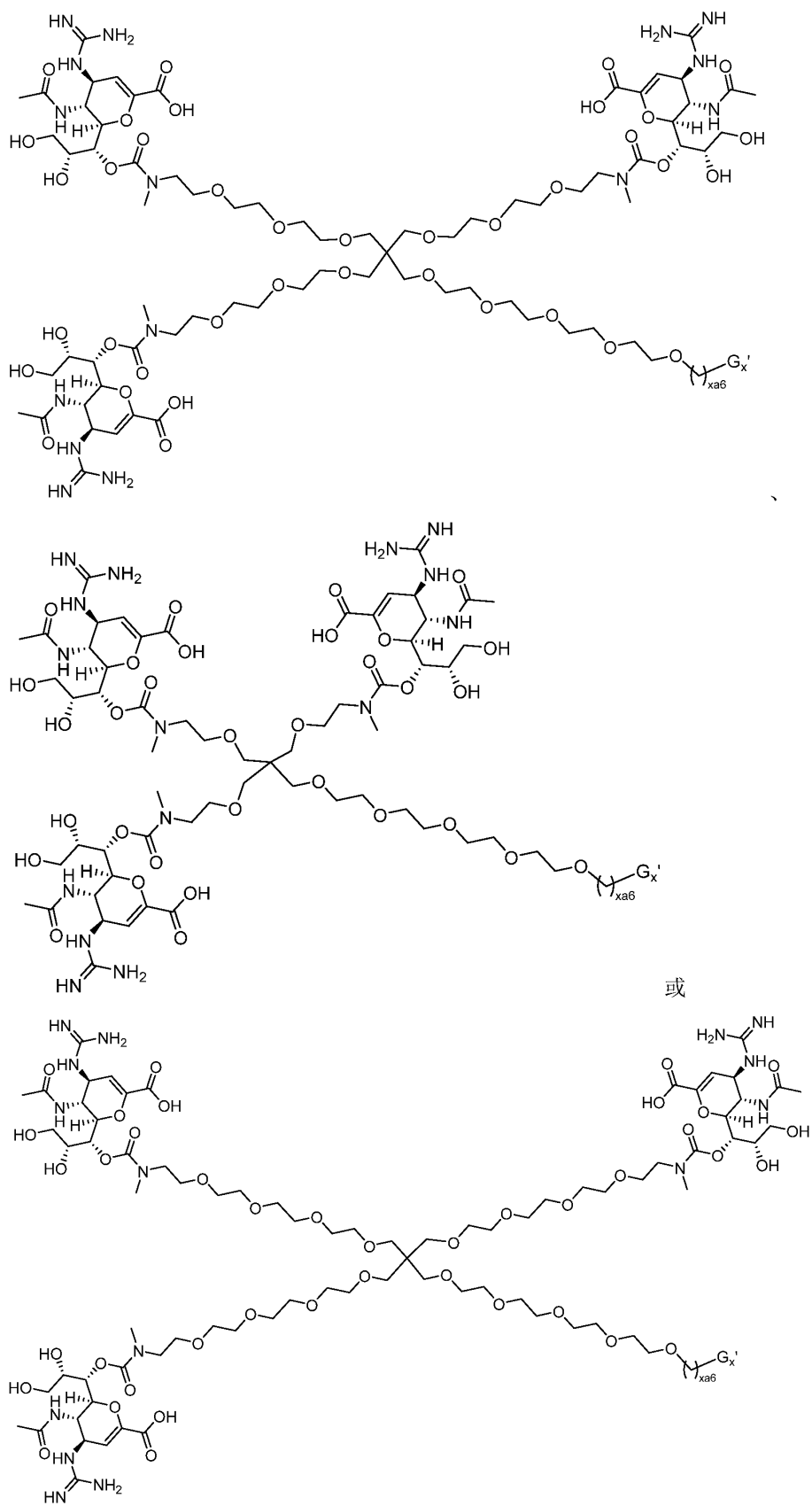
37



38



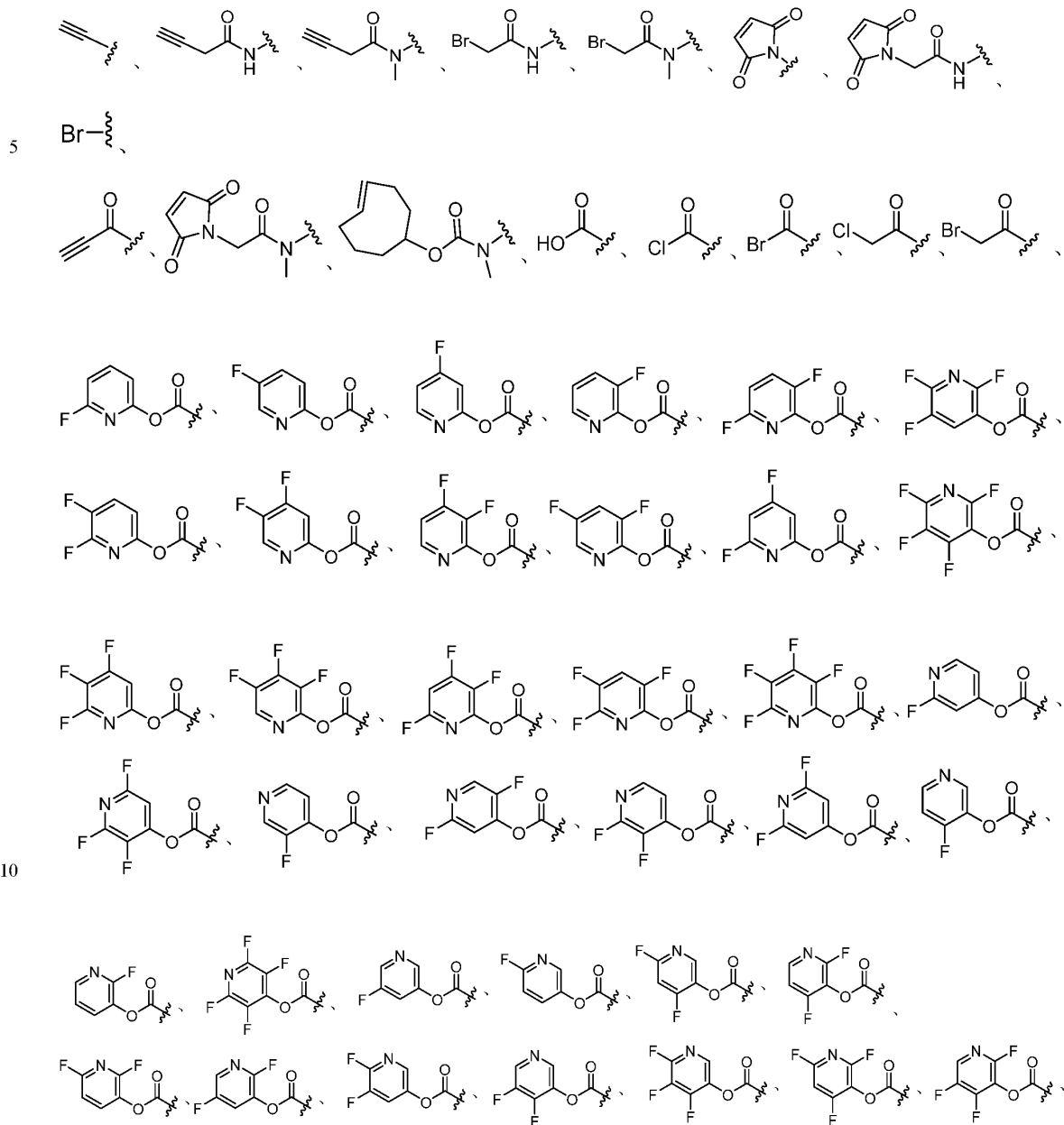


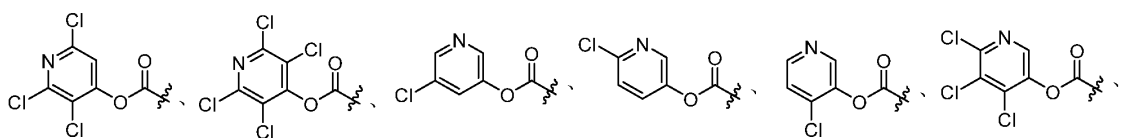
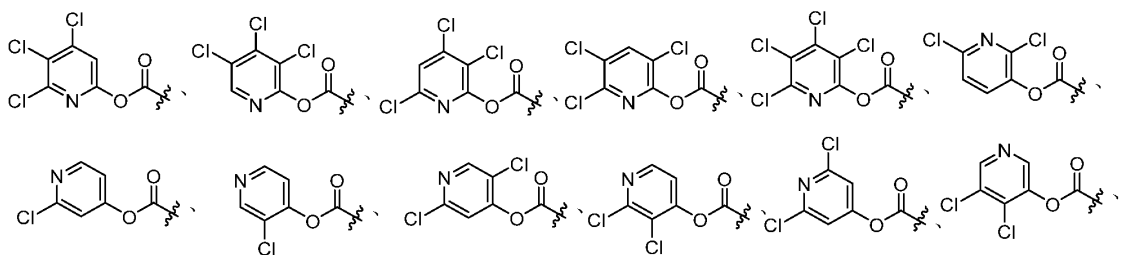
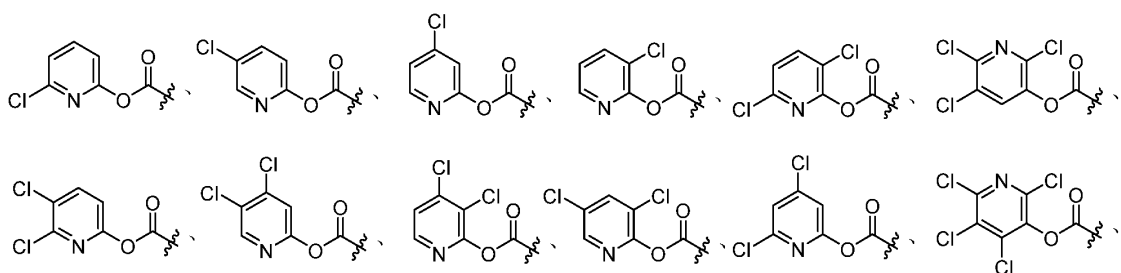


其中，

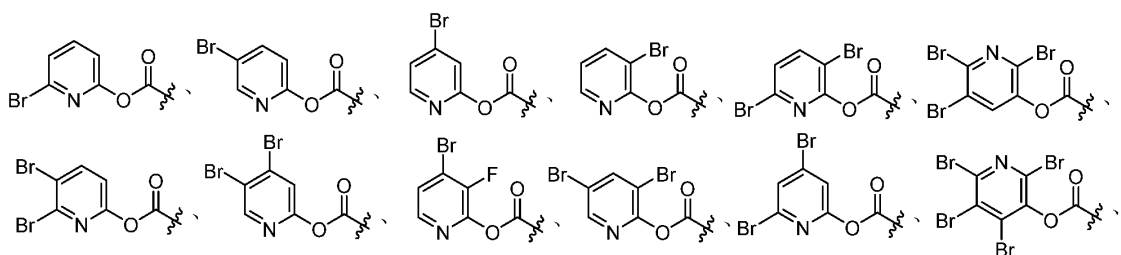
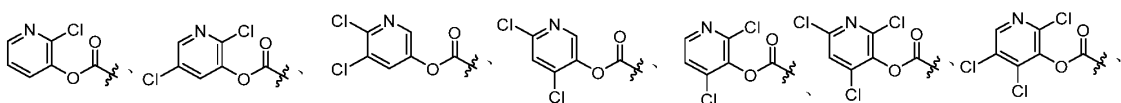
xa6 各自独立地选自 0-8 之间的整数，

G_x' 各自独立地选自

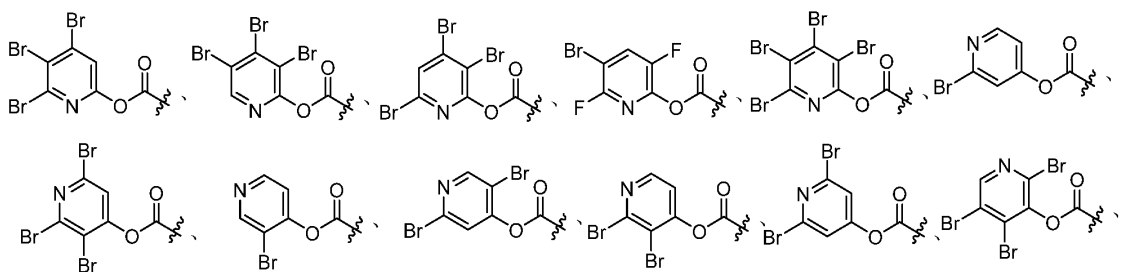


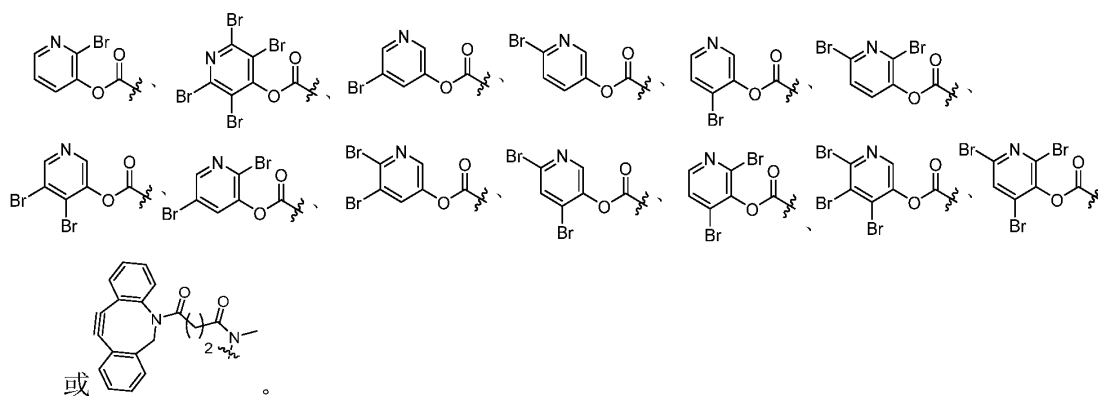


5

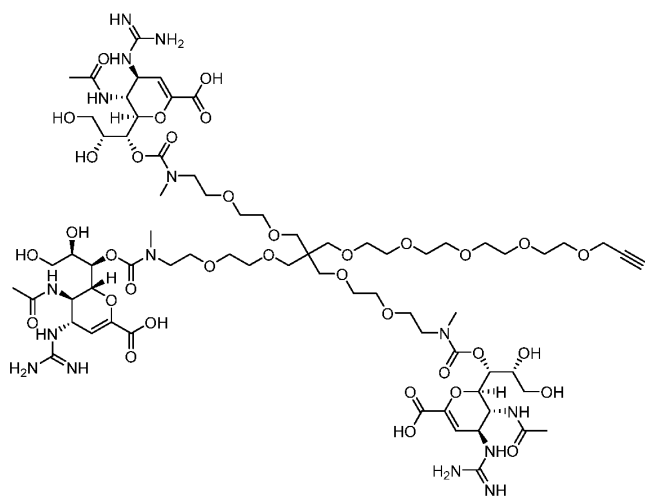


10

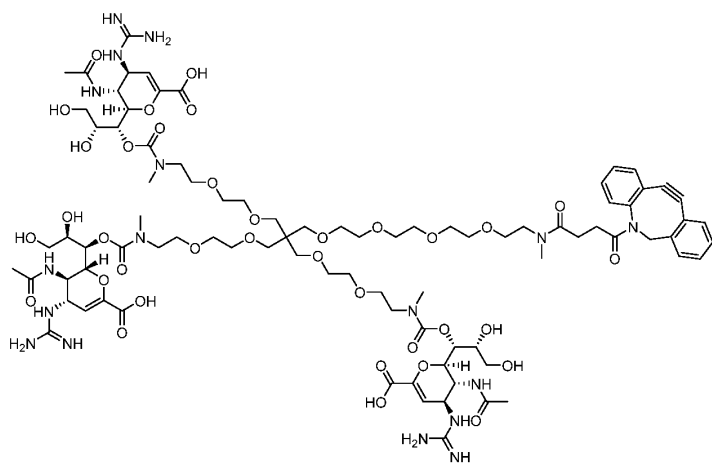


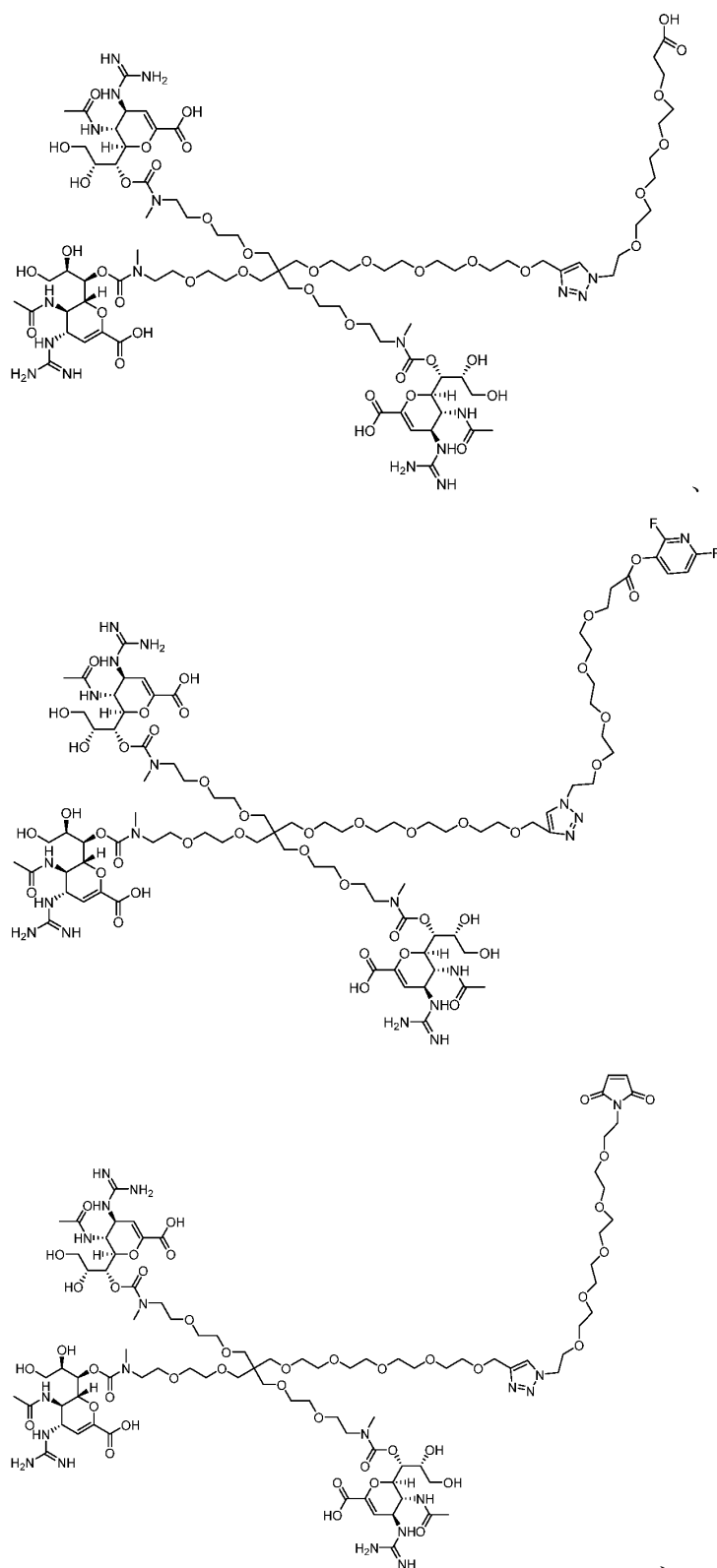


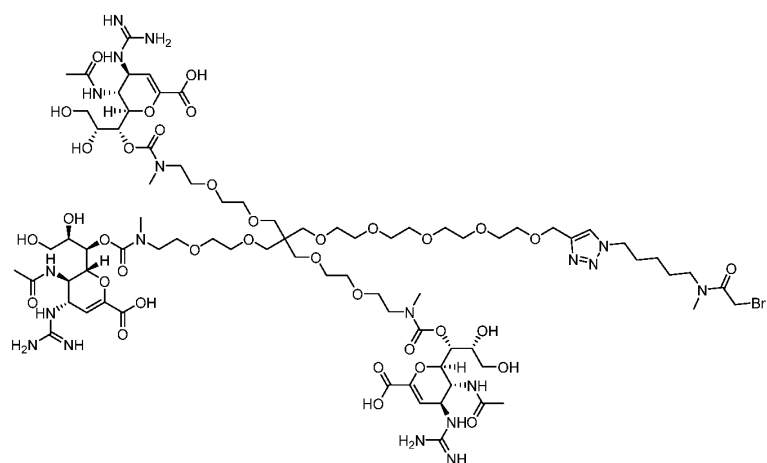
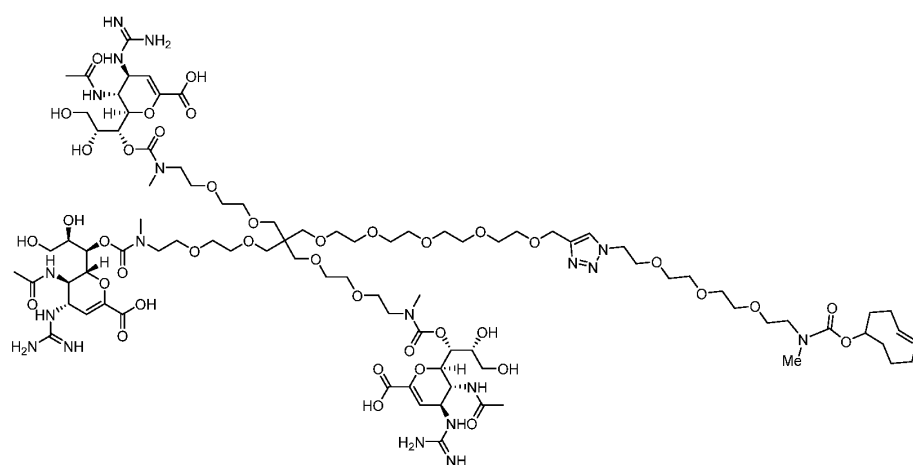
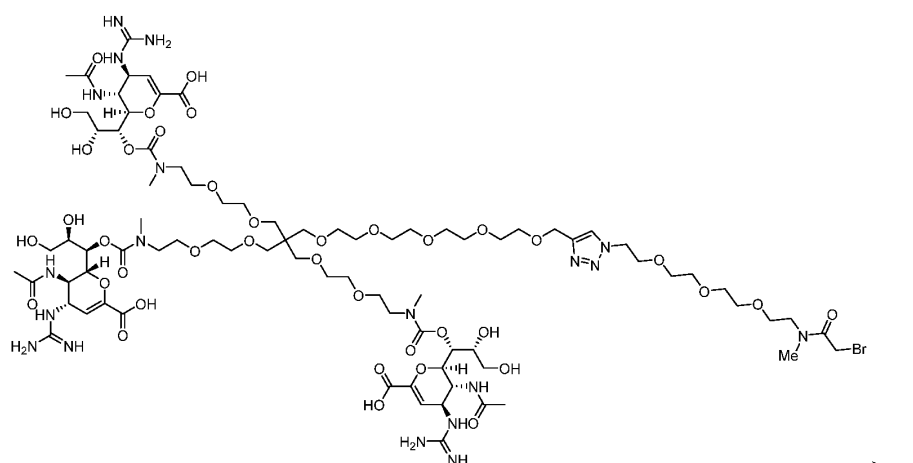
在一些实施方案中，所述化合物选自：



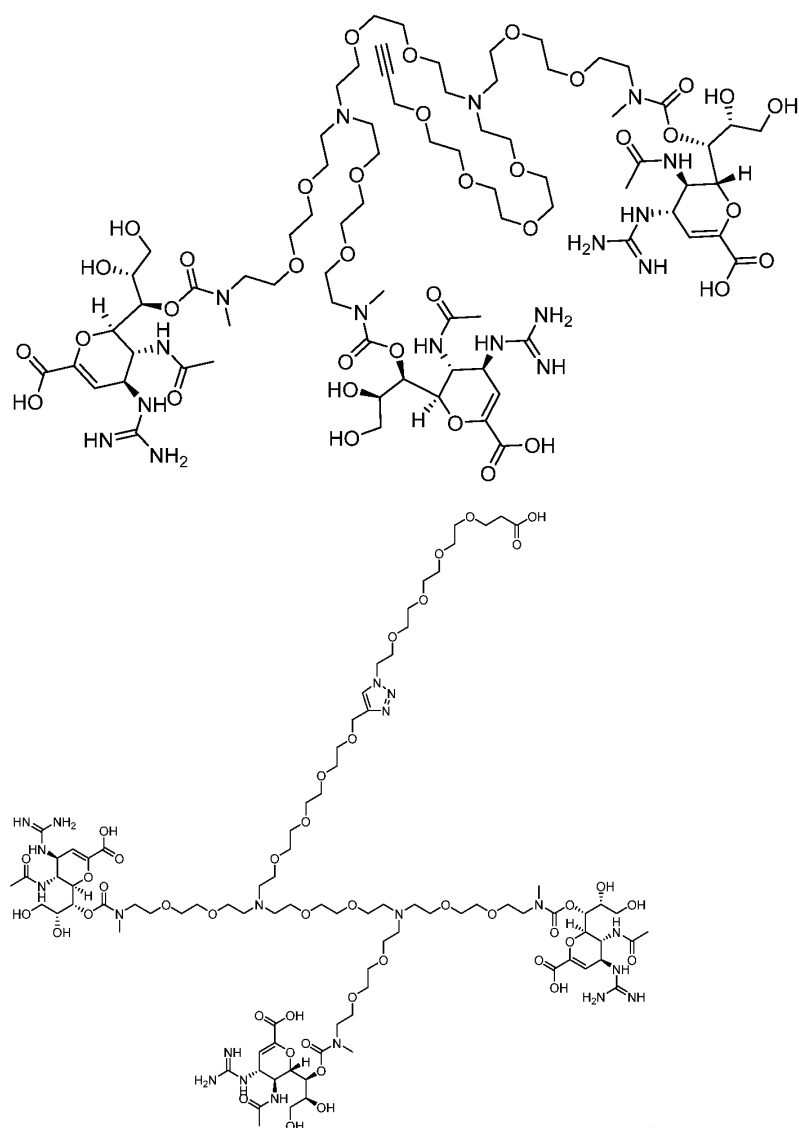
5

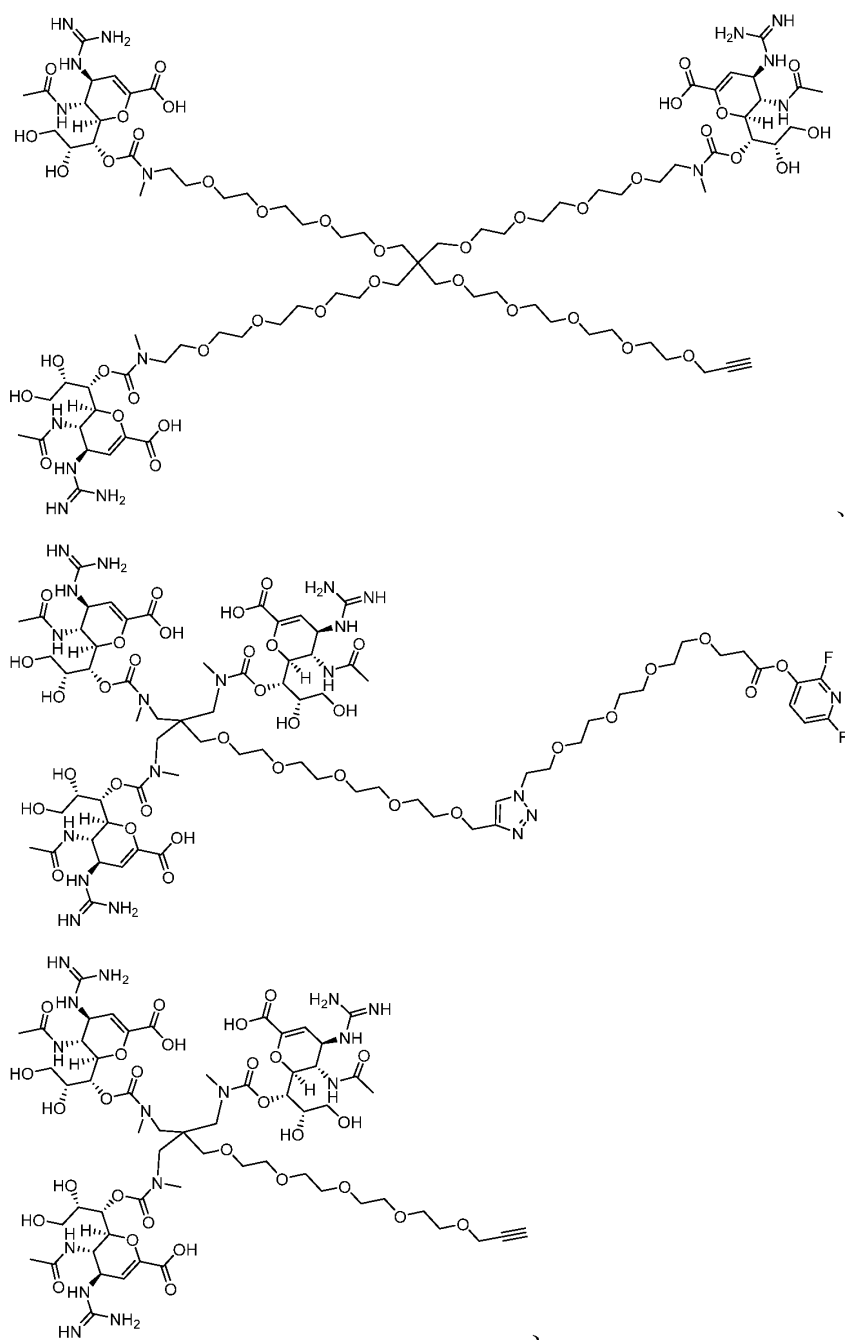


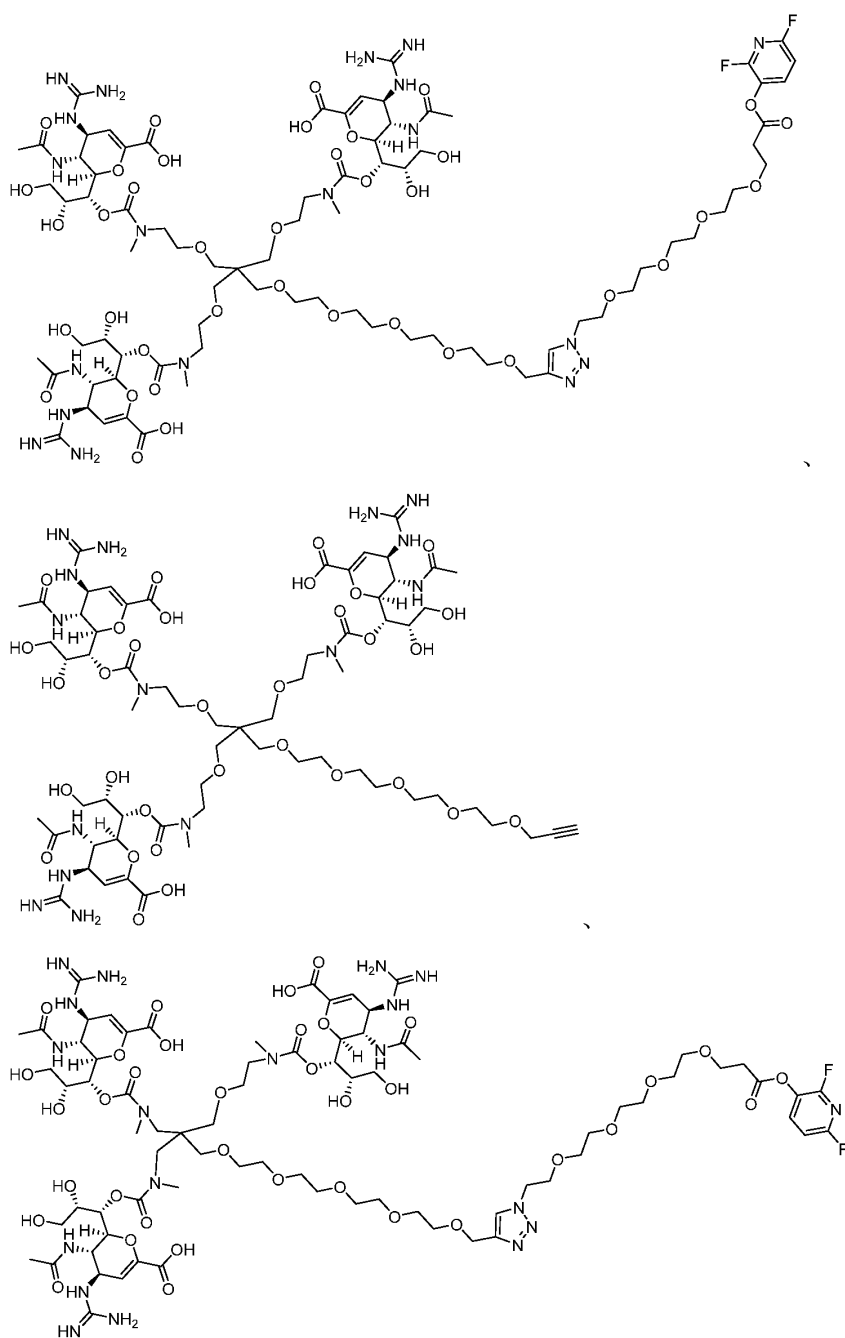


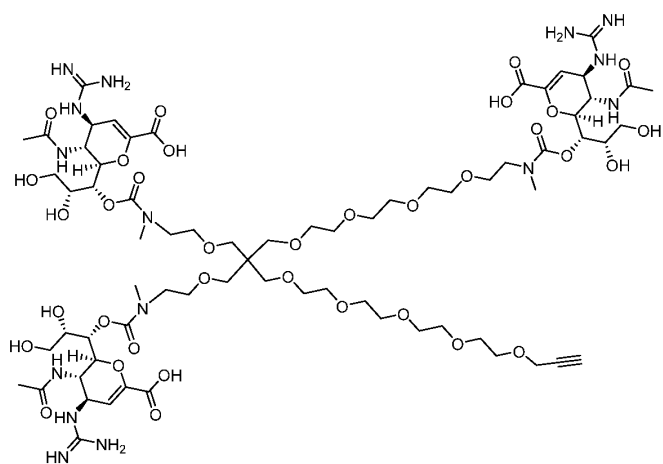
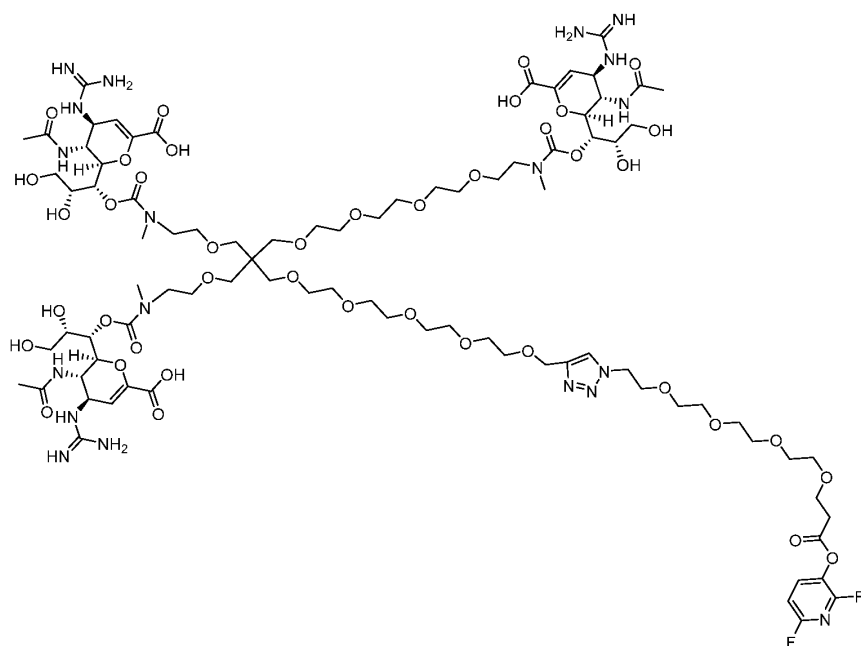
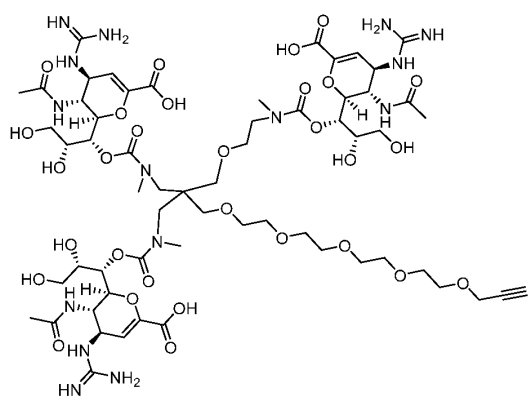


46

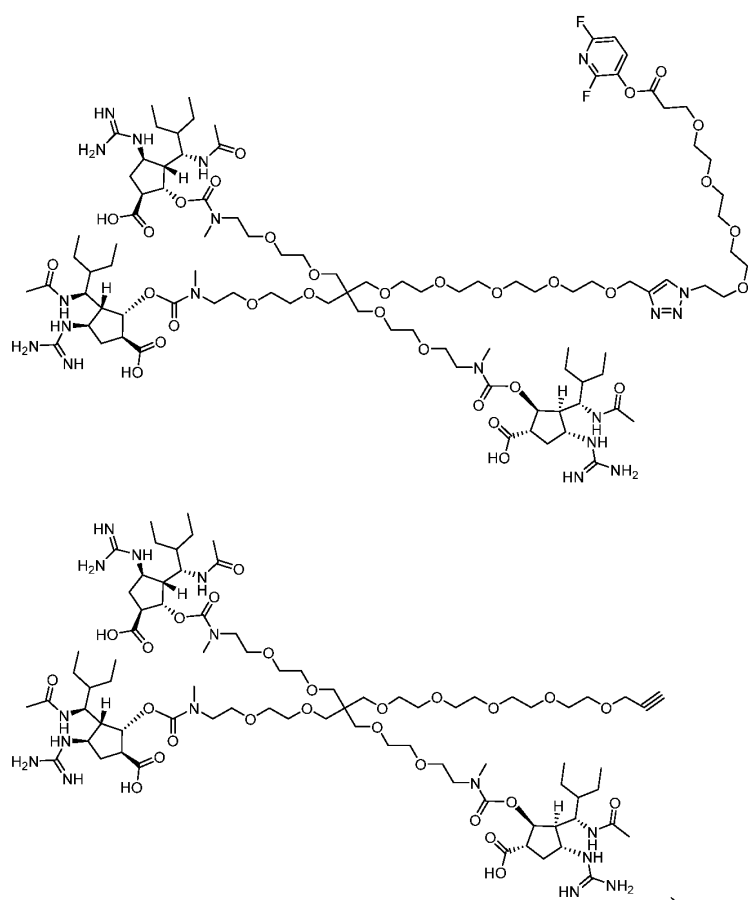




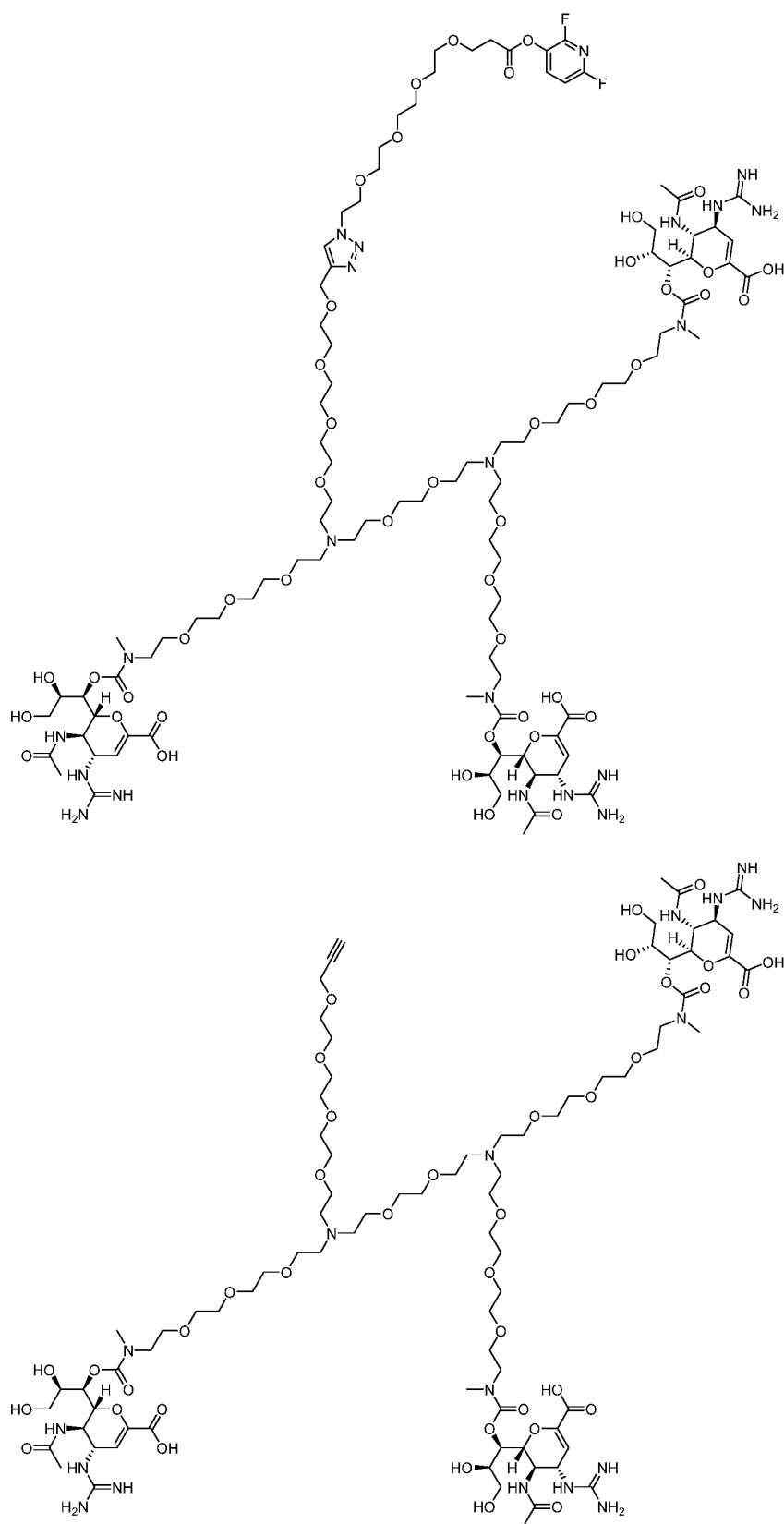


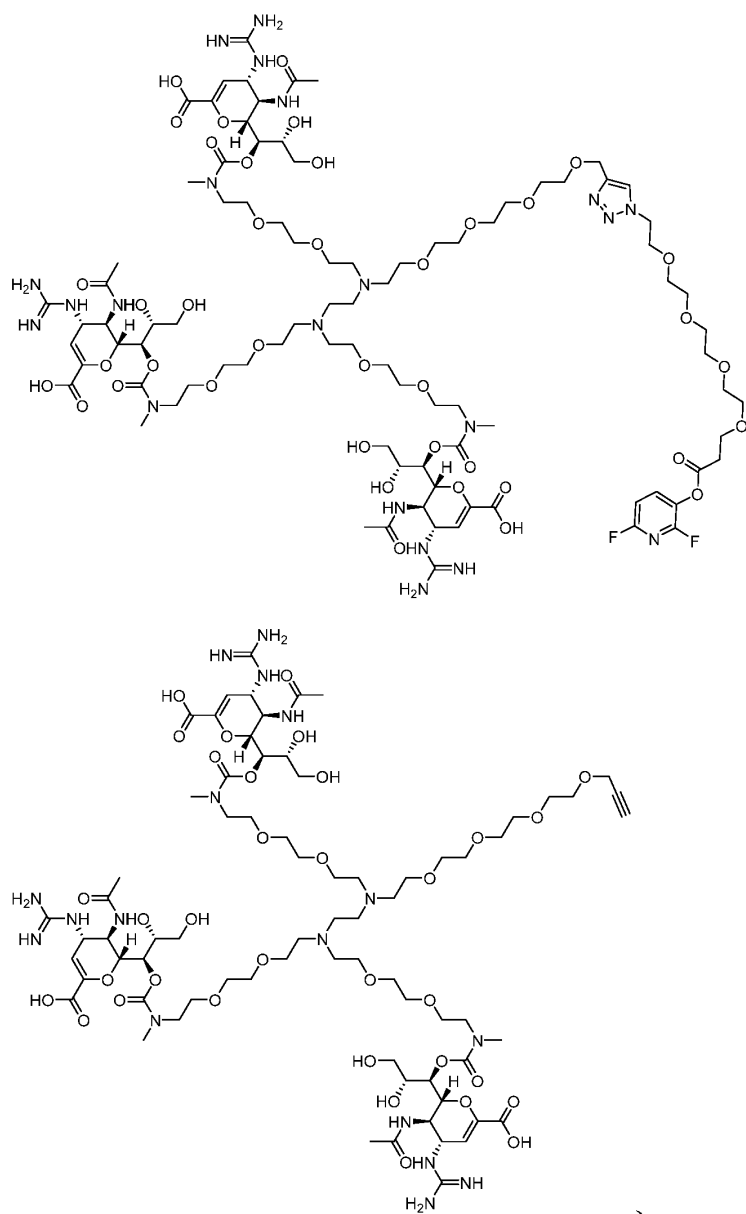


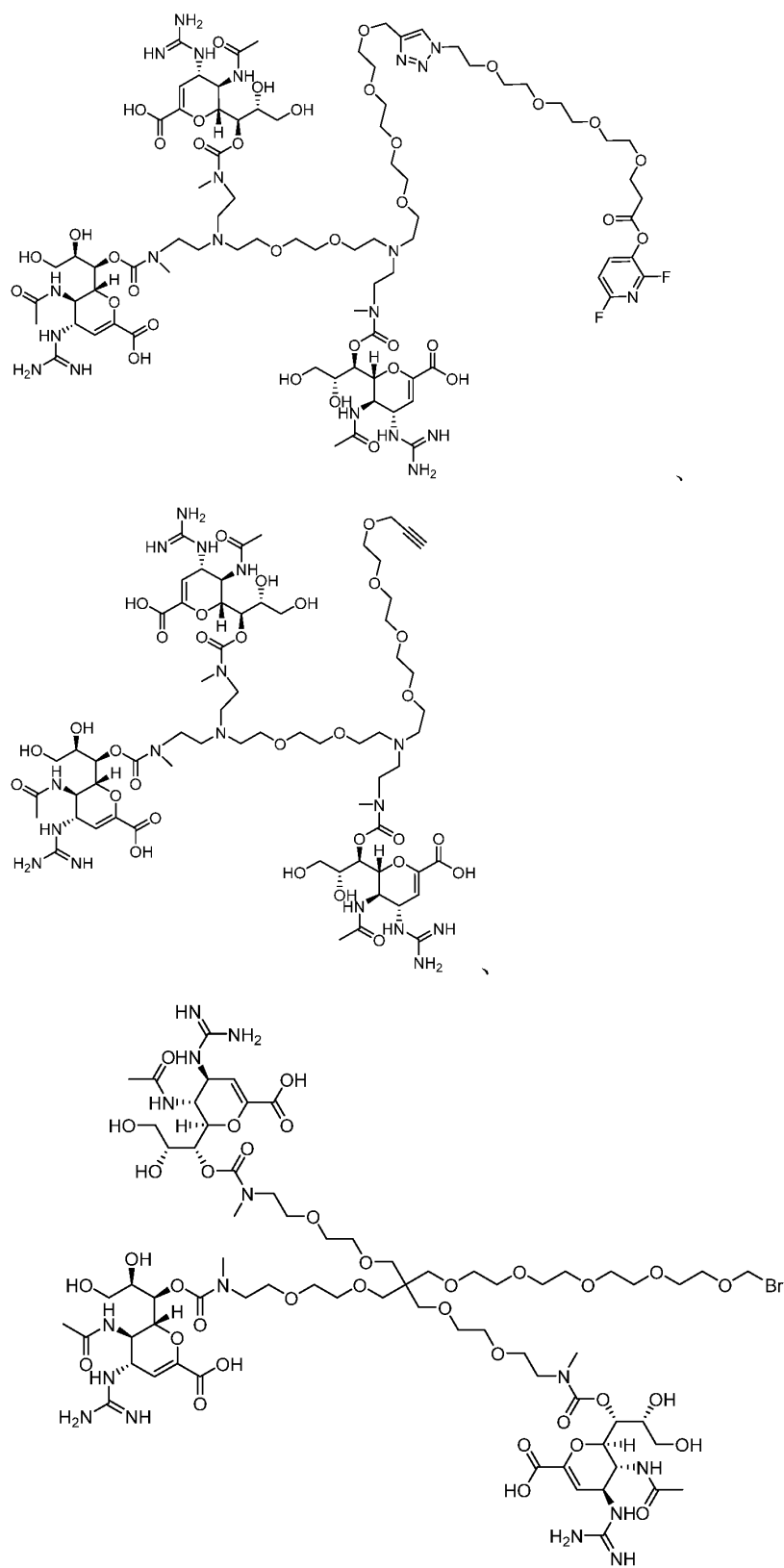
51



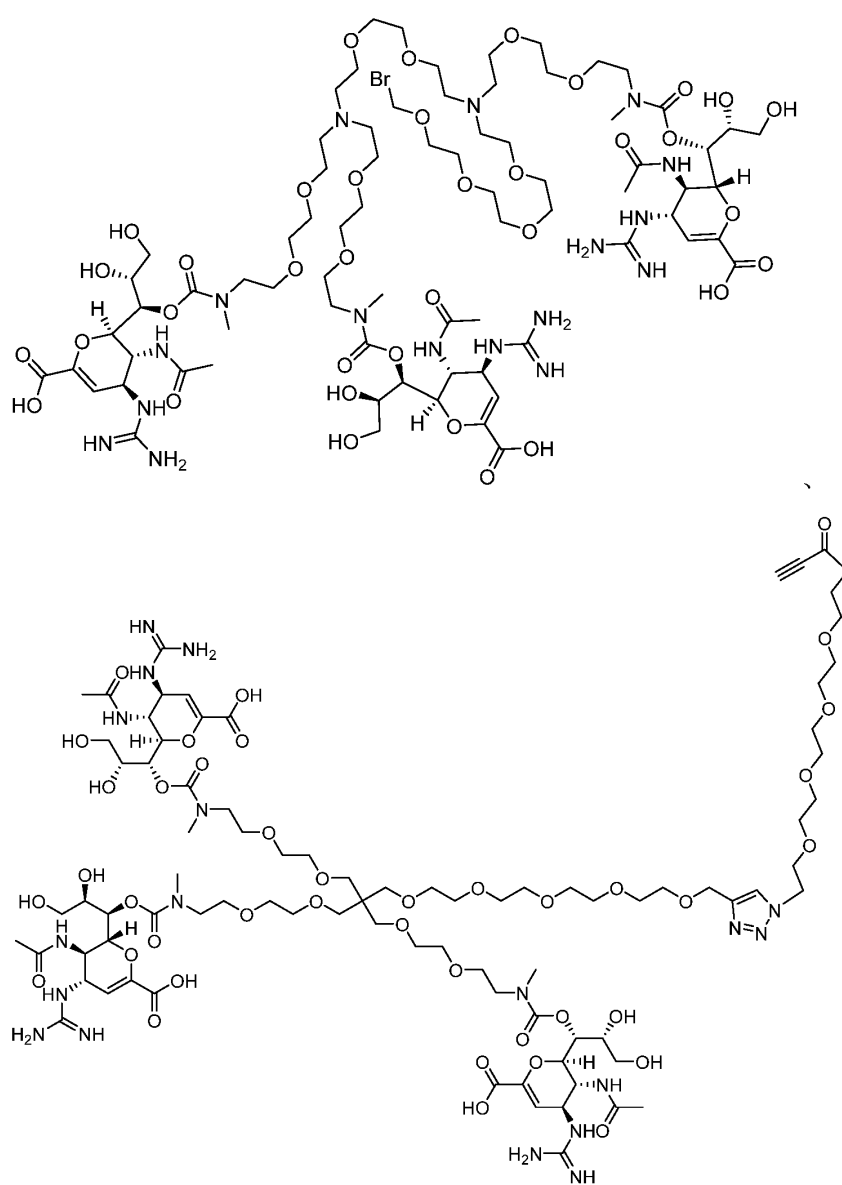
52

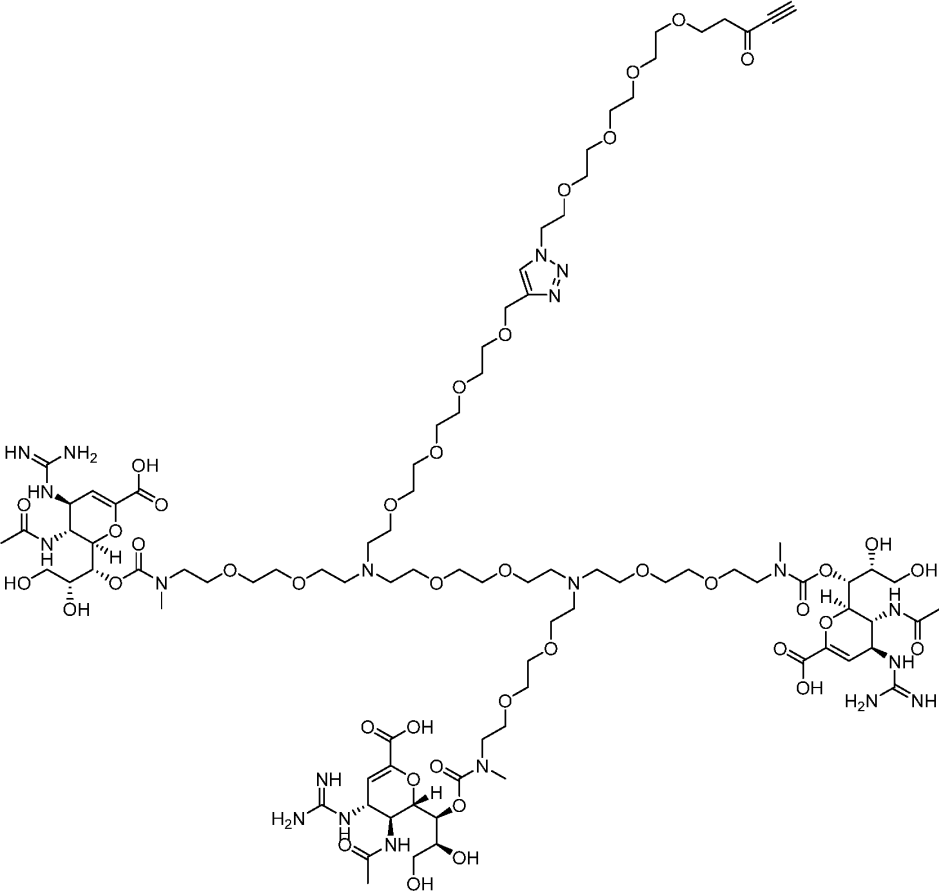
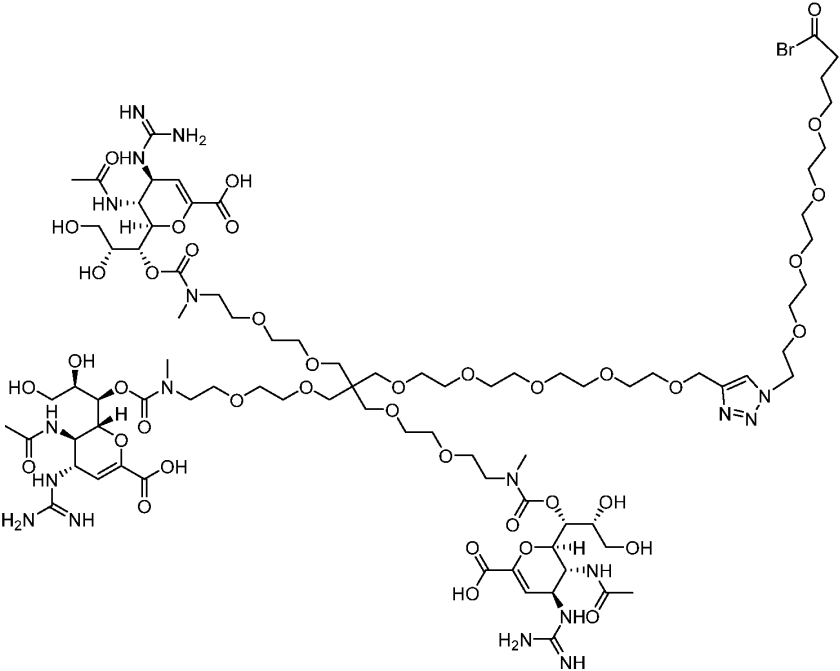




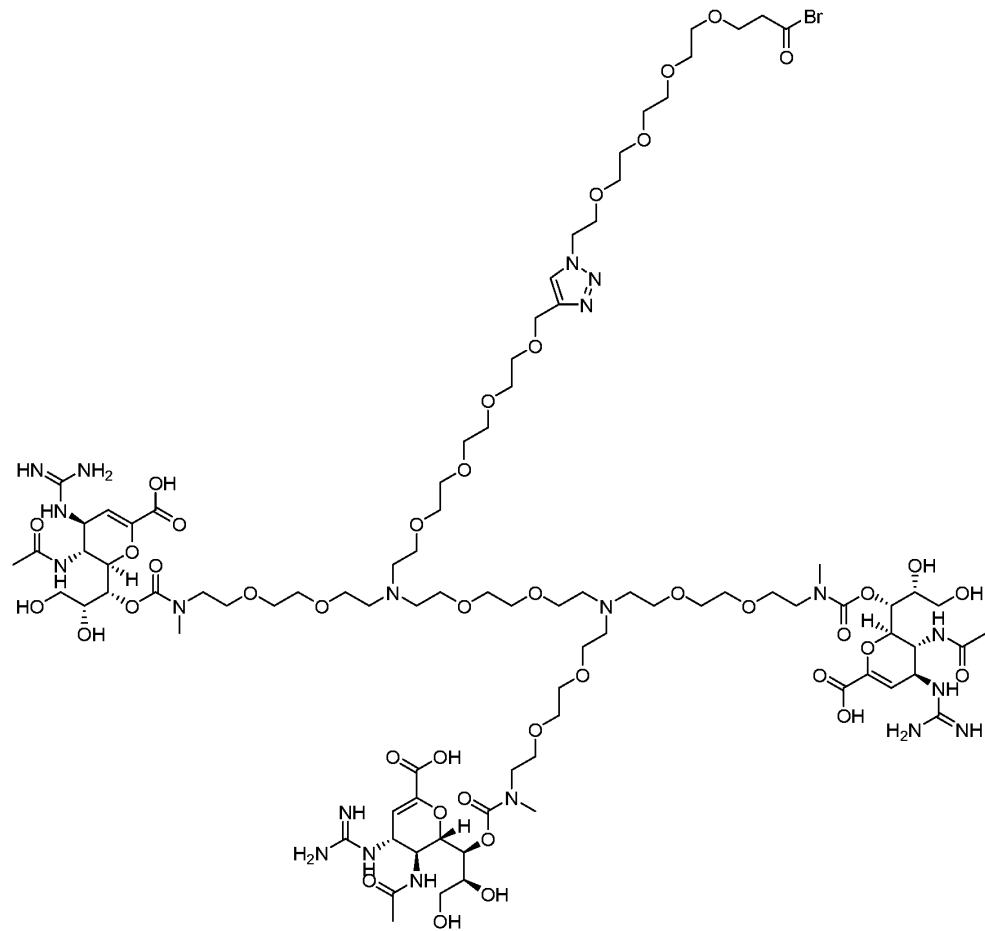


55

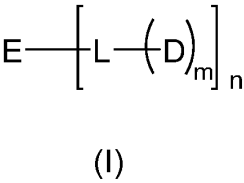




或



本公开还提供了一种制备本公开所述的抗病毒偶联物的方法，包括，将多肽 E 与小分子 D 偶联的步骤，



5

所述多肽 E 与小分子 D 可借助于以下方式进行偶联：包括但不限于(a)硫脲连接(即，-NH(C=S)NH-)于 E 的赖氨酸；(b)氨基甲酸酯连接(即，-NH(C=O)-O)于 E 的赖氨酸；(c)在赖氨酸与 E 之间通过还原胺化实现的胺连接(即，-NHCH₂)；(d)酰胺(即，-NH-(C=O)CH₂)于 E 的赖氨酸；(e)端基中的马来酰亚胺至 E 的半胱氨酸之间的半胱氨酸-马来酰亚胺结合；(f)在端基与 E 的碳水化合物(例如，Fc 结构域、白蛋白或白蛋白结合结构域的糖基)之间通过还原胺化实现的胺连接(即，-NHCH₂)；(g)桥接半胱氨酸结合，其中所述端基偶联于 E 的两个半胱氨酸；(h)在端基与 E 的碳水化合物(例如，Fc 结构域、白蛋白或白蛋白结合结构域的糖基)之间的肟连接；(i)在端基与 E 的氨基酸残基之间的肟连接；(j)在端基与 E 之间的叠氮基连接；(k)端基直接酰化为 E；或(l)在端基与 E 之间的硫醚连接；

10

或者，通过酪氨酸特定位点突变或酪氨酸标签进行位点特异性标记，酪氨酸标签与 E 的 C 末端基因融合。酪氨酸酶将酪氨酸的苯酚结构氧化成醌，从而允许与各种双环[6.1.0]壬炔（BCN）衍生物、反式环辛烯（TCO）衍生物等的环加成，从而将 E 与 D 连接。

5 本公开还提供了一种药物组合物，包括至少一种前述抗病毒偶联物，以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在某些实施方式中，所述的药物组合物的单位剂量为 0.001mg-1000mg。

在某些实施方式中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01%-99.99% 的前述抗病毒偶联物。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 0.1%-99.9% 的前述抗病毒偶联物。

10 在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 0.5%-99.5% 的前述抗病毒偶联物。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 1%-99% 的前述抗病毒偶联物。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 2%-98% 的前述抗病毒偶联物。

在某些实施方式中，基于组合物的总重量，所述的药物组合物含有 0.01%-99.99% 的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 0.1%-99.9% 的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 0.5%-99.5% 的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 1%-99% 的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在某些实施方式中，所述的药物组合物含有 2%-98% 的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

本公开还提供了本公开所述的抗病毒偶联物或药物组合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途。在一些实施方案中，所述病毒感染是由流感病毒或副流感病毒引起。在一些实施方案中，所述病毒感染为 A 型、B 型或 C 型流感病毒或副流感病毒。

本公开进一步提供了一种治疗病毒感染的方法，所述哺乳动物可为人，或可为非人哺乳动物，用于治疗目的，包括给哺乳动物施用本公开所述的抗病毒偶联物，或药物组合物。

本公开进一步提供了一种试剂盒，其包含本公开所述的抗病毒偶联物，或药物组合物。

25

术语解释：

除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

当本公开中使用商品名时，申请人旨在包括该商品名产品的制剂、该商品名产品的非专利药和活性药物部分。

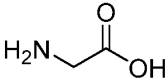
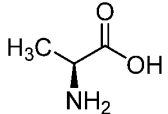
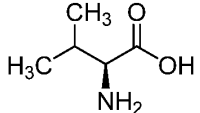
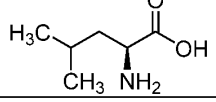
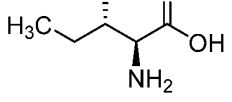
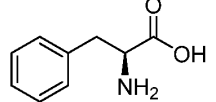
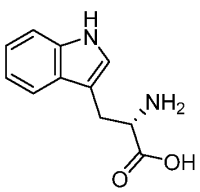
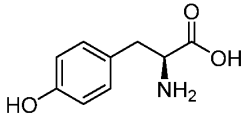
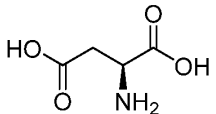
30 除非有相反陈述，在说明书和权利要求书中使用的术语具有下述含义。

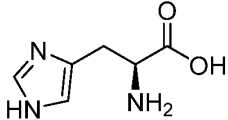
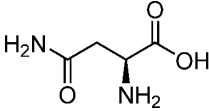
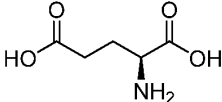
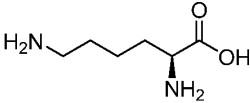
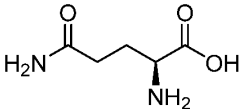
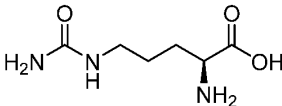
术语“连接子”、“连接单元”、“接头单元”、“接头”或“连接片段”是指一端与蛋白或多肽连接而另一端与药物相连的化学结构片段或键，也可以连接其他接头后再与药物相连。

术语“氨基酸”是指分子结构中含有氨基和羧基，并且氨基和羧基都直接连接在 -CH- 结构上的有机化合物。通式是 $H_2NCHRCOOH$ ，R 为 H、取代或未取代烷基等。根据氨基连结在羧酸中碳原子的位置，可分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ ……-氨基酸。在生物界中，构成天然蛋白质的氨基酸具有其特定的结构特点，即其氨基直接连接在 α -碳原子上，即 α -氨基酸，包括甘氨酸（Glycine）、丙氨酸（Alanine）、缬氨酸（Valine）、亮氨酸（Leucine）、异亮氨酸（Isoleucine）、

35

苯丙氨酸(Phenylalanine)、色氨酸(Tryptophan)、酪氨酸(Tyrosine)、天冬氨酸(Aspartic acid)、组氨酸(Histidine)、天冬酰胺(Asparagine)、谷氨酸(Glutamic acid)、赖氨酸(Lysine)、谷氨酰胺(Glutamine)、甲硫氨酸(Methionine)、精氨酸(Arginine)、丝氨酸(Serine)、苏氨酸(Threonine)、半胱氨酸(Cysteine)、脯氨酸(Proline)等。非天然氨基酸如瓜氨酸。如本领域技术人员所公知的，非天然氨基酸并不构成天然蛋白质，因此也不参与本公开中抗体的合成。本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968)中所述。

简称	缩写	名称	结构
G	Gly	甘氨酸 Glycine	
A	Ala	丙氨酸 Alanine	
V	Val	缬氨酸 Valine	
L	Leu	亮氨酸 Leucine	
I	Ile	异亮氨酸 Isoleucine	
F	Phe	苯丙氨酸 Phenylalanine	
W	Trp	色氨酸 Tryptophan	
Y	Tyr	酪氨酸 Tyrosine	
D	Asp	天冬氨酸 Aspartic acid	

H	His	组氨酸 Histidine	
N	Asn	天冬酰胺 Asparagine	
E	Glu	谷氨酸 Glutamic acid	
K	Lys	赖氨酸 Lysine	
Q	Gln	谷氨酰胺 Glutamine	
C	Cit	瓜氨酸 Citrulline	

术语“载药量”是指偶联物群体中，每个偶联物分子载有的药物平均数量，也可以表示为药物量和蛋白或多肽的比值。载药量的范围可以是每个蛋白或多肽连接 1-20 个，例如 1-15 个，例如 1-10 个神经氨酸酶抑制剂（D）。在本公开的实施方式中，载药量表示为 n，示例性的可以为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意两数值之间数值的均值。例如 1-10，例如 1-8，或 2-8，或 2-7，或 3-8，或 3-7，或 3-6，或 4-7，或 4-6，或 4-5 的均值。可用常规方法如 UV/可见光光谱法、质谱、ELISA 试验、单抗分子大小变异体测定法（CE-SDS）和 HPLC 特征鉴定偶联反应后每个偶联物的药物平均数量。

本公开单抗分子大小变异体测定法（CE-SDS）可采用十二烷基硫酸钠毛细管电泳（CE-SDS）紫外检测方法，在还原和非还原条件下，依据分子量大小，按毛细电泳法（2015 年版《中国药典》0542），定量测定重组单克隆抗体产品的纯度。

本公开的一个实施方式中，神经氨酸酶抑制剂通过连接单元偶联在配体的 N 端氨基和/或赖氨酸残基的ε-氨基上，一般地，偶联反应中能与抗体偶联的药物分子数将小于理论上的最大值。

可以用以下非限制性方法控制偶联物的载量，包括：

- (1) 控制连接试剂和单抗的摩尔比，
- (2) 控制反应时间和温度，
- (3) 选择不同的反应试剂。

术语“抗体”涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，

只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（Fv 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区（HVR）和 4 个序列相对保守的骨架区（FR）。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区（CDR）。每条轻链可变区（LCVR）和重链可变区（HCVR）由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体，例如人源化抗体和全人源抗体。

术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能用鼠制备抗体。制备时用特定抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。

术语“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，也称为 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（在因特网 www.mrccpe.com.ac.uk/vbase 可获得），以及在 Kabat, E.A. 等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力和成熟后的人源化抗体。进一步描述参与人源化可使用小鼠抗体的方法的文献包括，例如 Queen 等，Proc., Natl.Acad.Sci.USA, 88, 2869, 1991 和 Winter 及其同事的方法 [Jones 等，Nature, 321, 522(1986), Riechmann, 等，Nature, 332, 323-327(1988), Verhoeyen, 等，Science, 239, 1534(1988)]。

术语“全人源抗体”、“全人抗体”或“完全人源抗体”，也称“全人源单克隆抗体”，其抗体的可变区和恒定区都是人源的，去除免疫原性和毒副作用。单克隆抗体的发展经历了四个阶段，分别为：鼠源性单克隆抗体、嵌合性单克隆抗体、人源化单克隆抗体和全人源单克隆抗体。

本公开为全人源单克隆抗体。全人抗体制备的相关技术主要有：人杂交瘤技术、EBV 转化 B 淋巴细胞技术、噬菌体显示技术(phage display)、转基因小鼠抗体制备技术(transgenic mouse)和单个 B 细胞抗体制备技术等。

术语“抗原结合片段”是指抗体的保持特异性结合抗原的能力的一个或多个片段。已显示
5 可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')₂ 片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) 单结构域或 dAb 片段 (Ward 等人,(1989)Nature341 : 544-546)，其由 VH 结构域组成；和(vi) 分离的互补决定区
10 (CDR) 或(vii) 可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的 CDR 的组合。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链 Fv(scFv)；参见，例如，Bird 等人(1988)Science242 :423-426；和 Huston 等人 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结
15 合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体。

Fab 是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割 H 链的 224 位的氨基酸残基)处理 IgG 抗体分子
20 所获得的片段中的具有约 50,000 的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中 H 链 N 端侧的约一半和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

F(ab')₂ 是通过用酶胃蛋白酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约 100,000 并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个 Fab 区的抗体片段。

Fab'是通过切割上述 F(ab')₂ 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约 50,000 并具有抗原结
25 合活性的抗体片段。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab'片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab'来生产所述 Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域；VH)和抗体轻链可变结构域(或区域；VL)的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-
30 VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个重复的变体 (Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448)。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人(1995), Protein Eng.8:725-731, Choi 等人(2001), Eur.J.Immunol.31:94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001), Cancer Immunol.描述。

术语“CDR”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。所述 6 个 CDR 的最常用的定义之一由 Kabat E.A. 等人, (1991)Sequences of proteins of immunological
35 interest.NIH Publication91-3242)提供。如本文中使用的，CDR 的 Kabat 定义只应用于轻链可变

结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3(CDR L1、CDR L2、CDR L3 或 L1、L2、L3)，以及重链可变结构域的 CDR2 和 CDR3(CDR H2、CDR H3 或 H2、H3)。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每个轻链可变区中存在三个 CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公开方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”
5 编号规则（参见 Kabat 等(1991)，*“Sequences of Proteins of Immunological Interest”*，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则（参见 Al-Lazikani 等人，(1997)JMB 273: 927-948）和 ImMunoGenTics(IMGt)编号规则（参见 Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)）等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；轻链可变域(VL)中的 CDR
10 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义，CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-
15 102(HCDR3)和人 VL 中的氨基酸残基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)构成。遵循 IMGt 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-102(CDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和 89-97(CDR3)。遵循 IMGt 规则，抗体的 CDR 区可以使用程序 IMGt/DomainGap Align 确定。

术语“Fc 结构域单体”或“Fc 单体”是指如下多肽链，其包括至少一个铰链结构域及第二
20 及第三抗体恒定结构域(C_H2 及 C_H3)或其功能片段(例如，能够(i)与另一 Fc 结构域单体二聚以形成 Fc 结构域，及(ii)结合于 Fc 受体，或其片段)。一些实施方案中，一个 Fc 结构域单体从 N 端到 C 端顺序含有一个铰链结构域、一个 C_H2 和一个 C_H3。所述 Fc 结构域单体可为任何免疫球蛋白抗体同型，包括 IgG、IgE、IgM、IgA 或 IgD(例如，IgG)。另外，所述 Fc 结构域单体可为 IgG 亚型(例如，IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 或 IgG4)(例如，IgG1)。如本文所述的
25 偶联物中的 Fc 结构域单体可含有相对于野生型 Fc 结构域单体序列的一种或多种改变(例如，1-10、1-8、1-6、1-4 种氨基酸取代、添加或缺失)，其改变 Fc 结构域与 Fc 受体之间的相互作用。合适改变的实例为本领域中已知的。在某些实施方案中，人 Fc 结构域单体(例如 IgG 重链，诸如 IgG1)包含自 Asn201、Asn208、Glu216、Asp221、Lys222 或 Cys226 中任一者延伸至 Lys447 处的重链羧基端的区。所述 Fc 区的 C 端 Lys447 可或可不存在，不影响所述 Fc 区
30 的结构或稳定性。除非本文中另外规定，否则所述 IgG 或 Fc 结构域单体中氨基酸残基的编号是根据针对抗体的 EU 编号系统，所述系统也称为 Kabat EU 指数，如例如 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

术语“抗体框架”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合
35 环(CDR)的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。表位通常以独特的空间构象包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连

续的氨基酸（参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G.E.Morris，Ed.(1996)）。

术语“白蛋白”是指包含对应于天然存在的白蛋白(例如，人血清白蛋白)或其变体(诸如天然存在的白蛋白的经工程改造变体)的氨基酸的多肽。白蛋白的变体包括多态性、诸如结构域及子结构域的片段及融合蛋白(例如，具有诸如多肽接头的 C 端或 N 端融合白蛋白)。白蛋白可仅包括天然存在的氨基酸残基，或可包括一个或多个非天然存在的氨基酸残基。一些实施方案中，非天然存在的氨基酸残基(例如，非天然存在的氨基酸残基的侧链)可用作本公开化合物(例如，神经氨酸酶抑制剂单体或二聚体，包括借助于接头)的附接点。

术语“白蛋白结合结构域”涵盖具有结合白蛋白活性的多肽，以及结合白蛋白的抗体或其片段。“白蛋白结合结构域”对白蛋白(例如人血清白蛋白)具有亲和力且能结合所述白蛋白的功能。白蛋白结合结构域可具有不同来源，例如人工合成或源自人、小鼠或大鼠。白蛋白结合结构域可为直链或环状的，包括本领域技术人员已知的任何白蛋白结合结构域。例示性白蛋白结合结构域参见 US2005/0287153 中，本公开中全文引入该专利。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于 10^{-7}M ，例如：大约小于 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力(KD)结合。

术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，例如是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制(例如，非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics(IMGT)的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员，例如大肠杆菌(Escherichia coli)或沙门氏菌(Salmonella)的菌株；芽孢杆菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)；肺炎球菌(Pneumococcus)；链球菌(Streptococcus)和流感嗜血菌(Haemophilus influenzae)。适当的微生物包括酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和毕赤酵母(Pichia pastoris)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和 NS0 细胞。

本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的

cDNA 序列, 可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术, 哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化, 特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如, 用含调整过的缓冲液的 A 或 G
5 Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 PH 梯度法洗脱结合的抗体, 用 SDS-PAGE 检测抗体片段, 收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体, 也可以用常规方法去除, 比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻, 如-70℃, 或者冻干。

氨基酸序列“同一性”指在比对氨基酸序列及必要时引入间隙, 以达成最大序列同一性百分比, 且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分, 第一序列中与第二序列中的氨基酸
10 残基同一的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的, 比对可以通过属于本领域技术的范围内的多种方式来实现, 例如使用公开可得到的计算机软件, 诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数, 包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

15 术语“肽”是指介于氨基酸和蛋白质之间的化合物片段, 由 2 个或 2 个以上氨基酸分子通过肽键相互连接而成, 是蛋白质的结构与功能片段, 如激素、酶类等本质上都是肽。

术语“糖”是指由 C、H、O 三种元素组成的生物大分子, 可分为单糖、二糖和多糖等。

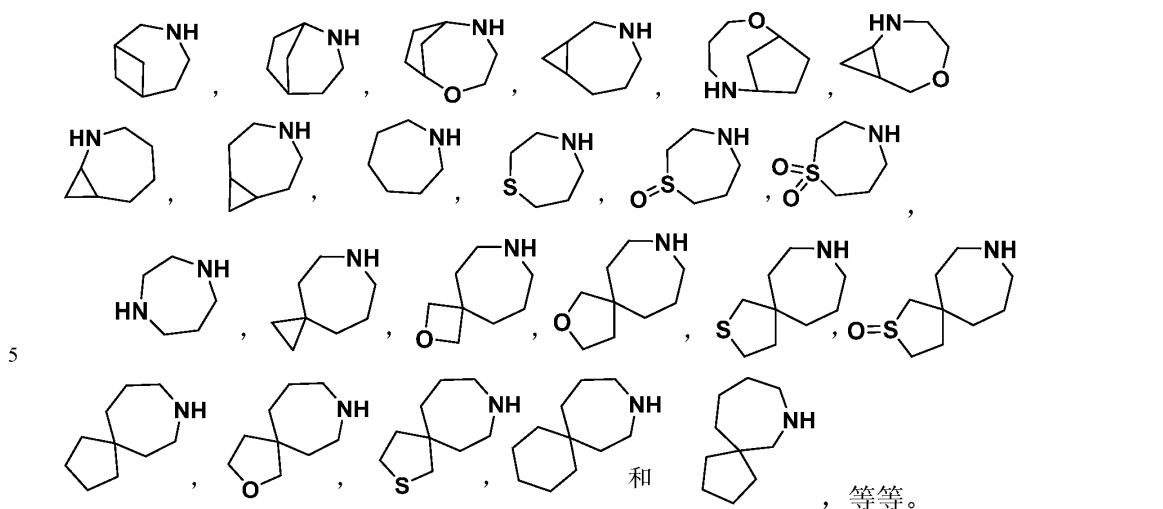
术语“荧光探针”是指在紫外-可见-近红外区有特征荧光, 并且其荧光性质(激发和发射波长、强度、寿命和偏振等)可随所处环境的性质, 如极性、折射率、粘度等改变而灵敏地改变
20 的一类荧光性分子, 其与核酸(DNA 或 RNA)、蛋白质或其他大分子结构非共价相互作用而使一种或几种荧光性质发生改变, 可用于研究大分子物质的性质和行为。

“烷基”指饱和的脂族烃基团, 包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链基团。含有 1 至 6 个碳原子的烷基。非限制性实施例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基及其各种支链异构体等。
25 烷基可以是取代的或未取代的, 当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 优选一个或多个以下基团, 独立地选自卤素、羟基、氧代、氰基、氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、3 至 6 元环烷基或 3 至 6 元杂环烷基, 所述烷基、烷氧基、环烷基或杂环烷基任选被卤素、羟基、硝基、氰基或氨基所取代(此处需要根据权利要求调整!)

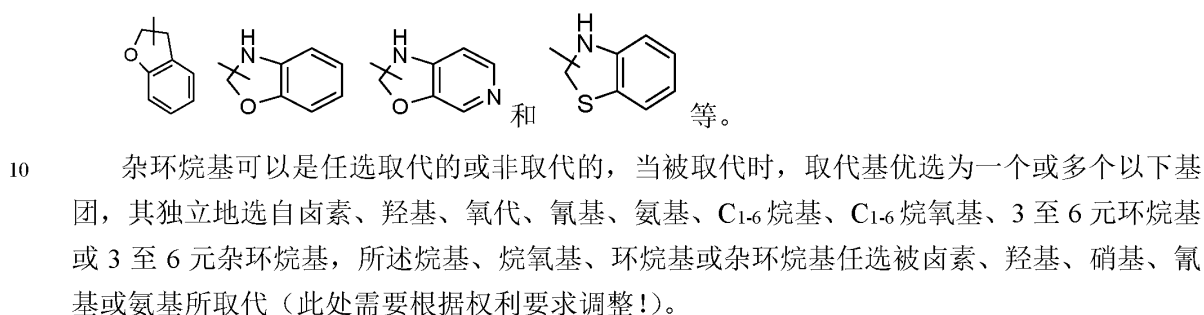
术语“环烷基”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基, 环烷基环包含 3 至 20 个碳
30 原子, 优选包含 3 至 6 个碳原子。单环环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环己二烯基等; 多环环烷基包括螺环、并环和桥环的环烷基。环烷基可以是取代的或未取代的, 当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 优选一个或多个以下基团, 独立地选自卤素、羟基、氧代、氰基、氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、3 至 6 元环烷基或 3 至 6 元杂环烷基, 所述烷基、烷氧基、环烷基或杂环烷基任选被卤
35 素、羟基、硝基、氰基或氨基所取代(此处需要根据权利要求调整!)

术语“杂环烷基(Heterocycloalkyl)”指饱和或部分不饱和单环或多环环状烃取代基, 其包含 3 至 20 个环原子, 其中一个或多个环原子为选自氮、氧或 S(O)_m(其中 m 是整数 0 至 2)的

杂原子，但不包括-O-O-、-O-S-或-S-S-的环部分，其余环原子为碳。优选包含 3 至 12 个环原子，其中 1~4 个是杂原子；更优选包含 3 至 7 个环原子。“杂环烷基”非限制性实例包括：



所述杂环烷基环可以稠合于芳基或杂芳基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂环烷基，其非限制性实例包括：



10 杂环烷基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、羟基、氧代、氰基、氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、3至6元环烷基或3至6元杂环烷基，所述烷基、烷氧基、环烷基或杂环烷基任选被卤素、羟基、硝基、氰基或氨基所取代（此处需要根据权利要求调整！）。

15 术语“烷氧基”指-O-(烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷氧基的非限制性实例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基。烷氧基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、羟基、氧代、氰基、氨基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、3至7元环烷基或3至7元杂环烷基，所述烷基、烷氧基、环烷基或杂环烷基任选被卤素、羟基、硝基、氰基或氨基所取代（此处需要根据权利要求调整！）。

同理，“环烷氧基”、“杂环烷氧基”同上述“烷氧基”定义。

20 术语“烷硫基”指-S-(烷基)，其中烷基的定义如上所述。烷硫基的非限制性实例包括：甲硫基、乙硫基、丙硫基、丁硫基。烷硫基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自 C₁₋₆烷氧基、3至6元环烷基、3至6元杂环烷基、3至6元环烷氧基、3至6元杂环烷氧基、C₁₋₆烷硫基、3至6元环烷硫基、3至6元杂环烷硫基，所述烷氧基、环烷基、杂环烷基、环烷氧基、杂环氧基、烷硫基、环烷硫基、杂环烷硫基任选被卤素、羟基、氰基或氨基所取代（此处需要根据权利要求调整！）。

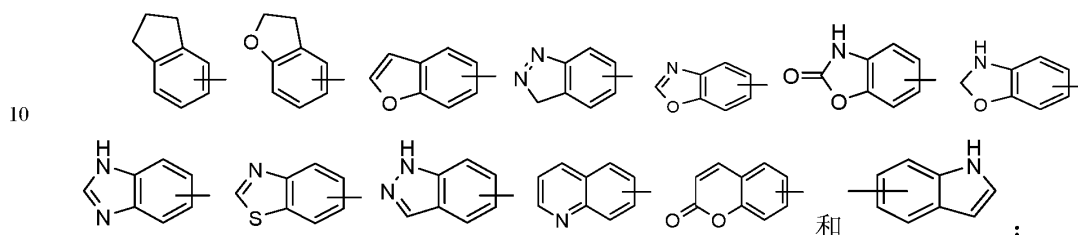
同理，“环烷硫基”、“杂环烷硫基”同上述“烷硫基”定义。

“一价基团”是指一个化合物从“形式上”消除一个单价的原子或基团。“亚基”则是指化合物从“形式上”消除两个单价或一个双价形成的原子或原子团。

术语“亚烷基”表示烷烃分子中去除 2 个氢原子后余下的部分，包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链亚基团。含有 1 至 6 个碳原子的亚烷基，非限制性实施例包括亚甲基 (-CH₂-)、亚乙基 (如-CH₂CH₂-或-CH(CH₃)-)。如无特殊说明，亚烷基可以是取代的或未取代的，当被取代时，取代基可以在任何可使用的连接点上被取代，优选一个或多个以下基团，独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷氧基 (此处需要根据权利要求调整!)

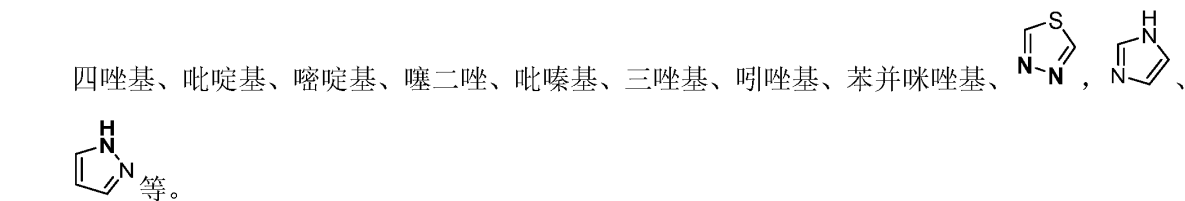
同理，“亚烷氧基”、“亚烯基”、“亚烯氧基”、“亚环烷基”、“亚杂环烷基”的定义如“亚烷基”。

术语“芳基”指具有共轭的 π 电子体系的 6 至 14 元全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团，优选为 6 至 12 元，例如苯基和萘基。所述芳基环可以稠合于杂芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为芳基环，其非限制性实例包括：

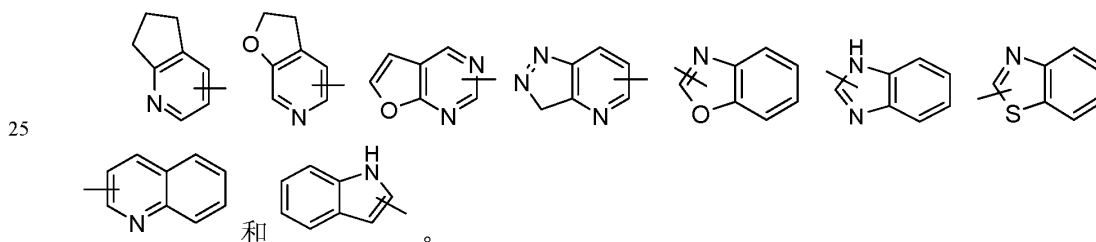


芳基可以是取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，其独立地选自卤素、羟基、氧代、硝基、氰基、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、3 至 6 元环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、C₃₋₈ 环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基，所述 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₂₋₆ 烯氧基、C₂₋₆ 炔氧基、3 至 6 元环烷氧基、3 至 6 元杂环烷氧基、3 至 8 元环烯氧基、5 至 6 元芳基或杂芳基任选被一个或多个选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷氧基 (此处需要根据权利要求调整!)

术语“杂芳基”指包含 1 至 4 个杂原子、5 至 14 个环原子的杂芳族体系，其中杂原子选自氧、硫和氮。杂芳基优选为 6 至 12 元，更优选为 5 元或 6 元。例如。其非限制性实例包括：



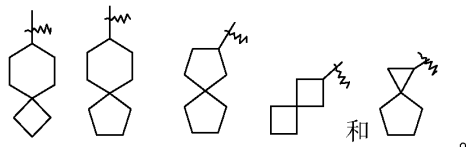
所述杂芳基环可以稠合于芳基、杂环烷基或环烷基环上，其中与母体结构连接在一起的环为杂芳基环，其非限制性实例包括：



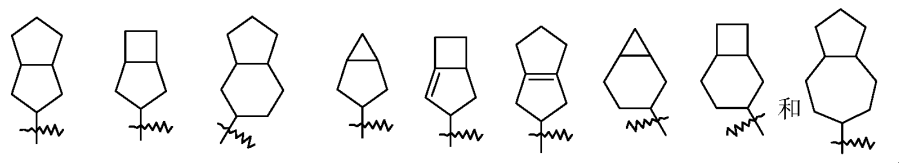
杂芳基可以是任选取代的或非取代的，当被取代时，取代基优选为一个或多个以下基团，

其独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷氧基（此处需要根据权利要求调整！）。

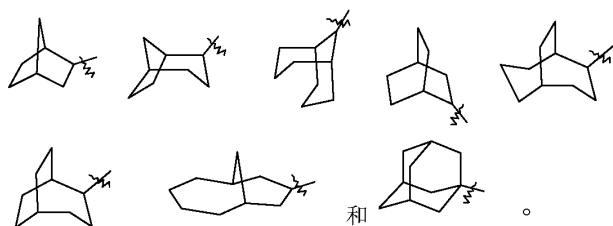
术语“螺环”指两环共用一个原子的化合物。螺环烷基的非限制性实例包括：



- 5 术语“并环”指两个或两个以上环通过共用两个相邻的原子并合而成的化合物。并环烷基的非限制性实例包括：



- 10 术语“桥环”指两个或两个以上环状结构彼此共用两个非相邻的环原子所形成的结构。根据组成环的数目可以分为双环、三环、四环或多环桥环烷基，优选为双环、三环或四环，更有选为双环或三环。桥环烷基的非限制性实例包括：



术语“杂环”指构成环的原子除碳原子外还有其他原子，其包括杂环烷基和杂芳环。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘。

- 15 术语“氰基”指-CN。

术语“氨基”指-NH₂。

术语“硝基”指-NO₂。

术语“氧代”指=O 取代基。

- 20 “取代的”指基团中的一个或多个氢原子，优选为最多 5 个，更优选为 1~3 个氢原子彼此独立地被相应数目的取代基取代。当取代基是酮或氧代(即，=O)时，则原子上有两个(2 个)氢被替代。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选被烷基取代的杂环烷基团”意味着烷基可以但不必须存在，该说明包括杂环烷基团被烷基取代的情形和杂环烷基团不被烷基取代的情形。

- 25 术语“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药物载体”用于本公开的药物，是指能改变药物进入人体的方式和在体内的分布、控制药物的释放速度并将药物输送到靶向器官的体系。药物载体释放和靶向系统能够减少药物降解及损失，降低副作用，提高生物利用度。如可作为载体的高分子表面活性剂由于其独特的两亲性结构，可以进行自组装，形成各种形式的聚集体，优选的实例如胶束、微乳液、凝5 胶、液晶、囊泡等。这些聚集体具有包载药物分子的能力，同时又对膜有良好的渗透性，可以作为优良的药物载体。

术语“赋形剂”是在药物制剂中除主药以外的附加物，也可称为辅料。如片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂；半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分；液体制剂中的防腐剂、10 抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂等均可称为赋形剂。

术语“稀释剂”又称填充剂，其主要用途是增加片剂的重量和体积。稀释剂的加入不仅保证一定的体积大小，而且减少主要成分的剂量偏差，改善药物的压缩成型性等。当片剂的药物含有油性组分时，需加入吸收剂吸收油性物，使保持“干燥”状态，以利于制成片剂。

本公开中化合物可以含有一个或多个不对称中心，因此可以产生对映异构体、非对映异构15 体，并且其可以根据绝对立体化学定义为(R)-或(S)-或用于氨基酸的(D)-或(L)-的其它立体异构形式。本公开包括所有可能异构体以及其外消旋和光学纯的形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备，或者可以使用常规方法例如色谱法和分级结晶制备。用于制备/分离各个对映体的常规方法包括从合适的光学纯前体手性合成或使用例如手性高效液相色谱法(HPLC)的外消旋物(或盐或衍生物的外消旋物)拆分。当20 本文描述的化合物含有烯双键或其它几何不对称性中心，除非另有说明，否则其意味着所述化合物包括 E 和 Z 几何异构体。而且，所有的互变异构形式也意味着包括在内。

本公开所述化合物的化学结构中，键“/”表示未指定构型，即如果化学结构中存在手性异构体，键“/”可以为“”或“”，或者同时包含“”和“”两种构型。本公25 开所述化合物的化学结构中，键“”并未指定构型，即可以为 Z 构型或 E 构型，或者同时包含两种构型。

“立体异构体”指通过相同的键键合但具有不同的三维结构的相同原子组成的化合物，其不可互换。本公开中预期各种立体异构体及其混合物，并且包括“对映异构体”，其指其分子彼此为不能重叠的镜像的两种立体异构体。

“互变异构体”指质子从分子的一个原子转移到同一分子的另一个原子。本公开中包括任30 何所述化合物的互变异构体。

本公开还包括一些与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本公开化合物。可结合到本公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 35 等。

除另有说明，当一个位置被特别地指定为氘(D)时，该位置应理解为具有大于氘的天然丰度(其为0.015%)至少1000倍的丰度的氘(即，至少10%的氘掺入)。示例中化合物的具有大于氘的天然丰度可以是至少1000倍的丰度的氘、至少2000倍的丰度的氘、至少3000倍的丰度的氘、至少4000倍的丰度的氘、至少5000倍的丰度的氘、至少6000倍的丰度的氘或更高丰度的氘。本公开还包括各种氘化形式的式(I)化合物。与碳原子连接的各个可用的氢原子可独立地被氘原子替换。本领域技术人员能够参考相关文献合成氘化形式的式(I)化合物。在制备氘代形式的式(I)化合物时可使用市售的氘代起始物质，或它们可使用常规技术采用氘代试剂合成，氘代试剂包括但不限于氘代硼烷、三氘代硼烷四氢呋喃溶液、氘代氢化锂铝、氘代碘乙烷和氘代碘甲烷等。

10

附图说明

图1为测得的本公开的偶联物分子细胞毒性以及抗流感病毒功能的细胞水平。

图2为单次静脉注射给予食蟹猴不同供试品PK曲线。

15 具体实施方式

以下结合实施例进一步描述本公开所述的化合物、可药用盐的制备，但这些实施例并非限制本公开中的范围。

本公开中实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

20

NMR位移(δ)以 10^{-6} (ppm)的单位给出。NMR的测定是用Bruker AVANCE-400核磁仪，测定溶剂为氘代二甲基亚砜(DMSO- d_6)，氘代氯仿($CDCl_3$)，氘代甲醇(CD_3OD)，内标为四甲基硅烷(TMS)。

MS的测定用Shimadzu 2010 Mass Spectrometer或Agilent 6110A MSD质谱仪。

HPLC的测定使用Shimadzu LC-20A systems、Shimadzu LC-2010HT series或安捷伦Agilent 1200 LC 高压液相色谱仪(Ultimate XB-C18 3.0*150mm 色谱柱或Xtimate C18 2.1*30mm 色谱柱)。

手性HPLC分析测定使用Chiralpak IC-3 100*4.6mm I.D., 3 μ m、Chiralpak AD-3 150*4.6mm I.D., 3 μ m、Chiralpak AD-3 50*4.6mm I.D., 3 μ m、Chiralpak AS-3 150*4.6mm I.D., 3 μ m、Chiralpak AS-3 100*4.6mm I.D., 3 μ m、ChiralCel OD-3 150*4.6mm I.D., 3 μ m、Chiralcel OD-3 100*4.6mm I.D., 3 μ m、ChiralCel OJ-H 150*4.6mm I.D., 5 μ m、Chiralcel OJ-3 150*4.6mm I.D., 3 μ m 色谱柱；

30

薄层层析硅胶板使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板，薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是0.15 mm~0.2 mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是0.4 mm~0.5 mm。

柱层析一般使用烟台黄海硅胶100~200目、200~300目或300~400目硅胶为载体。

35

手性制备柱使用DAICEL CHIRALPAK IC (250mm*30mm,10 μ m)或Phenomenex-Amylose-1 (250mm*30mm,5 μ m)。

CombiFlash快速制备仪使用Combiflash Rf150 (TELEDYNE ISCO)。

激酶平均抑制率及 IC₅₀ 值的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司)。

本公开的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成,或可购买自 ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, 韶远化学科技(Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

5 实施例中无特殊说明,反应能够均在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

氢气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氢气气球。

加压氢化反应使用 Parr 3916EKX 型氢化仪和清蓝 QL-500 型氢气发生器或 HC2-SS 型氢化仪。

10 氢化反应通常抽真空,充入氢气,反复操作 3 次。

微波反应使用 CEM Discover-S 908860 型微波反应器。

实施例中无特殊说明,溶液是指水溶液。

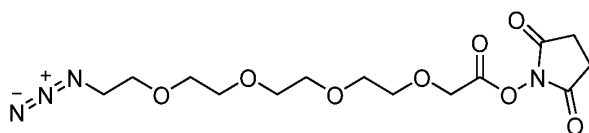
实施例中无特殊说明,反应的温度为室温,为 20℃~30℃。

实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC),反应所使用的展开剂,纯化化合物采
15 用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂体系包括: A: 二氯甲烷/甲醇体系, B: 正己烷/乙酸乙酯体系, C: 石油醚/乙酸乙酯体系, D: 石油醚/乙酸乙酯/甲醇,溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节,也可以加入少量的三乙胺和醋酸等碱性或酸性试剂进行调节。

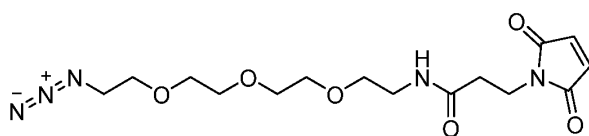
下述实验中所用缩写代表的含义如下:

20 EtOAc: 乙酸乙酯; DCM: 二氯甲烷; DIPEA: *N,N*-二异丙基乙胺; PPTS: 对甲基苯磺酸吡啶盐; Boc: 叔丁氧羰基, MeOH: 甲醇。

PEG4-azido NHS ester:

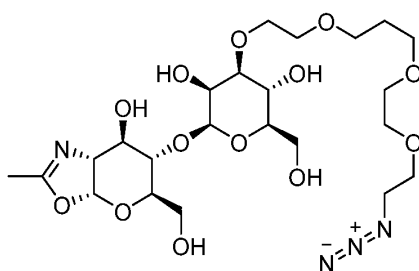


Azido-PEG3-Maleimide:

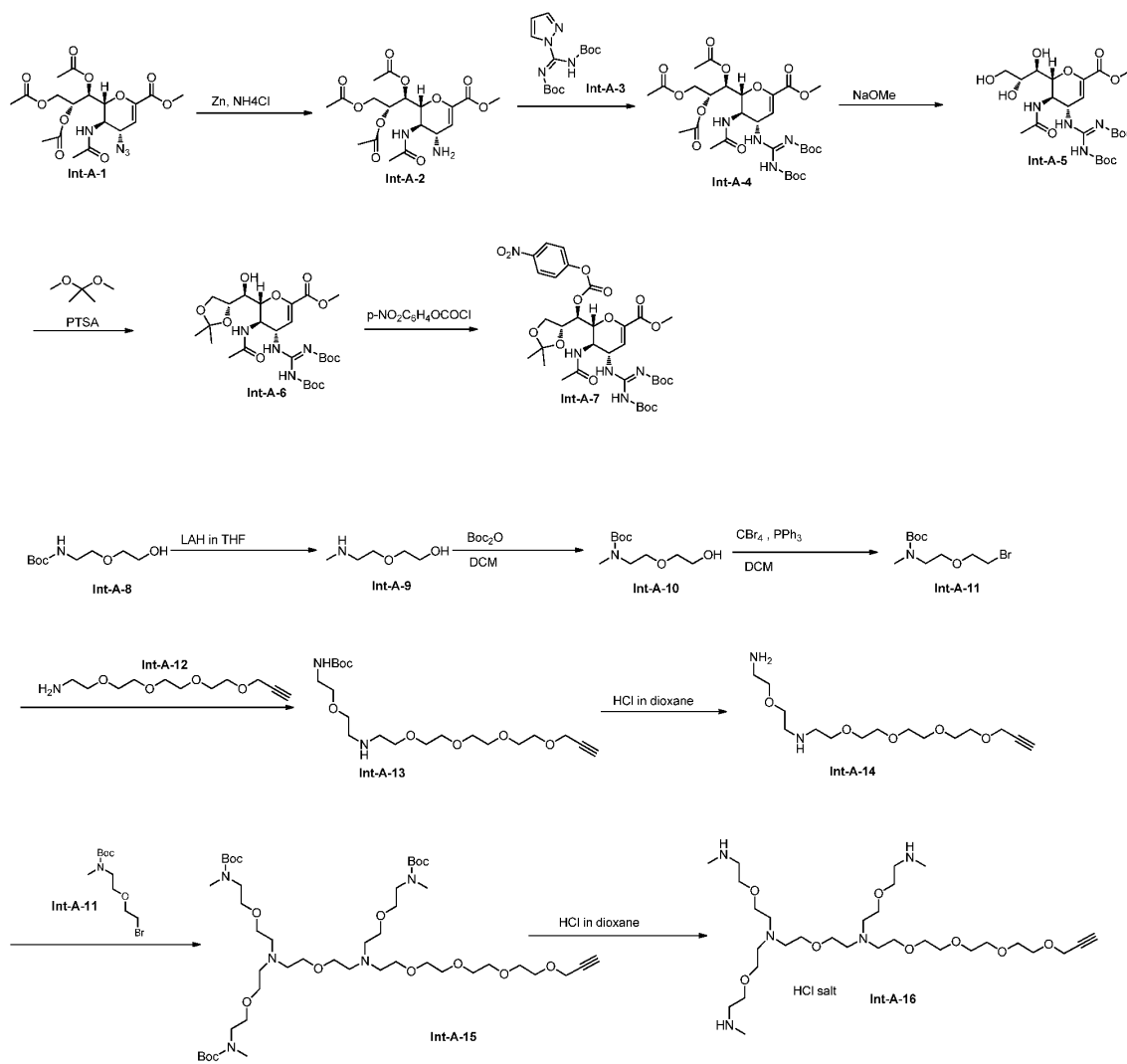


25

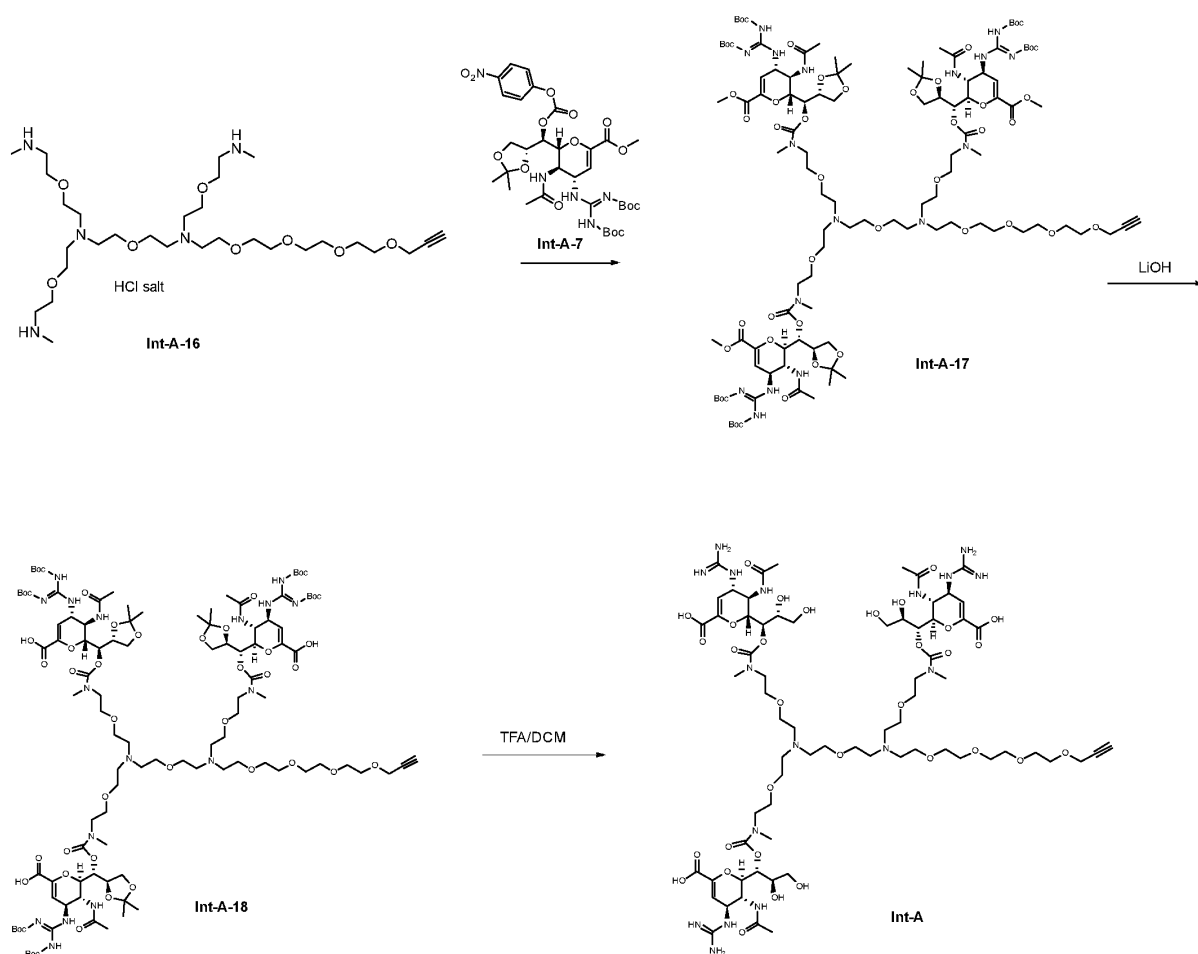
N3-PEG3-Oxa:



实施例 1 中间体 Int-A 的合成



73



步骤 1:

- 5 将化合物(1S,2R)-1-((2R,3R,4S)-3-乙酰氨基-4-叠氮基-6-(甲氧基羰基)-3,4-二氢-2H-吡喃-2-基)丙烷-1,2,3-三乙酸三酯 Int-A-1 (8.5 g, 18.6 mmol)溶于乙醇(90 mL)和水(15 mL)的混合溶液,依次加入氯化铵(3.0 g, 56 mmol)和锌粉(3.9 g, 60 mmol)。反应在 30°C 下搅拌 30 分钟,反应结束后,将反应冷却至 0°C,过滤。滤液浓缩后,加入乙酸乙酯(100 mL),随后过滤,浓缩得到化合物 Int-A-2 (8.0 g, 产率 100%)。

- 10 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.14 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.61 (d, 1H), 4.50–4.15 (m, 2H), 3.78–3.71 (m, 4H), 2.10–2.04 (m, 12H)。

步骤 2:

- 15 将 Int-A-2 (8.0 g, 18.6 mmol)溶于干燥四氢呋喃(80 mL),依次加入 N,N'-二-BOC-1H-1-胍基吡唑 (6.3 g, 20.5 mmol)和三乙胺(4 mL, 27.9 mmol)。反应在室温下搅拌过夜,反应结束后,将反应冷浓缩,加入乙酸乙酯(200 mL),随后依次用水(100 mL)和饱和食盐水(100 mL)洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到粗产品。粗产品经硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯

=1:1)纯化得到化合物 Int-A-4 (11 g, 产率 87.9%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.40 (s, 1H), 8.51 (d, 1H), 6.75 (br, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.46 (d, 1H), 5.31 – 5.24 (m, 1H), 5.12 (t, 1H), 4.64 (dd, 1H), 4.30 – 4.12 (m, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.46 (d, 18H).

5

步骤 3:

将化合物 Int-A-4 (12.3 g, 18.3 mmol)溶于无水甲醇(240 mL), 加入甲醇钠溶液(0.5 M in MeOH, 6.5 mL, 3.25 mmol)。反应在室温下搅拌 30 分钟, 反应结束后, 加入 IRN-77 树脂中和至 pH 中性。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-A-5 (9.0 g, 粗产品)直接用于下一步。

10

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.37 (s, 1H), 8.59 (d, 1H), 8.23 (d, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.36 – 5.18 (m, 2H), 4.21 (d, 1H), 4.11 – 3.82 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.61 (d, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.50 (d, 18H).

步骤 4:

15 将化合物 Int-A-5 (9.0 g, 粗产品) 溶于丙酮(180 mL), 依次加入 2,2-二甲氧基丙烷(24 mL, 196 mmol)和对甲苯磺酸一水合物(740 mg, 3.92 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 将反应液进行浓缩。粗产品经硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=1:1)纯化得到化合物 Int-A-6(8.5 g, 两步产率 79.2%)。

20 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.36 (s, 1H), 8.65 (d, 1H), 8.02 (d, 1H), 5.80 (d, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.16 (t, 1H), 4.43 – 4.36 (m, 1H), 4.21 – 4.07 (m, 2H), 4.05 – 3.93 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.50 (d, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.50 (d, 18H), 1.43 (s, 3H), 1.37 (s, 3H).

步骤 5:

25 将化合物 Int-A-6 (8.2 g, 14.0 mmol)溶于干燥二氯甲烷(160 mL), 冰浴下加入 4-二甲氨基吡啶(13.7 g, 112 mmol), 随后批量加入 4-硝基苯基氯甲酸酯(16.8 g, 84 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 将反应液进行浓缩。粗产品经乙酸乙酯稀释后析出固体, 过滤。滤液浓缩后经硅胶柱色谱(石油醚:乙酸乙酯=1:1)纯化得到化合物 Int-A-7 (5.2 g, 产率 49.4%)。

30 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.35 (s, 1H), 8.56 (d, 1H), 8.35 (d, 2H), 7.54 (d, 2H), 6.60 (d, 1H), 5.90 (d, 1H), 5.26 (d, 1H), 5.23 – 5.16 (m, 1H), 4.49 – 4.37 (m, 2H), 4.27 – 4.20 (m, 2H), 4.18 – 4.12 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.49 (s, 18H), 1.42 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

步骤 6:

35 0°C 下, 往化合物 Int-A-8 (5.0 g, 24.4 mmol)的四氢呋喃溶液中滴加四氢锂铝的四氢呋喃溶液 (2.5 M, 29.2 mL, 73.0 mmol), 滴加完后, 升至 80°C 搅拌过夜。反应完后, 将冷却下来的反应液缓慢倒入含有十水合硫酸钠 (10 g) 的四氢呋喃 (30 mL) 体系中, 室温搅拌一小时。过滤除去固体, 母液旋干, 得到化合物 Int-A-9 (2.90 g, 粗产物)。未做进一步纯化, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 120.2 $[M+1]^+$ 。

步骤 7:

0°C 下, 往化合物 Int-A-9 (2.90 g, 粗品) 的二氯甲烷 (50 mL) 溶液中加入二碳酸二叔丁酯 (6.67 g, 30.5 mmol) 的二氯甲烷 (20 mL) 溶液, 室温搅拌过夜。浓缩反应液后硅胶柱层析 (二氯甲烷/乙酸乙酯=10/1-2/1) 得到化合物 Int-A-10 (5.27 g, 两步产率: 98.5%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.77 – 3.68 (m, 2H), 3.60-3.55 (m, 4H), 3.42 (s, 2H), 2.91 (s, 3H), 1.46 (s, 9H)。

10 步骤 8:

0°C 下, 往化合物 Int-A-10 (4.17 g, 19.0 mmol) 的二氯甲烷 (60 mL) 溶液中加入三苯基磷 (1.79 g, 28.5 mmol), 继续搅拌 15 分钟后分批加入四溴化碳 (9.45 g, 28.5 mmol), 加完后反应液室温搅拌 1 小时。反应液直接旋干, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/乙酸乙酯=10/1-2/1) 得到化合物 Int-A-11 (4.14 g, 产率 77.2%)。

15 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.77 (t, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.50-3.41 (m, 4H), 2.93 (s, 3H), 1.46 (s, 9H)。

步骤 9:

往化合物 Int-A-11 (1.16 g, 4.11 mmol) 的 N,N -二甲基甲酰胺 (20 mL) 溶液中加入化合物 Int-A-12 (1.00 g, 4.32 mmol) 和碳酸钾 (0.896 g, 6.48 mmol), 然后于 50°C 下加热搅拌过夜。反应液浓缩去除 N,N -二甲基甲酰胺, 加水 (10 mL), 二氯甲烷萃取 (10 mL*3), 合并有机相并用饱和食盐水 (20 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1) 得到化合物 Int-A-13 (0.860 g, 产率 49.9%)。

25 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.24 (s, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.75-3.64 (m, 13H), 3.61 (t, 2H), 3.52 (t, 2H), 3.35-3.26 (m, 2H), 2.95-2.82 (m, 4H), 2.45 (s, 1H), 1.44 (s, 9H)。

步骤 10:

0°C 下, 往化合物 Int-A-13 (0.76 g, 1.82 mmol) 的二氯甲烷 (5 mL) 溶液中加入 HCl 的二氧六环溶液 (4M, 10 mL)。然后在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-A-14 (0.72 g, 粗产品)。未做进一步纯化, 直接用于下一步。

30 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.80 (br, 2H), 8.02 (br, 3H), 4.15 (s, 2H), 3.78 – 3.73 (m, 2H), 3.72 – 3.67 (m, 2H), 3.64 – 3.52 (m, 14H), 3.45 (t, 1H), 3.25-3.15 (m, 4H), 3.02 (q, 2H)。

步骤 11:

35 往化合物 Int-A-14 (0.56 g, 1.42 mmol) 的 N,N -二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中加入化合物 Int-A-11 (1.98 g, 8.76 mmol) 和碳酸钾 (1.21 g, 8.76 mmol), 然后 60°C 下加热搅拌过夜。反应液减压浓缩除去 N,N -二甲基甲酰胺, 加水 (15 mL), 二氯甲烷萃取 (15 mL x 3), 合并

有机相使用饱和食盐水 (20 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇 =20/1-10/1) 以及高效液相色谱法 (Waters XBridge, 19*150mm, 30*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到化合物 Int-A-15 (587 mg, 产率 36.3%)。

5

步骤 12:

0°C 下, 往化合物 Int-A-15 (280 mg, 0.303 mmol) 的二氯甲烷 (2.0 mL) 溶液中加入 HCl 的二氧六环溶液 (4M, 5.0 mL)。然后在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-A-16 (0.245 g, 粗产品)。未做进一步纯化, 直接用于下一步。

10 MS m/z (ESI): 622.6 [M+1]⁺。

步骤 13:

将化合物 Int-A-16 (100 mg 粗品, 0.124 mmol) 溶于干燥 N,N-二甲基甲酰胺 (6 mL), 冰浴下加入 N,N-二异丙基乙胺 (370 mg, 2.9 mmol), 随后加入化合物 Int-A-7 (380 mg, 0.51 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 加入乙酸乙酯 (15 mL), 随后依次用水 (10 mL) 和饱和食盐水 (15 mL) 洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯: 甲醇 = 8:1) 纯化得到化合物 Int-A-17 (140 mg, 产率 45.9%)。

15

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.39 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 6.34 – 6.10 (m, 3H), 5.89 (s, 3H), 5.31 – 5.20 (m, 6H), 4.43 – 4.02 (m, 9H), 4.17 – 4.00 (m, 10H), 3.79 (s, 9H), 3.70 – 3.47 (m, 34H), 3.28–3.21 (m, 3H), 3.00 – 2.93 (m, 9H), 2.78–2.62 (m, 10H), 1.89 (s, 9H), 1.48 (d, 54H), 1.43 (s, 3H), 1.38 – 1.34 (m, 15H)。

20

步骤 14:

将化合物 Int-A-17 (140 mg, 0.057 mmol) 溶于甲醇 (10 mL), 冰浴下加入氢氧化锂一水合物 (22 mg, 0.52 mmol) 的水溶液 (10 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77 树脂中和至 pH 中性。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-A-18 (110 mg, 产率 80%)。

25

MS m/z (ESI): 806.6 ([M+3]/3)⁺。

步骤 15:

将化合物 Int-A-18 (110 mg, 0.045 mmol) 溶于二氯甲烷 (3 mL), 加入三氟乙酸 (6 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 旋干, 随后加入水 (3 mL), 并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后, 经高效液相色谱法 (Waters XBridge, 19*150mm, 30*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到标题产物 Int-A (30.1 mg, 产率 31%)。

30

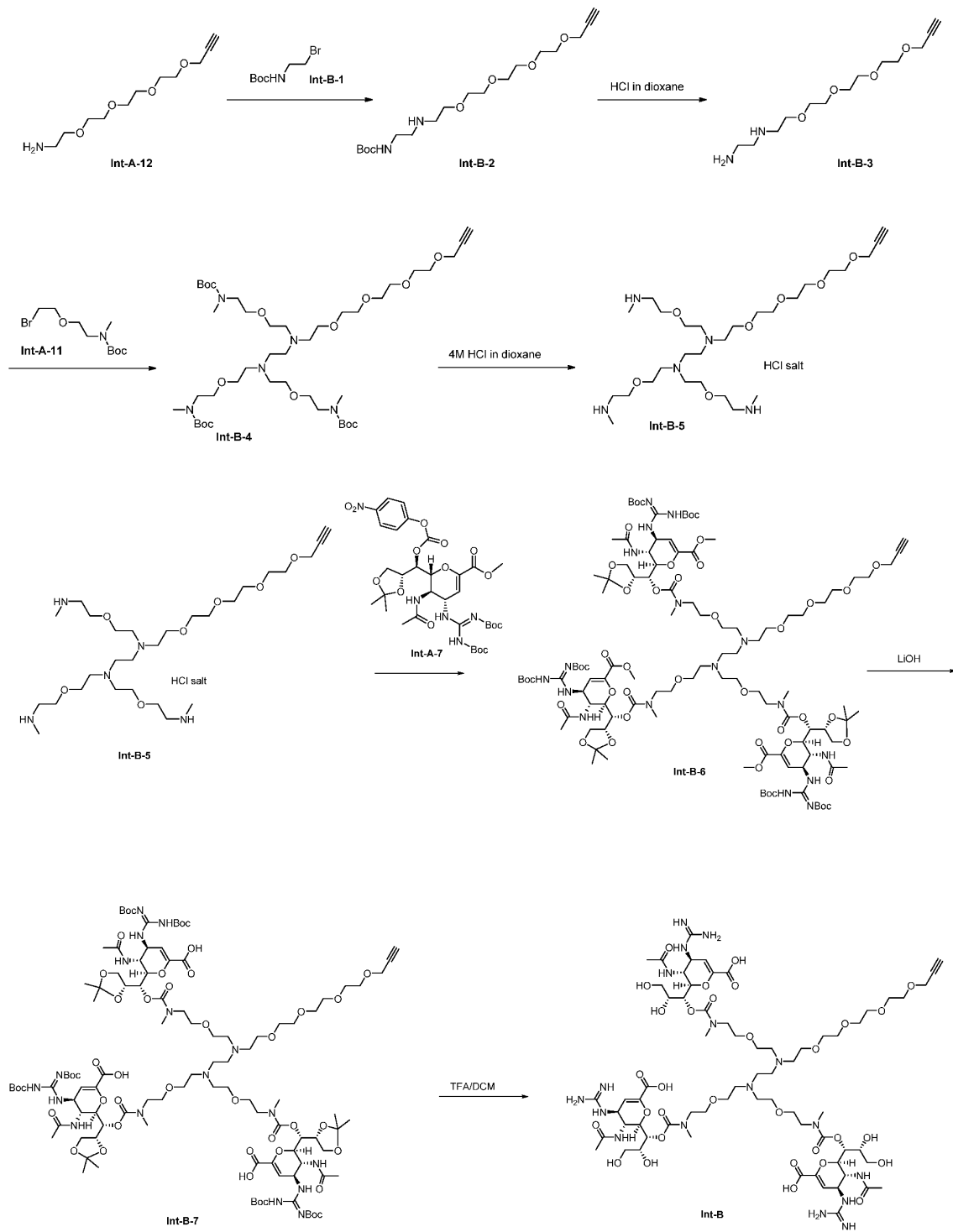
35

MS m/z (ESI): 848.7 ([M+2]/2)⁺, 566.0 ([M+3]/3)⁺;

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.83 (s, 3H), 4.93 (d, 3H), 4.51 (d, 3H), 4.42–4.33 (m, 3H), 4.24

– 4.14 (m, 5H), 4.09-3.76 (m, 17H), 3.7 – 3.41 (m, 37H), 3.22-3.13 (m, 4H), 2.94-2.81 (m, 9H), 1.87 (s, 9H)。

实施例 2 中间体 Int-B 的合成



步骤 1:

往化合物 Int-B-1 (3.0 g, 13.4 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (45 mL) 溶液中加入化合物 Int-A-12 (3.1 g, 13.4 mmol) 和碳酸钾 (3.93 g, 28.5 mmol), 然后反应液在 55°C 下加热搅拌过夜。减压浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水 (60 mL), 而二氯甲烷萃取 (60 mL x 3), 合并有机相使用饱和食盐水 (60 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1) 得到化合物 Int-B-2 (0.810 g, 产率 16.1%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.16 (br, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.71 – 3.59 (m, 14H), 3.28-3.21 (m, 2H), 2.71-2.82 (m, 4H), 2.44 (s, 1H), 1.44 (s, 9H).

步骤 2:

0°C 下, 往化合物 Int-B-2 (800 mg, 2.14 mmol) 的二氯甲烷 (5.0 mL) 溶液中加入 HCl 的二氧六环溶液 (4M, 10 mL)。体系在室温下搅拌 4 小时, 浓缩得到化合物 Int-B-3 (0.75 g, 粗品), 直接用于下一步。

步骤 3:

往化合物 Int-B-3 (0.677 g, 2.0 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 mL) 溶液中加入化合物 Int-A-11 (2.20 g, 7.8 mmol) 和碳酸钾 (1.35 g, 9.8 mmol), 然后在 65°C 下加热搅拌过夜。反应液减压浓缩除去 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水 (15 mL), DCM 萃取 (15 mL x 3), 合并有机相使用饱和食盐水 (20 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 硅胶柱层析 (二氯甲烷/甲醇 =20/1-10/1) 纯化得到化合物 Int-B-4 (970 mg, 产率 56.6%)。

MS m/z (ESI): 439.9 ([M+2]/2)⁺。

步骤 4:

0°C 下, 往化合物 Int-B-4 (406 mg, 0.462 mmol) 的二氯甲烷 (1.0 mL) 溶液中加入 HCl 的二氧六环 (4M, 6.0 mL) 溶液。然后在室温下搅拌 1 小时, 浓缩得到化合物 Int-B-5 (355 mg, 粗品), 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 578.7 [M+1]⁺。

步骤 5:

将化合物 Int-B-5 (215 mg, 0.28 mmol) 溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺 (6 mL), 冰浴下加入 *N,N*-二异丙基乙胺 (1 mL, 6.2 mmol), 随后加入化合物 Int-B-5 (940 mg, 1.25 mmol)。反应在室温下搅拌 16 h, 反应结束后, 加入乙酸乙酯 (30 mL), 随后依次用水 (15 mL) 和食盐水 (15 mL) 洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经制备层析板 (乙酸乙酯: 甲醇=8:1) 纯化得到化合物 Int-B-6 (170 mg, 产率 25.1%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.39 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 6.37-6.12 (m, 3H), 5.89 (s, 3H), 5.43-5.15 (m, 6H), 4.47-3.95 (m, 15H), 3.79 (s, 9H), 3.72 – 3.46 (m, 30H), 3.38-3.12 (m, 3H), 3.05-2.55

(m, 23H), 1.89 (s, 9H), 1.48 (s, 54H), 1.39 – 1.33 (m, 18H).

步骤 6:

将化合物 Int-B-6 (140 mg, 0.058 mmol) 溶于甲醇 (10 mL), 0°C 下加入氢氧化锂一水合物 (22 mg, 0.51 mmol) 的水溶液(10 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77 树脂中和至 pH 中性。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-B-7 (150 mg, 粗品), 产物直接进行下一步反应。

MS m/z (ESI): 792.0 ([M+3]/3)⁺。

10 步骤 7:

将上一步化合物 Int-B-7 (150 mg, 粗品) 溶于二氯甲烷 (2 mL), 加入三氟乙酸 (4 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 旋干, 随后加入水 (4 mL), 并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后, 经高效液相色谱法 (Waters XBridge, 19*150mm, 30*150mm, 5μm; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-B (61.2 mg, 两步产率 47.5%)。

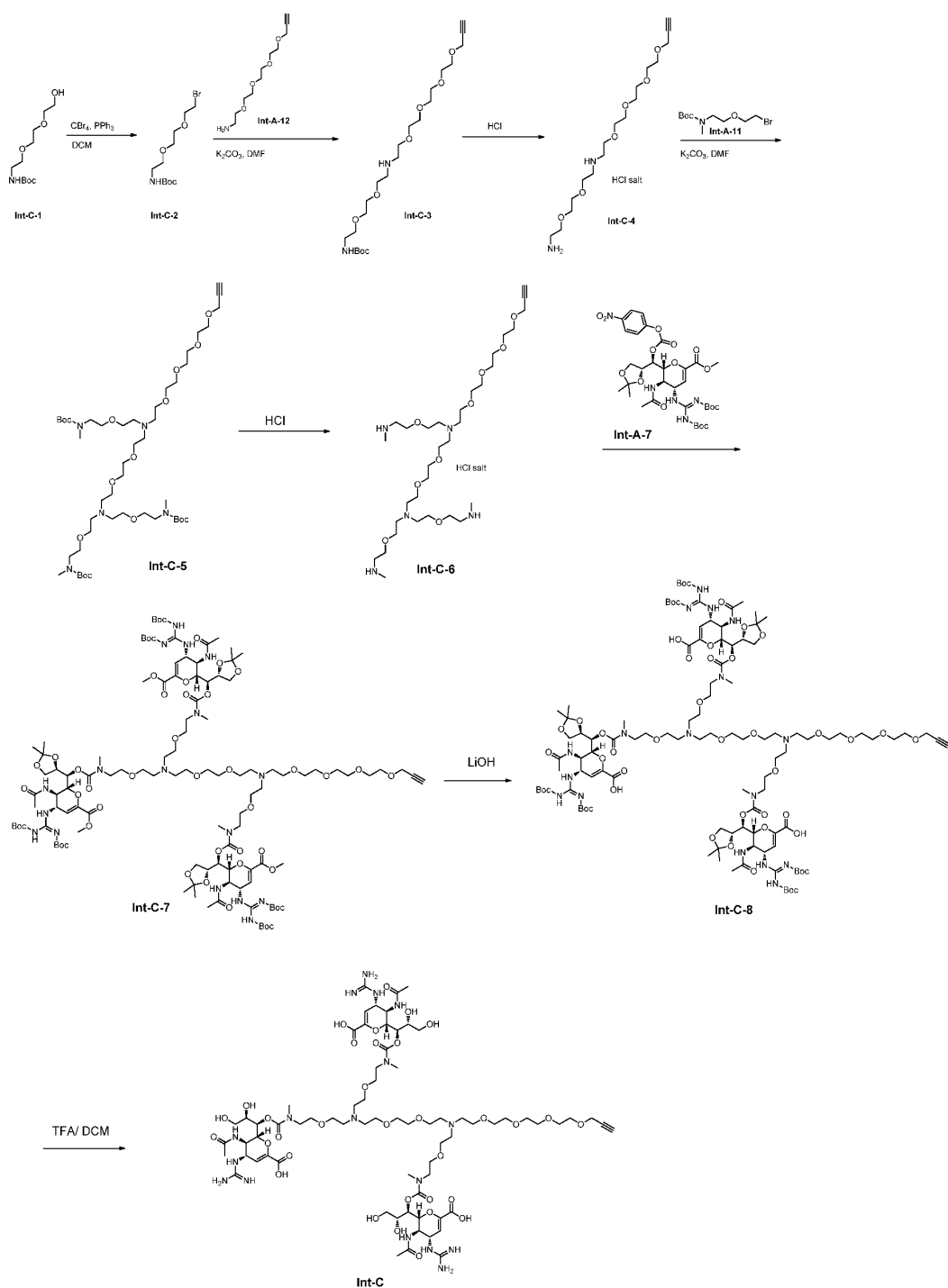
MS m/z (ESI): 827.1 ([M+2]/2)⁺, 551.8 ([M+3]/3)⁺;

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.90 (s, 3H), 5.01 (d, 3H), 4.54 (d, 3H), 4.40 (d, 3H), 4.26 – 4.16 (m, 5H), 4.04 – 3.97 (m, 3H), 3.88 – 3.55 (m, 36H), 3.53 – 3.12 (m, 14H), 3.03-2.77 (m, 10H), 1.95 (s, 9H).

20

实施例 3 中间体 Int-C 的合成

80



步骤 1:

0°C下, 往化合物 Int-C-1 (5.0 g, 20 mmol)的二氯甲烷(100 mL)溶液中加入三苯基膦(7.89 g, 30 mmol), 继续搅拌并分批加入四溴化碳(9.97 g, 30 mmol), 加完后室温搅拌。反应完后反应液减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/乙酸乙酯=10/1-4/1)得到化合物 Int-C-2 (4.70 g, 产率: 75.3%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.01 (br, 1H), 3.82 (t, 2H), 3.66-3.62 (m, 4H), 3.55 (t, 2H), 3.49

(t, 2H), 3.33-3.32 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

步骤 2:

往化合物 Int-C-2 (2.70 g, 8.64 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(40 mL)溶液中加入化合物 Int-A-12 (2 g, 8.64 mmol)和碳酸钾(2.39 g, 17.30 mmol)。反应体系 55°C下加热搅拌过夜。反应液
5 浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(20 mL), 二氯甲烷萃取(20 mL× 3)。合并有机相使用饱和氯化钠溶液(40 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-C-3 (2 g, 产率: 50.0%)。

MS m/z (ESI): 463.3 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.24 (br, 1H), 4.21 (d, 2H), 3.69-3.60 (m, 20H), 3.54 (t, 2H),
10 3.49 (s, 1H), 3.32-3.31 (m, 2H), 2.84 (t, 4H), 2.44 (t, 1H), 1.44 (s, 9H).

步骤 3:

0°C下, 往化合物 Int-C-3 (1.50 g, 3.24 mmol)的二氯甲烷(5 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 20 mL)。反应体系在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-C-4 (1.41 g, 粗品), 直接用下一步反应。

15 MS m/z (ESI): 363.2 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.89 (br, 2H), 8.05 (br, 3H), 4.15 (d, 2H), 3.72 (t, 4H), 3.66-3.60 (m, 6H), 3.59-3.51 (m, 12H), 3.46 (t, 1H), 3.21-3.10 (m, 4H), 2.97 (dd, 2H).

步骤 4:

往化合物 Int-C-4 (1.41 g, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)溶液中加入化合物
20 Int-A-11 (4.09 g, 14.49 mmol)和碳酸钾(2.69 g, 19.46 mmol), 然后体系在 65°C下加热搅拌过夜。反应液浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(15 mL), 二氯甲烷萃取(15 mL× 3), 合并有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-C-5 (1.30 g, 两步产率: 41.5%)。

MS m/z (ESI): 483.9 ([M+2H]/2)⁺.

25 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.20 (d, 2H), 3.72-3.62 (m, 12H), 3.61-3.47 (m, 24H), 3.36 (s, 6H), 2.90 (s, 9H), 2.77 (d, 10H), 2.44 (s, 1H), 1.45 (s, 27H).

步骤 5:

0°C下, 往化合物 Int-C-5 (400 mg, 0.41 mmol)的二氯甲烷(5.0 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 10 mL)。然后反应体系室温下搅拌 1 小时, 浓缩得到化合物 Int-C-6 (350 mg,
30 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 666.5 [M+H]⁺.

步骤 6:

往化合物 Int-C-6 (350 mg, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)溶液中加入化合物
Int-A-7 (933 mg, 1.24 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(533 mg, 4.12 mmol), 然后室温搅拌 12 小
35 时。反应液室温浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 反相制备得到化合物 Int-C-7 (302 mg, 两步产率: 29.4%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.40 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 6.21-6.06 (m, 4H), 5.88 (s, 3H), 5.27-

5.20 (m, 6H), 4.41-4.35 (m, 6H), 4.20 (d, 2H), 4.17-3.99 (m, 10H), 3.79 (s, 9H), 3.69 (d, 4H), 3.66-3.61 (m, 7H), 3.60-3.48 (m, 27H), 3.28-3.21 (m, 4H), 2.99 (s, 6H), 2.94 (s, 3H), 2.75 (br, 10H), 2.47-2.46 (m, 1H), 1.90-1.80 (m, 9H), 1.48 (d, 52H), 1.40-1.33 (m, 18H).

步骤 7:

- 5 0°C下, 往化合物 Int-C-7 (200 mg, 79.88 μ mol)的甲醇(11.2 mL)溶液中加入氢氧化锂一水合物(13.3 mg, 0.32 mmol)的水溶液(11.2 mL), 然后 20°C下搅拌 12 小时。反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=7, 过滤后的母液浓缩得到化合物 Int-C-8 (197 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 821.3 ([M+3H]/3)⁺.

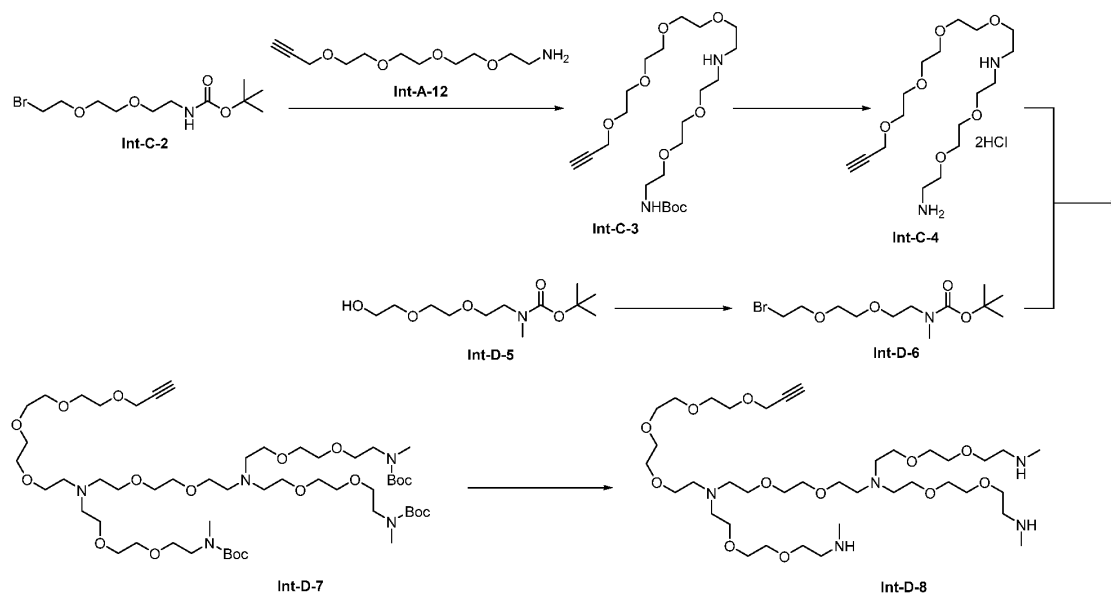
- 10 步骤 8:

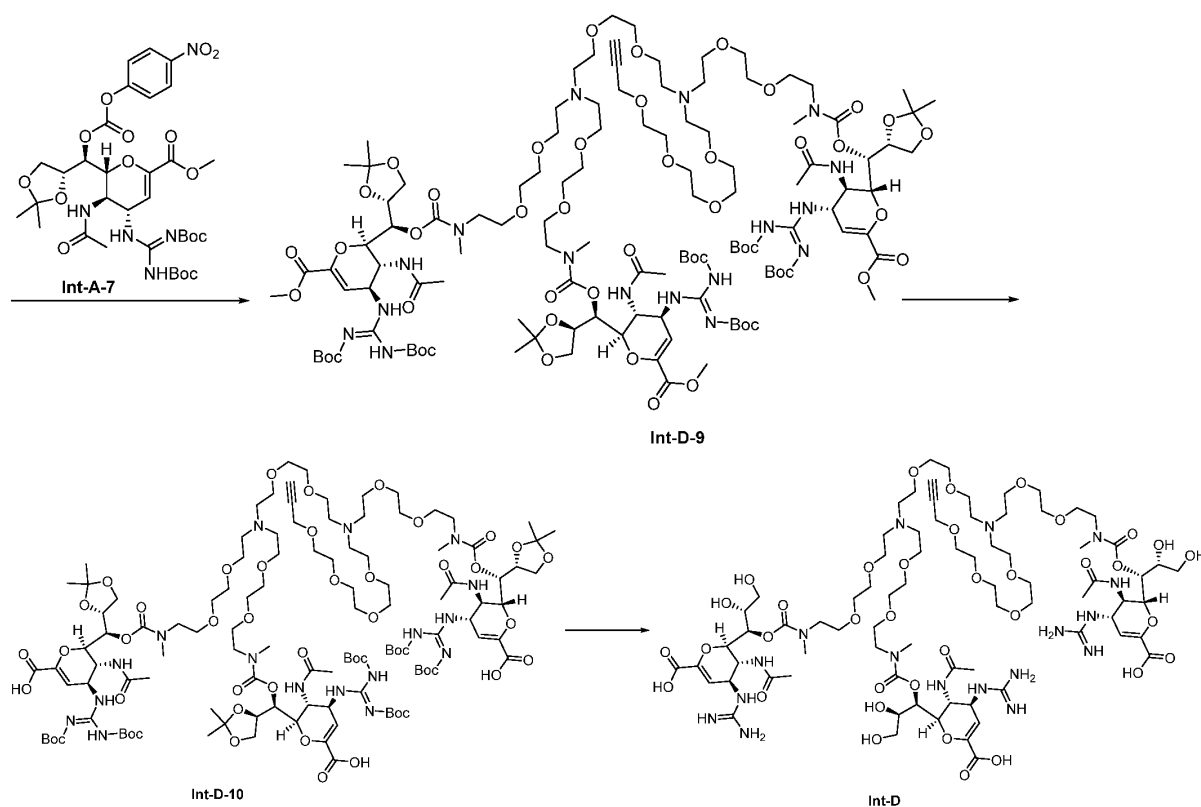
0°C下, 往化合物 Int-C-8 (197 mg, 上一步粗品)的二氯甲烷(5.0 mL)溶液中加入三氟乙酸(5.0 mL)。然后 20°C下搅拌 1 小时, 浓缩后加水(5 mL), 搅拌 2 小时, 减压浓缩, 经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-C 三氟醋酸盐(43 mg, 两步产率: 23.3%)。

- 15 MS m/z (ESI): 870.9 ([M+2H]/2)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.92 (s, 3H), 5.02-5.04 (m, 3H), 4.56 (dd, 3H), 4.43 (d, 3H), 4.31-4.18 (m, 6H), 4.09-3.90(m, 17H), 3.74-3.68 (m, 22H), 3.62-3.42 (m, 17H), 3.26-3.14 (m, 5H), 3.01 (s, 5H), 2.98-2.92 (m, 4H), 1.97 (s, 9H).

20 实施例 4 中间体 Int-D 的合成





5 步骤 1: 化合物 **Int-C-3** 的合成

将化合物 **Int-A-12** (1 g, 4.32 mmol, 购自韶远)、化合物 **Int-C-2** (1.35 g, 4.32 mmol, 采用文献方法制备而得, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2012, vol. 22, # 2, p. 1151 - 1155) 溶解于 DMF 中搅拌。加入碳酸钾 (1.2 g, 8.65 mmol) 后加热至 55°C 反应 16 小时。反应液浓缩至干, 加入二氯甲烷 (20 mL) 和水 (10 mL) 分液, 水相用二氯甲烷 (20 mL × 2) 萃取, 有机相合并, 用无水硫酸钠干燥后浓缩至干, 过柱纯化 (DCM:MeOH=0~10%) 得 1.12 g 化合物 **Int-C-3** (产率: 55.99%)。

MS m/z (ESI): 463.3[M+1]⁺。

15 步骤 2: 化合物 **Int-C-4** 的合成

将化合物 **Int-C-3** (300 mg, 0.648 mmol) 溶解于二氯甲烷 (1.5 mL) 中冰水浴下搅拌, 加入盐酸二氧六环溶液 (6 mL) 后自然升至室温反应 2 小时。反应液浓缩至干得到 290 mg 粗品, 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 363.2[M+1]⁺。

20 步骤 3: 化合物 **Int-D-6** 的合成

将化合物 **Int-D-5** (2.51 g, 9.53 mmol, 采用 WO2019/195609 方法制备而得) 溶解于二氯甲烷 (30 mL) 中搅拌, 加入三苯基膦 (3.75 g, 14.30 mmol) 室温下搅拌 15 分钟后分批加入

四溴化碳 (4.74 g, 14.30 mmol)。加完后室温反应 1 小时。反应液浓缩至干, 过柱纯化 (DCM: EA = 0~50%) 得到 2.87 g 化合物 **Int-D-6** (产率: 92.28%)。

MS m/z (ESI): 348.1 [M+23]⁺。

5 **步骤 4: 化合物 Int-D-7 的合成**

将化合物 **Int-C-4** (917 mg, 2.11 mmol) 和化合物 **Int-D-6** (2.4 g, 7.37 mmol) 溶解于 DMF (10 mL) 中搅拌。加入碳酸钾 (2.91 g, 21.06 mmol) 后加热至 65℃ 反应 16 小时。反应液浓缩至干后加入二氯甲烷 (20 mL) 和水 (10 mL) 分液。水相用二氯甲烷 (20 mL x 2) 萃取, 有机相合并, 用无水硫酸钠干燥后, 过滤, 浓缩至干, 过柱纯化 (DCM: MeOH = 0~10%),
10 得 1.47 g 化合物 **Int-D-7** (产率: 63.55%)。

MS m/z (ESI): 550.0 [M/2+1]⁺。

步骤 5: 化合物 Int-D-8 的合成

将化合物 **Int-D-7** (500 mg, 0.455 mmol) 溶解于二氯甲烷 (5 mL) 后冰水浴下搅拌, 加入
15 盐酸二氧六环溶液 (12.52 mL) 后自然升至室温反应 2 小时。反应液浓缩至干得 481.17 mg 粗品, 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 798.3 [M+1]⁺。

步骤 6: 化合物 Int-D-9 的合成

20 将化合物 **Int-D-8** (446.27 mg, 0.456 mmol) 溶解于 DMF (5 mL) 中搅拌。加入 DIPEA (589.50 mg, 4.56 mmol), 室温搅拌 5 分钟后加入化合物 **Int-A-7** (1.03 g, 1.37 mmol), 室温反应 16 小时, 过柱纯化 (碳酸氢铵: 甲醇 = 70~95%), 得 590.9 mg 化合物 **Int-D-9** (收率: 49.15%)。

MS m/z (ESI): 1318.7 [M/2+1]⁺。

25

步骤 7: 化合物 Int-D-10 的合成

将化合物 **Int-D-9** (200 mg, 75.87 μmol) 溶解于甲醇 (15 mL) 中搅拌, 加入水 (15 mL) 后加入氢氧化锂一水合物 (31.84 mg, 758.75 μmol), 加完后室温反应 16 小时。向反应中加入离子交换树脂 IRN77 调节 pH=7 后过滤, 滤饼用甲醇淋洗后滤液浓缩至干, 得到 0.197 g 粗
30 品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1297.6 [M/2+1]⁺。

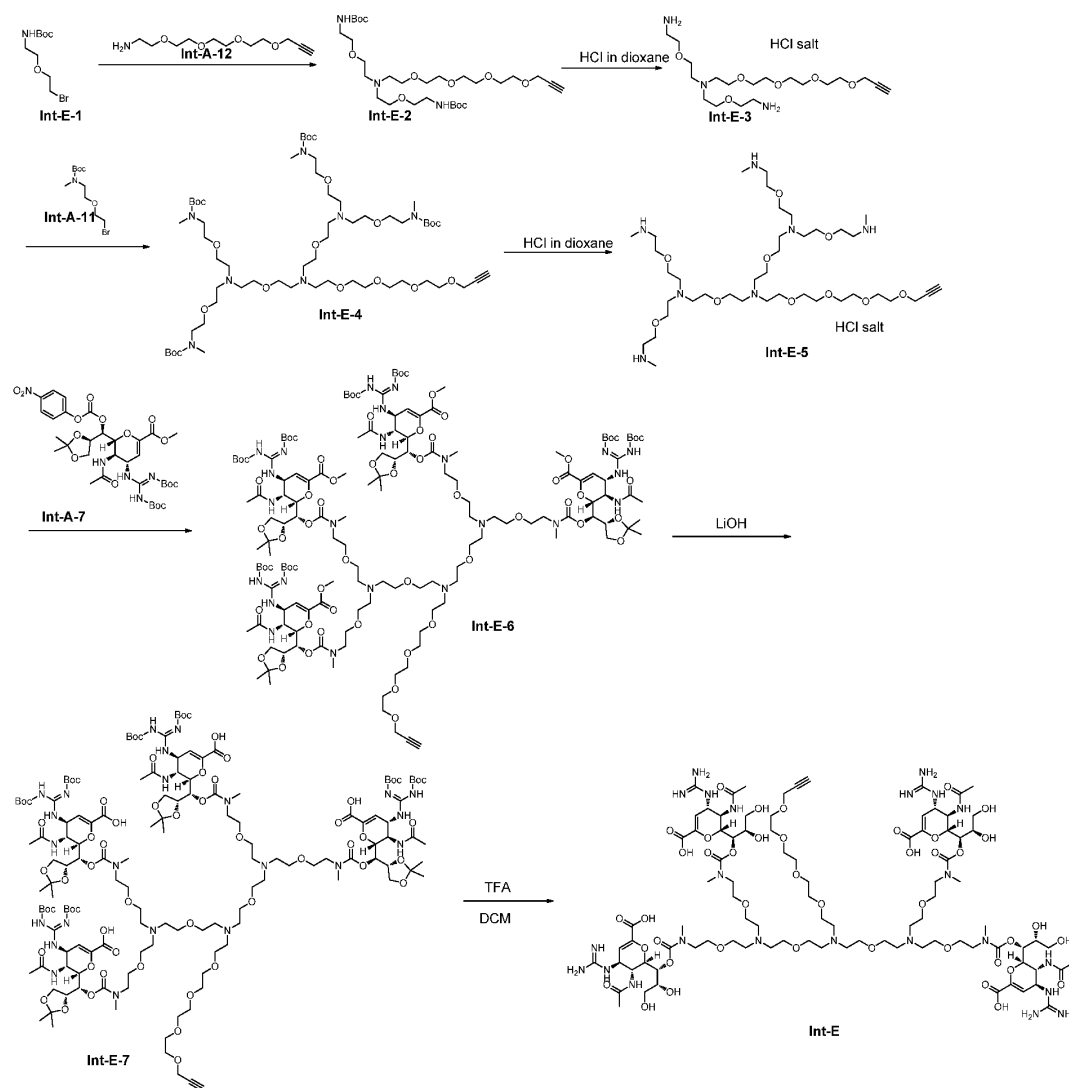
步骤 8: 化合物 Int-D 的合成

将化合物 **Int-D-10** (0.197 g, 75.95 μmol) 溶解于 DCM (6 mL) 中室温搅拌, 加入 TFA
35 (8.88 g, 77.85 mmol) 后室温搅拌 5 小时, 反应液浓缩至干。加入水 (6 mL) 后室温下搅拌 3.5 小时, 过柱纯化 (TFA: 乙腈 = 70~85%), 得 117.7 mg 化合物 **Int-D** (收率: 63.43%)。

MS m/z (ESI): 937.3 [M/2+1]⁺, 625.3 [M/3+1]⁺, 469.1 [M/4+1]⁺

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.89-5.80 (m, 3H), 5.05-4.95 (m, 5H), 4.58-4.49 (m, 3H), 4.46-4.38 (m, 3H), 4.29-4.13 (m, 5H), 4.09-3.96 (m, 3H), 3.96-3.75 (m, 15H), 3.75-3.44 (m, 56H), 3.22-3.10 (m, 3H), 3.02-2.89 (m, 10H), 1.98-1.91 (m, 9H)。

5 实施例 5 中间体 Int-E 的合成



步骤 1:

往化合物 Int-A-12 (1.50 g, 6.49 mmol)的 N,N -二甲基甲酰胺(25 mL)溶液中加入化合物
 10 Int-E-1 (3.82 g, 14.25 mmol)和碳酸钾(2.68 g, 19.39 mmol), 然后体系在 55°C 下加热搅拌 12 小时。反应液浓缩去除 N,N -二甲基甲酰胺, 加水(20 mL), 二氯甲烷萃取(20 mL $\times$ 3), 合并有机相用饱和氯化钠溶液(30 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=30/1-10/1)得到化合物 Int-E-2 (1.95 g, 产率: 49.6%)。

MS m/z (ESI): 606.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.21 (d, 2H), 3.74–3.58 (m, 14H), 3.58–3.46 (m, 10H), 3.30 (d, 4H), 2.78–2.75 (m, 6H), 2.44 (t, 1H), 1.44 (s, 18H).

步骤 2:

0°C下, 往化合物 Int-E-2 (1.85 g, 3.05 mmol)的二氯甲烷(2.0 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 10 mL)。然后 0°C下搅拌 1 小时, 浓缩得到化合物 Int-E-3 (1.51 g, 粗品), 直接用下一步反应。

步骤 3:

往化合物 Int-E-3 (1.51 g, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(20 mL)溶液中加入化合物 Int-A-11 (4.70 g, 16.66 mmol)和碳酸钾(2.93 g, 21.20 mmol), 然后体系在 65°C下加热搅拌过夜。
10 反应液浓缩去除溶剂, 加水(15 mL), 二氯甲烷萃取(15 mL $\times$ 3), 有机相盐水(20 mL)洗涤, 合并有机相使用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-E-4 (1.32 g, 两步产率: 35.8%)。

MS m/z (ESI): 606.0 $[\text{M}+2\text{H}]^+/2^+$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.20 (d, 2H), 3.71–3.59 (m, 16H), 3.51–3.49 (m, 29H), 3.37 (s, 8H), 2.90 (s, 12H), 2.76 (s, 12H), 1.45 (s, 36H).

步骤 4:

0°C下, 往 Int-E-4 (250 mg, 0.21 mmol)的二氯甲烷(3.0 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 6 mL), 然后在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-E-5 (220 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

20 步骤 5:

往 Int-E-5 (220 mg, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)溶液中加入化合物 Int-A-7 (619 mg, 0.82 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(266 mg, 2.06 mmol), 然后室温搅拌 12 小时。反应液室温浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 反相制备得到化合物 Int-E-6 (270 mg, 两步产率: 40.1%)。

MS m/z (ESI): 816.0 $[\text{M}+4\text{H}]^+/4^+$.

25 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.39 (s, 4H), 8.41 (d, 4H), 6.23–6.11 (m, 5H), 5.89 (s, 4H), 5.27–5.10 (m, 8H), 4.38–4.36 (m, 8H), 4.20 (d, 2H), 4.17–3.96 (m, 12H), 3.79 (s, 12H), 3.72–3.61 (m, 12H), 3.59–3.53 (m, 14H), 3.49–3.47 (m, 20H), 3.23 (s, 4H), 2.99 (s, 6H), 2.94 (s, 4H), 2.76–2.73 (m, 16H), 2.47 (t, 1H), 1.89 (s, 12H), 1.48 (d, 72H), 1.40–1.32 (m, 23H).

步骤 6:

30 0°C下, 往 Int-E-6 (200 mg, 61.34 μmol)的甲醇(12.3 mL)溶液中加入氢氧化锂一水合物(26 mg, 0.62 mmol)的水溶液(12.3 mL), 然后 20°C下搅拌 12 小时。反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=7, 过滤后的母液浓缩得到化合物 Int-E-7 (196 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 802.0 $[\text{M}+4\text{H}]^+/4^+$.

35 步骤 7:

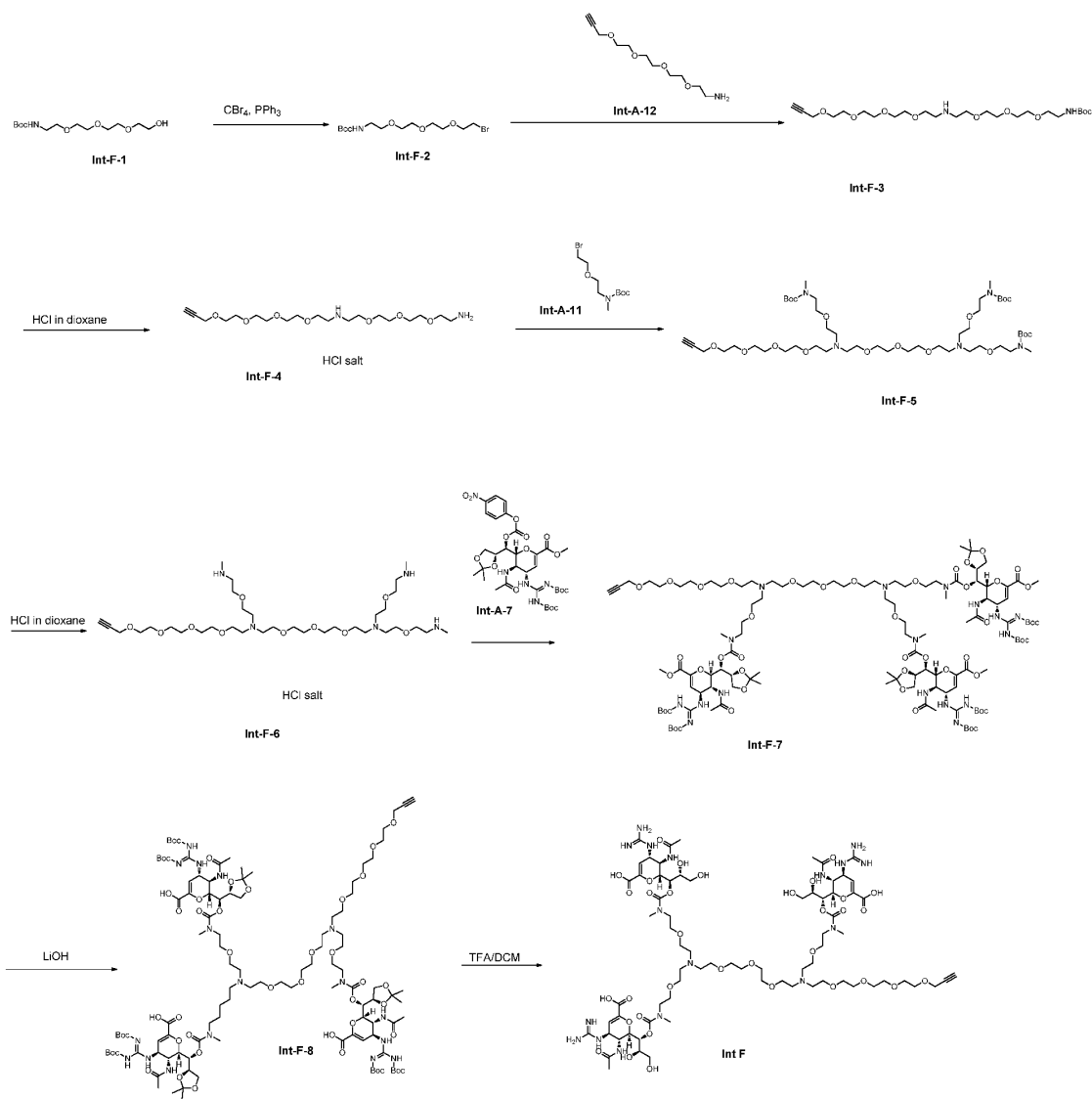
0°C下, 往化合物 Int-E-7 (196 mg, 上一步粗品)的二氯甲烷(5 mL)溶液中加入三氟乙酸(10 mL)。然后 20°C下搅拌 2 小时, 浓缩后加水(10 mL), 搅拌 2 小时。减压浓缩, 高效液相色谱

谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备得到标题产物 Int-E 三氟醋酸盐(50 mg, 两步产率: 26.9%)。

MS m/z (ESI): 1121.8 [M+2H]²⁺.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.99 (s, 4H), 4.86 (t, 4H), 4.38(t, 4H), 4.26 (d, 4H), 4.15 (s, 2H),
5 4.05-3.92 (m, 8H), 3.69-3.42 (m, 53H), 3.18-2.94 (m, 4H), 2.79-2.54 (m, 28H), 1.75 (s, 12H).

实施例 6 中间体 Int-F 的合成



步骤 1:

10 0°C下, 往化合物 Int-F-1 (2.50 g, 8.52 mmol)的二氯甲烷(40 mL)溶液中加入三苯基膦(3.35 g, 12.77 mmol), 继续搅拌 15 分钟后分批加入四溴化碳(4.23 g, 12.76 mmol), 加完后室温搅拌 4 小时。反应液直接减压浓缩, 硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10/1-2/1)得到产物 Int-F-2 (2.10 g, 产率 69.2%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.05 (br, 1H), 3.82 (t, 2H), 3.71-3.61 (m, 8H), 3.55 (t, 2H), 3.48 (t, 2H), 3.36-3.27 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

步骤 2:

往化合物 Int-F-2 (2.00 g, 5.61 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(20 mL)溶液中加入化合物 Int-A-12 (1.29 g, 5.58 mmol)和碳酸钾(1.56 g, 11.29 mmol), 然后 55℃下加热搅拌 6 小时。反应液浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(10 mL), 二氯甲烷萃取(10 mL× 3), 合并有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=30/1-10/1)得到化合物 Int-F-3 (1.38 g, 产率: 48.6%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.26 (s, 1H), 4.21 (d, 2H), 3.73-3.57 (m, 23H), 3.54 (t, 2H), 3.31 (d, 2H), 2.85 (t, 4H), 2.44 (s, 1H), 1.44 (s, 9H).

步骤 3:

0℃下, 往化合物 Int-F-3 (1.28 g, 2.53 mmol)的二氯甲烷(4.0 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 10 mL)。然后体系在 20℃下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-F-4 盐酸盐(1.21 g, 粗品), 直接用下一步反应。

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.74 (br, 2H), 7.93 (br, 3H), 4.15 (d, 2H), 3.70 (t, 4H), 3.55 (d, 24H), 3.46 (t, 1H), 3.15 (dd, 4H), 2.97 (dd, 2H).

步骤 4:

往化合物 Int-F-4 盐酸盐(1.21 g, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)溶液中加入化合物 Int-A-11 (2.81 g, 9.96 mmol)和碳酸钾(2.43 g, 17.58 mmol), 然后 65℃下加热搅拌过夜。浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(15 mL), 二氯甲烷萃取(15 mL× 3), 合并有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-F-5 (1.06 g, 产率: 41.5%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.21 (d, 2H), 3.72-3.58 (m, 24H), 3.53-3.37 (m, 22H), 2.90 (s, 9H), 2.82-2.73 (m, 10H), 2.44 (s, 1H), 1.45 (s, 27H).

步骤 5:

将化合物 Int-F-5 (250 mg, 0.25 mmol)溶于二氯甲烷(4 mL), 0℃下加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 4 mL)。0℃下反应体系搅拌 2 小时, 反应结束后, 浓缩得到化合物 Int-F-6 (220 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS *m/z* (ESI): 710.5 [M+H]⁺.

步骤 6:

将粗品化合物 Int-F-6 盐酸盐(220 mg, 上一步粗品)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL), 0℃下加入 *N,N*-二异丙基乙胺(682 mg, 5.28 mmol), 随后加入化合物 Int-A-7 (660 mg, 0.88 mmol)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入乙酸乙酯(30 mL), 随后依次用水(15 mL)和饱和氯化钠溶液(15 mL)洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=0-10%)纯化得到化合物 Int-F-7 (220 mg, 产率: 34.4%)。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.97 (s, 3H), 5.37-5.33 (m, 3H), 4.99 (d, 3H), 4.49-4.42 (m, 3H), 4.37 (d, 3H), 4.21 (d, 8H), 4.08 (d, 3H), 3.83 (s, 9H), 3.73-3.57 (m, 40H), 3.39-3.23 (m, 5H),

3.19-3.12 (m, 3H), 3.08-2.91 (m, 17H), 1.95-1.91 (m, 10H), 1.53 (s, 27H), 1.48 (s, 27H), 1.39-1.34 (m, 18H).

步骤 7:

将化合物 Int-F-7 (220 mg, 86.35 μ mol)溶于甲醇(10 mL), 0°C下加入氢氧化锂一水合物(22 mg, 0.52 mmol)的水溶液(10 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77 树脂进行中和。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-F-8 (190 mg, 粗品), 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 835.3 ($[M+3H]/3$)⁺.

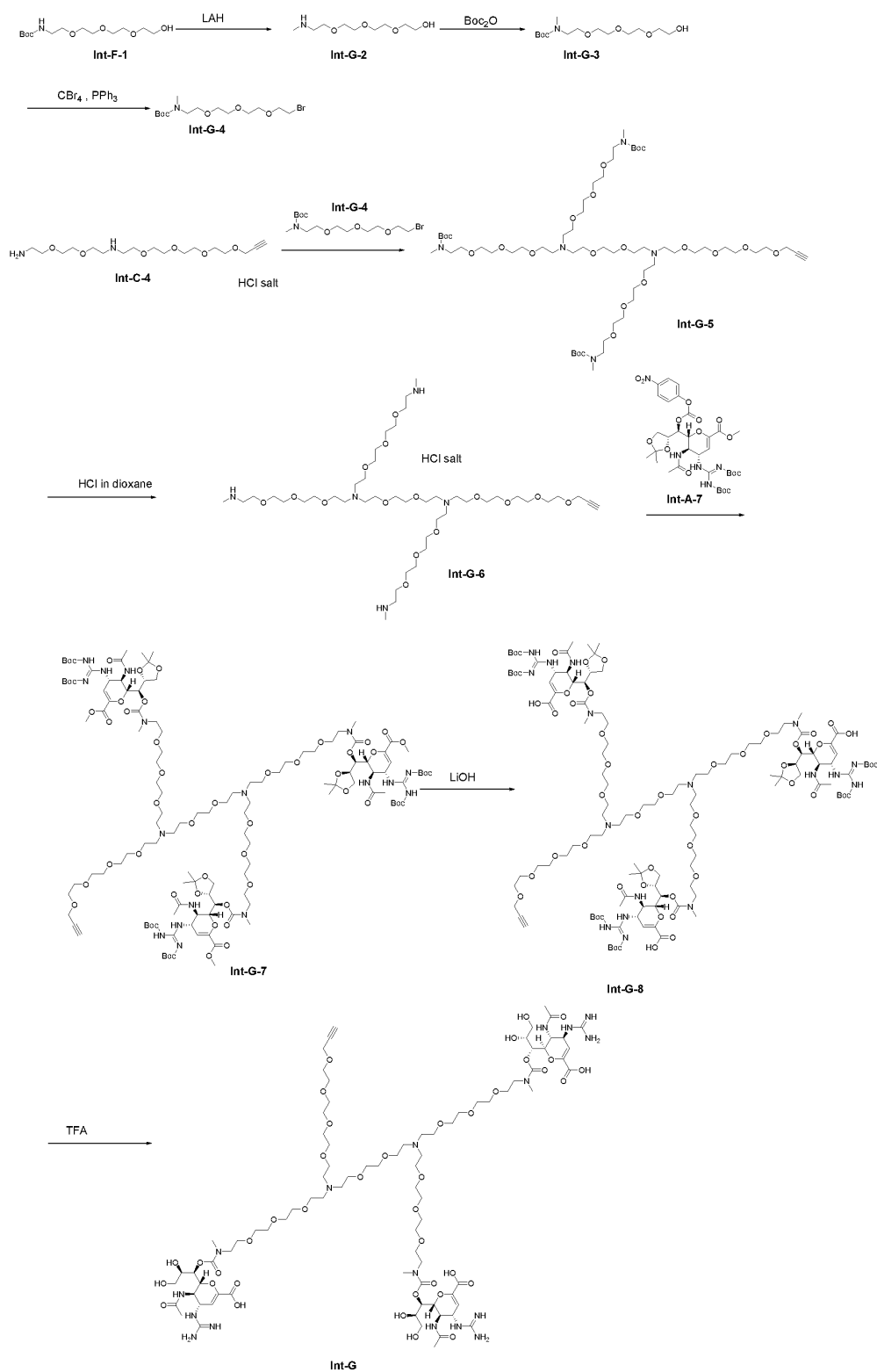
步骤 8:

将化合物 Int-F-8 (190 mg, 上一步粗品)溶于二氯甲烷(2 mL), 加入三氟乙酸(4 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 减压浓缩, 随后加入水(4 mL), 并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后, 所得粗品经高效液相色谱法(色谱柱: SharpSil-T, 30*150mm, 5 μ m; 流动相: 水相 (10 mM 碳酸氢铵)和乙腈, 梯度配比: 水相 25%-42%)纯化, 得到标题产物 Int-F (53 mg, 产率: 29.6%)。

MS m/z (ESI): 893.2 ($[M+2H]/2$)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.92 (d, 3H), 5.03 (dd, 3H), 4.57 (dd, 3H), 4.44 (d, 3H), 4.31-4.19 (m, 5H), 4.09-3.99 (m, 4H), 3.95-3.82 (m, 12H), 3.82-3.46 (m, 46H), 3.30-3.21 (m, 3H), 2.98-2.93 (m, 10H), 1.97 (s, 9H).

20 实施例 7 中间体 Int-G 的合成



步骤 1:

0°C下，往化合物 Int-F-1 (7.0 g, 23.86 mmol)的四氢呋喃(70 mL)溶液中滴加四氢铝锂的四氢呋喃溶液(2.5 M, 28.6 mL, 71.5 mmol)，滴加完后，升至 70°C搅拌 4 小时。反应完后，将冷

却下来的反应液在 0°C 下缓慢倒入含有十水合硫酸钠(40 g)的四氢呋喃(100 mL)体系中, 室温搅拌 1 小时。过滤除去固体, 母液直接减压浓缩, 得到化合物 Int-G-2 (4.94 g, 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 208.1 [M+H]⁺.

5 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.73-3.71 (m, 2H), 3.66-3.64 (m, 8H), 3.62-3.58 (m, 4H), 2.77-2.73 (t, 2H), 2.42 (s, 3H).

步骤 2:

0°C 下, 往 Int-G-2 (4.94 g, 上一步粗品)的二氯甲烷(60 mL)溶液中加入二碳酸二叔丁酯(6.31 g, 28.9 mmol), 室温搅拌过夜。浓缩反应液后硅胶柱层析(二氯甲烷/乙酸乙酯=10/1-2/1)得到化合物 Int-G-3 (4.17 g, 两步产率: 56.9%)。

MS m/z (ESI): 330.2 [M+Na]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.76-3.70 (m, 2H), 3.70-3.54 (m, 12H), 3.42-3.35 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 1.45 (s, 9H).

步骤 3:

15 0°C 下, 往 Int-G-3 (4.0 g, 13.01 mmol)的二氯甲烷(60 mL)溶液中加入三苯基膦(5.11 g, 19.48 mmol), 继续搅拌 10 分钟后分批加入四溴化碳(6.47 g, 19.51 mmol), 加完后室温搅拌 1 小时。反应液直接减压浓缩, 硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10/1-2/1)得到化合物 Int-G-4 (3.9 g, 产率 81.0%)。

20 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.81 (t, 2H), 3.71-3.55 (m, 10H), 3.47 (t, 2H), 3.39 (s, 2H), 3.44-3.37 (m, 3H), 1.45 (s, 9H).

步骤 4:

往化合物 Int-C-4 (1.08 g, 2.48 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)溶液中加入化合物 Int-G-4 (3.22 g, 8.70 mmol)和碳酸钾(1.71 g, 12.37 mmol), 然后 65°C 下加热搅拌过夜。反应液浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(15 mL), 二氯甲烷萃取(15 mL×3), 有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-G-5 (1.29 g, 产率: 42.3%)。

MS m/z (ESI): 616.0 ([M+2H]/2)⁺.

25 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.21 (d, 2H), 3.72-3.52 (m, 60H), 3.43-3.35 (m, 8H), 2.95-2.72 (m, 18H), 1.45 (s, 27H).

30 步骤 5:

0°C 下, 往化合物 Int-G-5 (400 mg, 0.33 mmol)的二氯甲烷(5.0 mL)溶液中加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 10 mL)。然后在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-G-6 (360 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 465.9 ([M+2H]/2)⁺.

35 步骤 6:

往化合物 Int-G-6 (360 mg, 上一步粗品)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)溶液中加入化合物 Int-A-7 (780 mg, 1.04 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(418 mg, 3.23 mmol), 然后室温搅拌 12 小

时。反应液室温浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺，反相制备得到化合物 Int-G-7 (500 mg, 两步产率: 55.6%)。

MS m/z (ESI): 692.8 ($[M+4H]/4$)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.40 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 6.15-6.09 (m, 3H), 5.88 (s, 3H), 5.26-5.21 (m, 6H), 4.43-4.34 (m, 6H), 4.20 (d, 2H), 4.17-3.99 (m, 10H), 3.79 (s, 8H), 3.70-3.68 (m, 4H), 3.70-3.68 (m, 46H), 3.55-3.48 (m, 14H), 3.41-3.28 (m, 4H), 3.00 (s, 4H), 2.94 (s, 4H), 2.76 (s, 10H), 1.89 (d, 8H), 1.48 (d, 54H), 1.38-1.33 (m, 19H).

步骤 7:

0°C下，往化合物 Int-G-7 (200 mg, 72.25 μ mol)的甲醇(14.4 mL)溶液中加入氢氧化锂一水合物(30 mg, 0.71 mmol)的水溶液(14.4 mL)，然后 20°C下搅拌 12 小时。反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=7，过滤后的母液浓缩得到化合物 Int-G-8 (197 mg, 粗品)，直接用下一步反应。

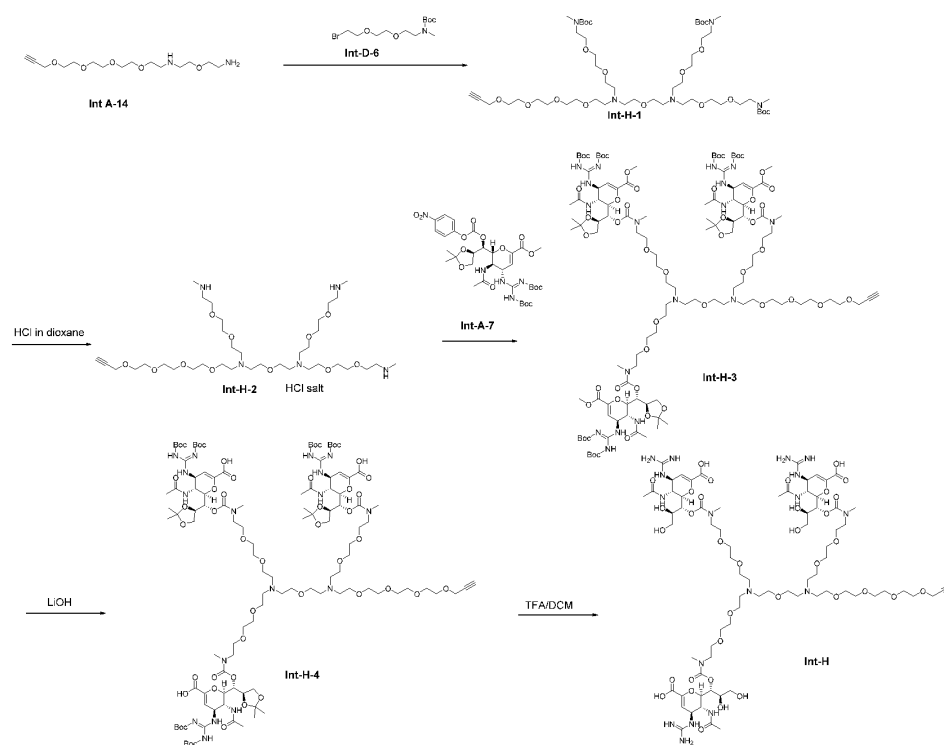
MS m/z (ESI): 682.3 ($[M+4H]/4$)⁺.

步骤 8:

0°C下，往化合物 Int-G-8 (197 mg, 上一步粗品)的二氯甲烷(5.0 mL)溶液中加入三氟乙酸(10 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时，反应结束后，减压浓缩，随后加入水(4 mL)，并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后，所得粗品经高效液相色谱法 (Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液，流动相 B: 乙腈，梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-G 三氟醋酸盐(25.0 mg, 两步产率: 13.4%)。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.59-5.57 (m, 3H), 4.93-4.84 (m, 3H), 4.43 (dd, 3H), 4.32 (dd, 3H), 4.16 (s, 2H), 4.09-4.00 (m, 6H), 3.61-3.58 (m, 64H), 3.41 (dd, 4H), 3.31-3.28 (m, 2H), 3.17-3.12 (m, 2H), 2.89 (s, 4H), 2.81-2.77 (d, 16H), 1.88 (s, 9H).

实施例 8 中间体 Int-H 的合成



步骤 1:

将化合物 Int-A-14 盐酸盐(572 mg, 1.46 mmol)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL), 依次加入碳酸钾(2.50 g, 18.09 mmol)和化合物 Int-D-6 (2.30 g, 6.76 mmol)。反应在 65°C下搅拌 16 小时, 反应结束后, 将反应液浓缩, 加入水(30 mL)和二氯甲烷(30 mL), 水相经二氯甲烷萃取 (30 mL×2)。合并后的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=0-10%)纯化得到化合物 Int-H-1 (350 mg, 产率: 22.7%)。

MS *m/z* (ESI): 1054.7 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.21 (d, 3H), 3.72-3.49 (m, 45H), 3.42-3.32 (m, 7H), 2.91 (s, 9H), 2.81-2.73 (m, 7H), 2.45 (s, 1H), 1.45 (s, 27H).

步骤 2:

将化合物 Int-H-1 (250 mg, 0.24 mmol)溶于二氯甲烷(8 mL), 0°C下加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 4 mL)。反应 0°C下搅拌 2 小时, 反应结束后, 浓缩得到化合物 Int-H-2 (222 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS *m/z* (ESI): 754.5 [M+H]⁺.

步骤 3:

将化合物 Int-H-2 (222 mg, 粗品)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(5 mL), 0°C下加入 *N,N*-二异丙基乙胺(464 mg, 3.59 mmol), 随后加入化合物 Int-A-7 (600 mg, 0.80 mmol)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入乙酸乙酯(30 mL), 随后依次用水(15 mL)和饱和氯化钠溶液(15 mL)洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以

洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=20:1-10:1)纯化得到化合物 Int-H-3 (230 mg, 两步产率: 37.0%)。

MS m/z (ESI): 648.9 ([M+4H]/4)⁺.

步骤 4:

5 将化合物 Int-H-3 (230 mg, 88.74 μmol)溶于甲醇(14 mL), 0°C下加入氢氧化锂一水合物(30 mg, 0.71 mmol)的水溶液(14 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77 树脂进行中和。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-H-4 (226 mg, 粗品), 直接用下一步反应。

MS m/z (ESI): 850.7 ([M+3H]/3)⁺.

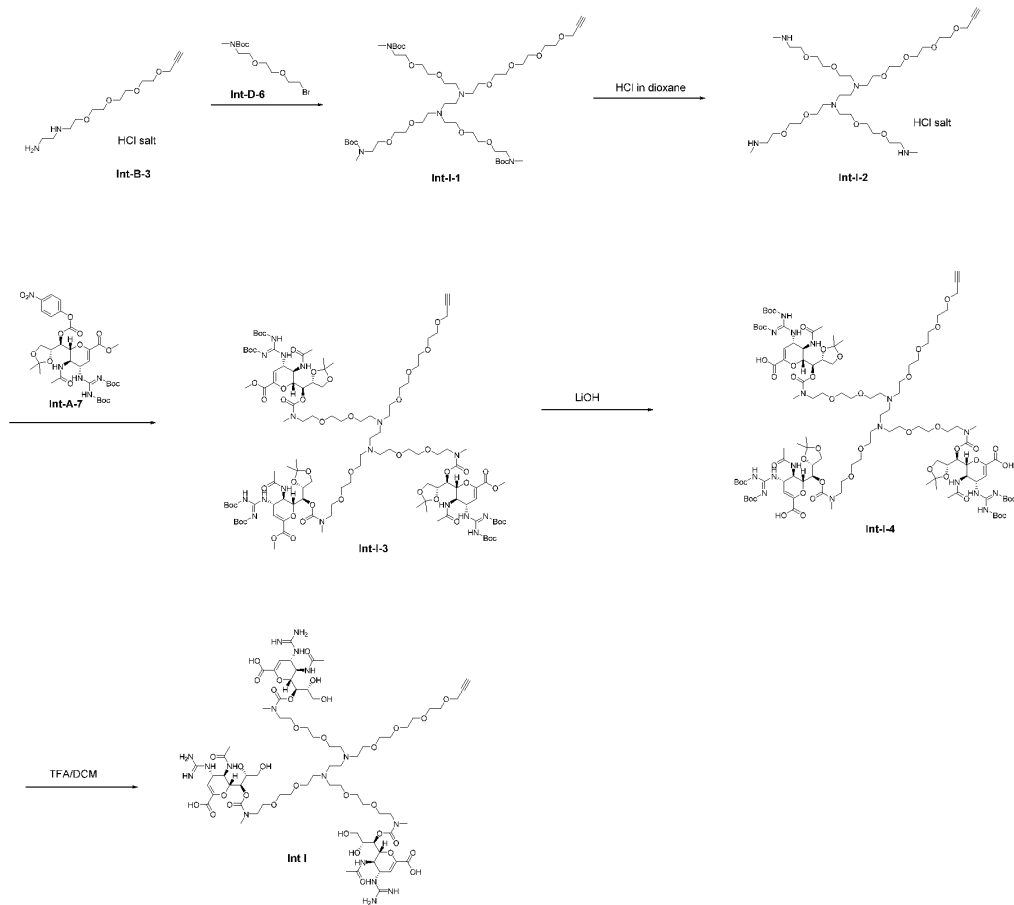
步骤 5:

10 将粗品化合物 Int-H-4 (226 mg, 上一步粗品)溶于二氯甲烷(2 mL), 加入三氟乙酸(4 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 减压浓缩, 随后加入水(4 mL), 并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后, 所得粗品经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5μm; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-H 三氟醋酸盐(86.8 mg, 两步产率: 40.7%)。

15 MS m/z (ESI): 610.5 ([M+3H]/3)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.91 (dd, 3H), 5.06-4.99 (m, 3H), 4.57 (dd, 3H), 4.44 (d, 3H), 4.28-4.18 (m, 5H), 4.12-3.99 (m, 4H), 3.99-3.79 (m, 14H), 3.79-3.47 (m, 48H), 3.23-3.14 (m, 3H), 2.97 (d, 10H), 1.97 (d, 9H).

20 实施例 9 中间体 Int-I 的合成



步骤 1:

将化合物 Int-B-3 (900 mg, 2.59 mmol)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL), 依次加入碳酸钾(2.6 g, 18.81 mmol)和化合物 Int-D-6 (2.50 g, 7.66 mmol)。反应在 65°C下搅拌 16 小时, 反应结束后, 将反应液浓缩, 加入水(30 mL)和二氯甲烷(30 mL), 水相经二氯甲烷萃取(30 mL×2)。合并后的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)纯化得到化合物 Int-I-1 (300 mg, 产率: 11.5%)。

MS m/z (ESI): 1032.7 $[M+Na]^+$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.20 (d, 2H), 3.86-3.51 (m, 40H), 3.42-3.16 (m, 16H), 2.89 (d, 9H), 2.47 (t, 1H), 1.45 (s, 27H).

步骤 2:

将化合物 Int-I-1(300 mg, 0.30 mmol)溶于二氯甲烷 (8 mL), 0°C 下加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 4 mL)。反应在 0°C下搅拌 2 小时, 反应结束后, 浓缩得到化合物 Int-I-2 盐酸盐(265 mg, 粗品), 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 710.5 $[M+H]^+$.

步骤 3:

将化合物 Int-I-2 (265 mg, 粗品)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(8 mL), 0°C加入 *N,N*-二异丙

基乙胺(374 mg, 2.89 mmol), 随后加入化合物 Int-A-7 (750 mg, 1 mmol)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入乙酸乙酯(50 mL), 随后依次用水(30 mL)和饱和氯化钠溶液(30 mL)洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=0-10%)纯化得到化合物 Int-I-3 (330 mg, 两步产率: 43.2%)。

- 5 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 11.41 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 5.95-5.81 (m, 6H), 5.30-5.21 (m, 6H), 4.43-4.34 (m, 6H), 4.20 (d, 2H), 4.10-3.95 (m, 6H), 3.79 (s, 9H), 3.72-3.49 (m, 42H), 3.40-3.10 (m, 8H), 2.97 (d, 9H), 2.78-2.60 (m, 9H), 2.46 (s, 1H), 1.90 (d, 9H), 1.48 (d, 54H), 1.39-1.33 (m, 18H).

步骤 4:

- 10 将化合物 Int-I-3 (330 mg, 0.13 mmol)溶于甲醇(20 mL), 0°C 下加入氢氧化锂一水合物(42 mg, 1.00 mmol)的水溶液(20 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77 树脂进行中和。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-I-4 (285 mg, 粗品), 直接用于下一步反应。

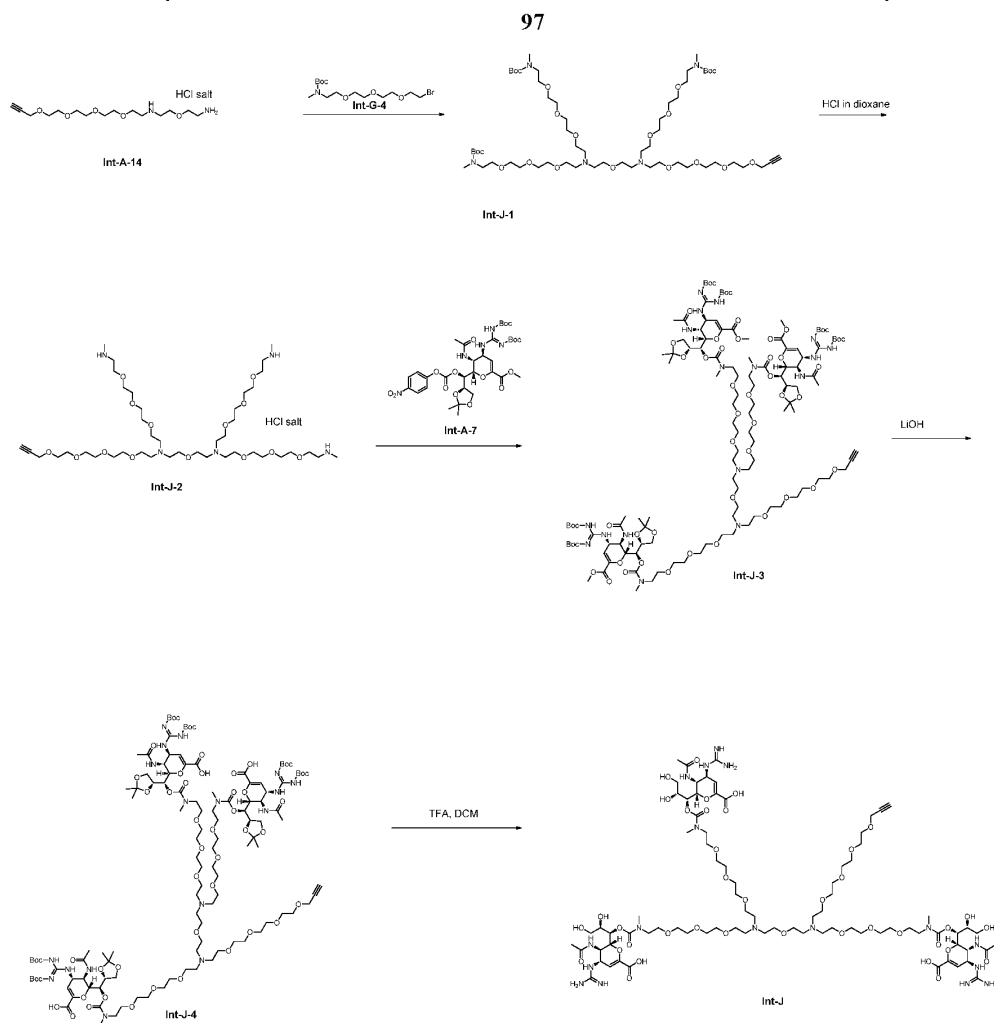
MS m/z (ESI): 836.1 ($[\text{M}+3\text{H}]/3$) $^+$.

- 15 步骤 5:

将化合物 Int-I-4 (285 mg, 粗品)溶于二氯甲烷(3 mL), 加入三氟乙酸 (6 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 减压浓缩, 随后加入水(4 mL), 并在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩后, 所得粗品经高效液相色谱法(Waters XBridge, $19*150\text{mm}$, $5\mu\text{m}$; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int I 三氟醋酸盐(154.0 mg, 两步产率: 50.3%)。

- 20 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 5.94 (d, 3H), 5.08-4.99 (m, 3H), 4.57 (d, 3H), 4.44 (d, 3H), 4.30-4.19 (m, 5H), 4.08-4.00 (m, 4H), 3.92-3.77 (m, 10H), 3.73-3.46 (m, 48H), 3.24-3.14 (m, 3H), 2.98 (d, 10H), 1.97 (d, 9H).

- 25 实施例 10 中间体 Int-J 的合成



步骤 1:

往化合物 Int-A-14 (900 mg, 2.30 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(15 mL)溶液中加入化合物 Int-G-4 (3.35 g, 9.05 mmol)和碳酸钾(3.89 g, 28.15 mmol), 然后 65°C下加热搅拌过夜。反应液
 5 浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 加水(15 mL), 二氯甲烷萃取(15 mL× 3), 合并有机相用饱和氯化钠溶液(20 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 硅胶柱层析(二氯甲烷/甲醇=20/1-10/1)得到化合物 Int-J-1 (1.20 g, 产率: 44.0%)。

MS *m/z* (ESI): 594.0 ($[M+2H]^+$).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.20 (d, 2H), 3.76-3.51 (m, 54H), 3.43-3.32 (m, 6H), 2.91 (s,
 10 9H), 2.90-2.78 (m, 9H), 2.29 (s, 4H), 1.45 (s, 27H).

步骤 2:

0°C下, 往化合物 Int-J-1 (400 mg, 0.34 mmol)的二氯甲烷(10 mL)溶液中加入氯化氢/二氧
 六环溶液(4M, 10 mL)。然后在室温下搅拌 2 小时, 浓缩得到化合物 Int-J-2 (360 mg, 粗品),
 直接用于下一步反应。

15 MS *m/z* (ESI): 908.8 $[M+Na]^+$.

步骤 3:

往化合物 Int-J-2 (360 mg, 上一步粗品)的, *N*-二甲基甲酰胺(10 mL)溶液中加入 Int-A-7

(809 mg, 1.08 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(433 mg, 3.35 mmol), 然后室温搅拌 12 小时。反应液室温浓缩去除 *N,N*-二甲基甲酰胺, 反相制备得到化合物 Int-J-3 (640 mg, 两步产率: 69.1%)。

MS m/z (ESI): 681.9 ([M+4H]/4)⁺.

步骤 4:

- 5 0°C下, 往化合物 Int-J-3 (600 mg, 0.22 mmol)的甲醇(44 mL)溶液中加入氢氧化锂(92.4 mg, 2.20 mmol)溶液(44 mL), 然后 20°C下搅拌 12 小时。反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=7, 过滤后的母液浓缩得到化合物 Int-J-4 (590 mg, 粗品), 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 671.0 ([M+4H]/4)⁺.

- 10 步骤 5:

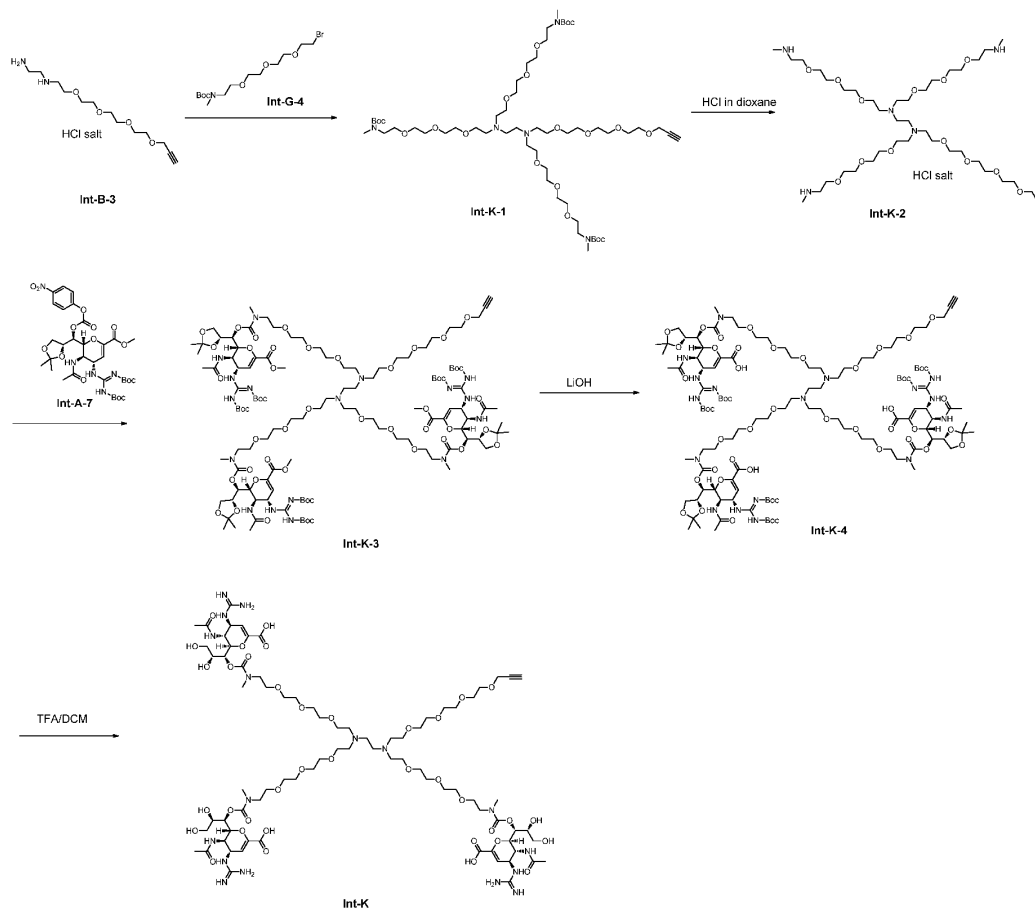
0°C下, 往化合物 Int-J-4 (590 mg, 上一步粗品)的二氯甲烷(5 mL)溶液中加入三氟乙酸(5 mL)。然后 20°C下搅拌 2 小时, 浓缩后加水(10 mL), 搅拌 2 小时。减压浓缩, 粗品经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5μm; 流动相 A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-J 三氟醋酸盐(140 mg, 两步产率:

- 15 25.1%)。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5.52(d, 3H), 4.85-4.75 (m, 3H), 4.37 (dd, 3H), 4.26 (dd, 3H), 4.09 (s, 2H), 4.02-3.94 (m, 6H), 3.52 (br, 62H), 3.35 (dd, 3H), 3.31-2.97 (m, 4H), 2.88 (s, 4H), 2.75-2.71 (m, 15H), 1.81 (s, 9H).

- 20 实施例 11 中间体 Int-K 的合成

99



步骤 1:

- 将化合物 Int-B-3 (586 mg, 1.69 mmol)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL), 依次加入碳酸钾(3.0 g, 21.71 mmol)和化合物 Int-G-4 (3.20 g, 8.64 mmol)。反应在 65°C下搅拌 16 小时, 反应结束后, 将反应液浓缩, 加入水(30 mL)和二氯甲烷(30 mL), 水相经二氯甲烷萃取(30 mL × 2)。合并后的有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=0-10%)纯化得到化合物 Int-K-1 (800 mg, 产率: 41.4%)。

MS m/z (ESI): 1165.7 $[M+Na]^+$.

步骤 2:

- 将化合物 Int-K-1 (300 mg, 0.26 mmol)溶于二氯甲烷(8 mL), 0°C下加入氯化氢/二氧六环溶液(4 M, 4 mL)。反应 0°C下搅拌 2 小时, 反应结束后, 浓缩得到化合物 Int-K-2 (269 mg, 粗品), 直接用于下一步反应。

MS m/z (ESI): 421.9 $[M+2H]^+$.

步骤 3:

- 将化合物 Int-K-2 (269 mg, 上一步粗品)溶于干燥 *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL), 冰浴下加入 *N,N*-二异丙基乙胺(373 mg, 2.89 mmol), 随后加入化合物 Int-A-7 (650 mg, 0.86 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 加入乙酸乙酯(30 mL), 随后依次用水(15 mL)和饱和氯化钠

溶液(15 mL)洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到粗产品。粗产品经快速制备仪以洗脱体系(二氯甲烷/甲醇=0-10%)纯化得化合物 Int-K-3 (350 mg, 两步产率: 50.2%)。

MS m/z (ESI): 894.1 ([M+3H]/3)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.39 (s, 3H), 8.41 (d, 3H), 6.36-6.12 (m, 3H), 5.90 (dd, 3H),
5 5.36-5.16 (m, 6H), 4.43-4.35 (m, 6H), 4.23-3.95 (m, 14H), 3.80-3.58 (m, 62H), 3.41-3.17 (m, 12H),
3.01-2.98 (m, 9H), 2.50 (t, 1H), 1.89 (s, 9H), 1.48 (d, 54H), 1.38-1.33 (m, 18H).

步骤 4:

将化合物 Int-K-3 (350 mg, 0.13 mmol)溶于甲醇(22 mL), 冰浴下加入氢氧化锂一水合物
(45 mg, 1.07 mmol)的水溶液(22 mL)。反应在室温下搅拌 16 小时, 反应结束后, 加入 IRN 77
10 树脂进行中和。中和后的反应液进行过滤, 浓缩得到化合物 Int-K-4 (310 mg, 粗品), 直接用于
于下一步反应。

MS m/z (ESI): 880.2 ([M+3H]/3)⁺.

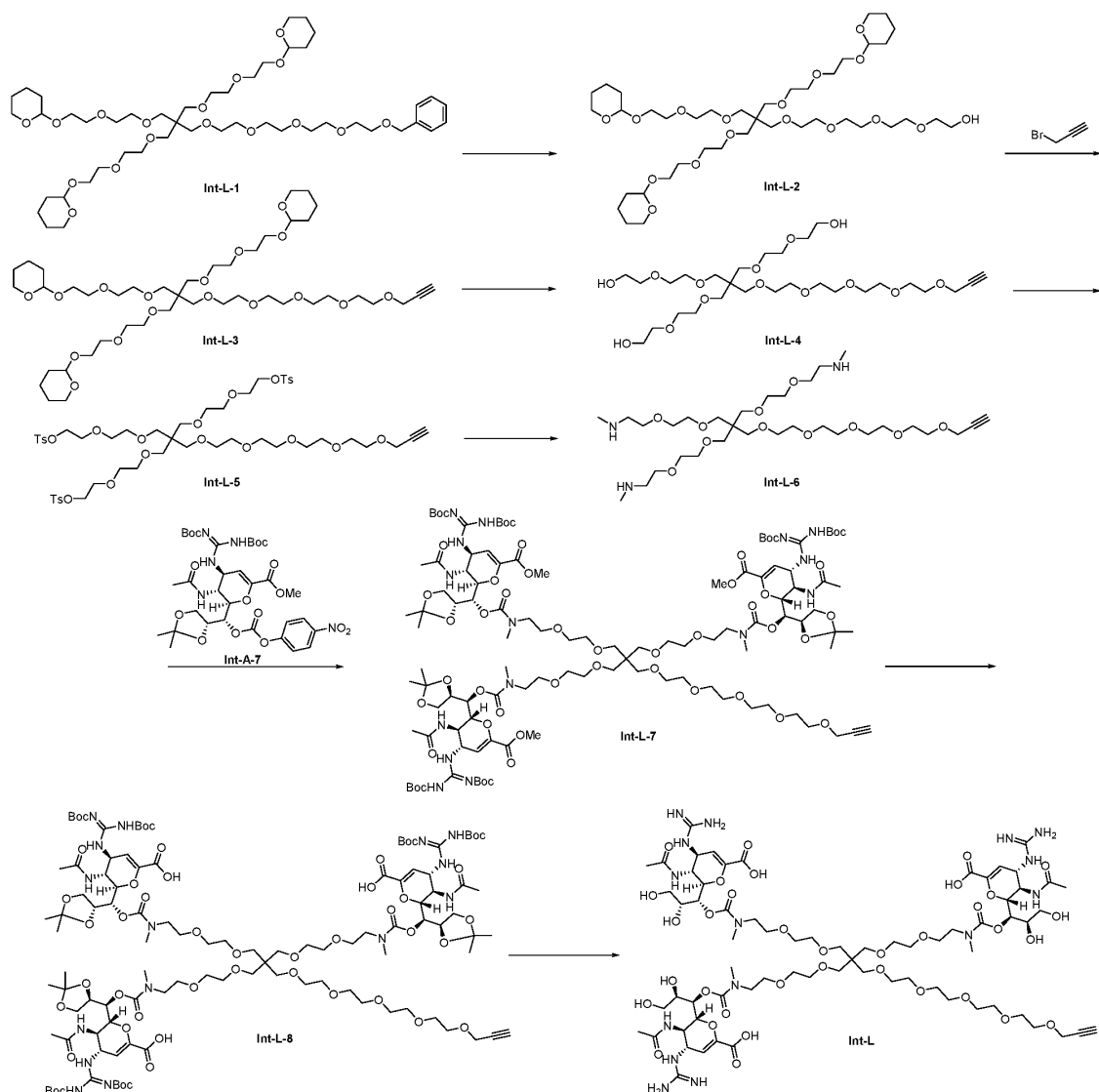
步骤 5:

将化合物 Int-K-4 (310 mg, 上一步粗品)溶于二氯甲烷(3 mL), 加入三氟乙酸(6 mL)。反
15 应在室温下搅拌 2 小时, 反应结束后, 减压浓缩, 随后加入水(4 mL), 并在室温下搅拌 1 小
时。反应液浓缩后, 所得粗品经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5μm; 流动相
A: 0.5% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到标题产物 Int-
K 三氟醋酸盐(203 mg, 两步产率: 62.9%)。

MS m/z (ESI): 639.8 ([M+3H]/3)⁺.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.94 (s, 3H), 5.03 (t, 3H), 4.58 (dd, 3H), 4.42 (dd, 3H), 4.29-
20 4.19 (m, 5H), 4.13-4.01 (m, 3H), 3.90-3.76 (m, 10H), 3.74-3.58 (m, 51H), 3.55-3.44 (m, 10H), 3.26-
3.17 (m, 3H), 3.03-2.94 (m, 10H), 1.97 (s, 9H).

实施例 12 中间体 Int-L 的合成



步骤 1: Int-L-2 的合成

将化合物 **Int-L-1** (0.176 g, 0.19 mmol, 采用公知方法制备而得, *Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 77, # 20, p. 8879 - 8887)溶于 10 mL THF 中, 加入 10% Pd (0.124 g)。用氢气置换体系中的空气四次, 然后在氢气气氛下室温反应四小时。反应结束后, 过滤、浓缩得 0.16 g 粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 830.5 $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 化合物 Int-L-3 的合成

10 将化合物 **Int-L-2** (0.16 g, 0.19 mmol)溶于干燥四氢呋喃(4 mL), 然后在冰水浴冷却下加入叔丁醇钾的 THF 溶液 (0.39 mL, 0.394 mmol)。加完后, 反应在室温下搅拌半小时。再用冰水浴冷却, 向其中加入溴代丙炔(0.0703 g, 0.591 mmol), 加完后反应自然升至室温搅拌过夜。反应液过滤, 滤饼用 DCM 洗涤, 浓缩, 浓过柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=1: 5)得 0.134 g 化

合物 **Int-L-3** (收率:81%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.60 (t, 3H), 4.17(d, 2 H), 3.87 ~ 3.44 (m, 46H), 3.40 (s, 8H), 2.42 (t, 1H), 1.86 ~ 1.44 (m, 18H).

5 **步骤 3: 化合物 Int-L-4 的合成**

将化合物 **Int-L-3** (134 mg, 0.154 mmol)溶于无水甲醇(5 mL), 加入一水合对甲苯磺酸 (14 mg, 0.072 mmol)。反应在室温下搅拌 1 小时, 反应结束后, 加入碳酸氢钠 (20 mg, 0.238 mmol) 中和, 浓缩, 得到 95 mg 粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI):615.4 [M+H]⁺ 。

10

步骤 4: 化合物 Int-L-5 的合成

将化合物 **Int-L-4** (95 mg, 0.154 mmol) 溶于 DCM (5 mL), 依次加入三乙胺 (156 mg, 1.542 mmol)、对甲苯磺酰氯 (147 mg, 0.771 mmol) 和 DMAP (0.9 mg, 0.008 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 加饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 然后用 DCM 萃取, 经干燥、过

15 滤、浓缩, 得 166 mg 粗品, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI):1077.3 [M+H]⁺ 。

步骤 5: 化合物 Int-L-6 的合成

将化合物 **Int-L-5** (166 mg, 0.154 mmol) 溶于甲胺的乙醇溶液(5 mL, 约 30%), 室温下搅

20

拌过夜。反应结束后, 浓缩, 浓缩液用水和 DCM 溶解, 分出有机层, 水层再用 DCM 萃取,

水相减压浓缩得到 70 mg 化合物 **Int-L-6** (收率:70%)。

MS m/z (ESI):654.4 [M+H]⁺ 。

步骤 6: 化合物 Int-L-7 的合成

25 往化合物 **Int-L-6**(193 mg, 0.295 mmol)的 *N,N*-二甲基甲酰胺(8 mL)和二氯甲烷 (8mL) 溶液中加入化合物 **Int-A-7** (765 mg, 1.02 mmol)和 *N,N*-二异丙基乙胺(571 mg, 4.43 mmol), 然后加热到 60℃搅拌 5 小时。反应液室温浓缩去除二氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺, 过柱纯化 (乙腈: 水=0~100%) 得 322 mg 化合物 **Int-L-7** (收率: 44%)。

MS m/z (ESI): 831.4 ([M/3+H]⁺ 。

30

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.41 (bs, 2H), 8.75 (bs, 2H), 6.76 (bs, 2H), 5.86 (s, 3H), 5.50-5.22 (m, 6H), 4.43-4.38 (m, 6H), 4.21-3.98 (m, 11H), 3.80 (s, 9H), 3.69-3.23 (m, 48H), 2.99-2.94 (m, 9H), 2.48 (s, 1H), 1.85 (s, 9H), 1.50 (m, 52H), 1.40-1.30 (m, 23H).

步骤 7: 化合物 Int-L-8 的合成

在 0℃下, 往化合物 **Int-L-7** (260 mg, 0.104 mmol)的甲醇(4.2 mL)溶液中加入氢氧化锂一

35

水合物(26 mg, 0.627 mmol)的水溶液(4.2 mL), 然后 20℃下搅拌 10 分钟。反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=5~6, 过滤后的母液浓缩得到 250 mg 化合物 **Int-L-8** (收率: 98%)。

MS m/z (ESI): 1225.5 ($[M/2+H]^+$).

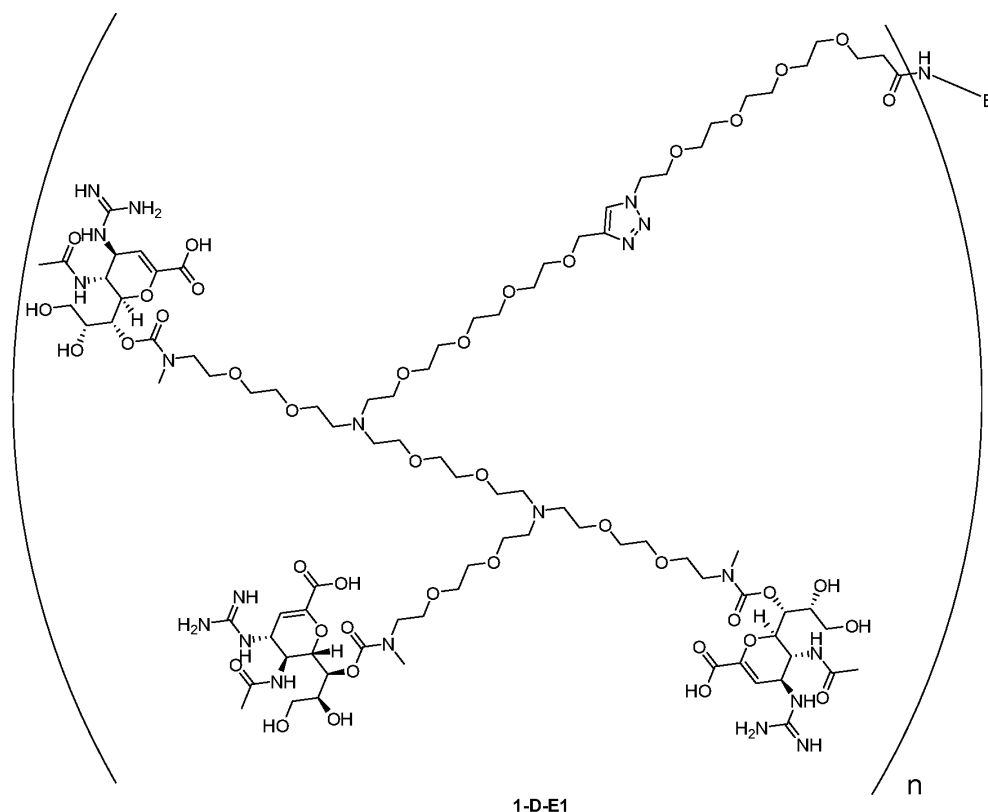
步骤 8: 化合物 Int-L 的合成

0°C下, 往化合物 Int-L-8 (250 mg, 0.102 mmol)的二氯甲烷(2.1 mL)溶液中加入三氟乙酸(2.1 mL)。反应在室温下搅拌 2 小时。反应结束后, 减压浓缩, 随后加入乙腈(2.1mL)和水
5 (2.1 mL), 并在室温下搅拌 3 小时。反应液浓缩后, 过柱纯化 (TFA: 乙腈 = 5%~95%)得到 65 mg 化合物 Int-L (TFA 盐, 收率: 37%)。

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.87 (bs, 2H), 8.19-8.03 (m, 3H), 7.98-7.00 (m, 14H), 5.71 (s, 3H), 5.22-4.82 (m, 6H), 4.62-4.29 (m, 6H), 4.20 (d, 2H), 4.14-3.81 (m, 6H), 3.70-3.68 (m, 48H), 3.55-3.48 (m, 9H), 2.94-2.85 (m, 9H), 1.75 (s, 9H).

10 MS m/z (ESI): 865.1 ($[M/2+H]^+$).

实施例 13 基于赖氨酸偶联的偶联物 1-D-E1 的合成



15

Azido-PEG4-NHS ester 溶液的配制: 将 16.75 mg 的 PEG4-azido NHS (CAS: 944251-24-5, 购自陕西新研博美生物) 溶解在 100 μ l 的 DMF 中, 0°C下再用 1 $\times$ PBS pH 7.2 的缓冲溶液定容, 最终浓度 50 mM。

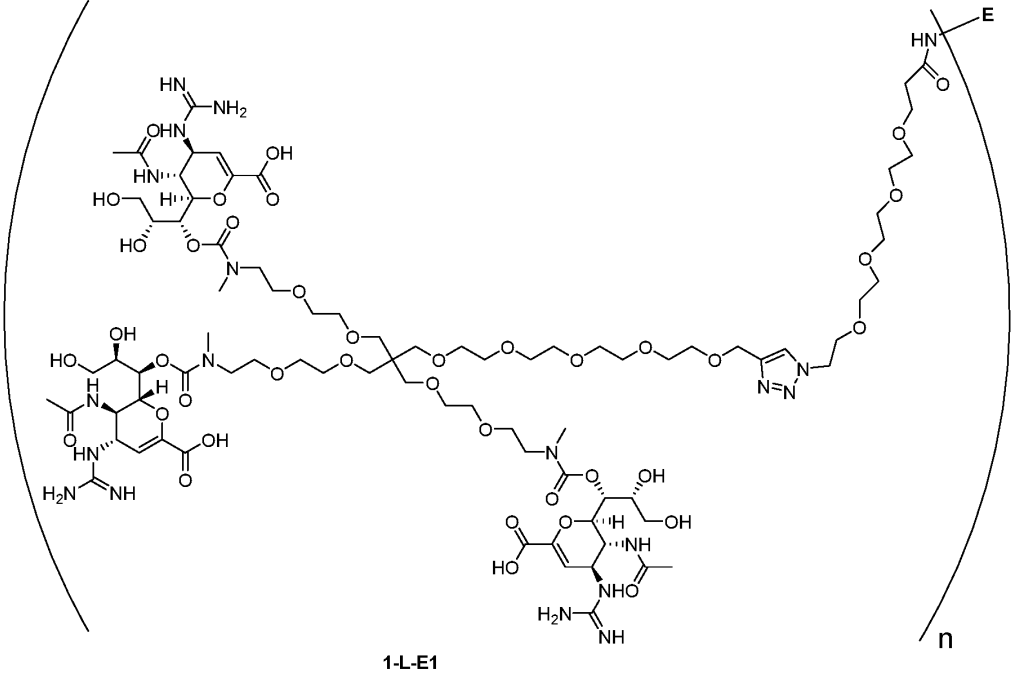
配制 click 试剂: 10.0 mg 的 $CuSO_4$ (5 MM) 溶于 12.53 ml 的 1 $\times$ PBS 中, 取 5 ml 加入
20 到 43.1 mg 的 BTAA (20MM, CAS: 1334179-85-9, 购自安耐吉) 和 247.5 mg 的抗坏血酸

钠（250 MM）中溶解备用。

步骤 1: 15 mL 反应管中分别加入蛋白 Fc (963.4 μ L, 10.38 mg/mL, 其序列如 SEQ ID NO: 1 所示)、PBS pH 7.2 (36.6 μ L)和 PEG4-azido 溶液 (25.0 μ L), 室温下振荡 3 小时。取出后在 PBS pH6.3 的缓冲溶液下,用离心脱盐柱纯化得 Fc-azido (8.95 mg, 收率 89.5%,纯度 97.8%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 5.8。

步骤 2: 向 15 mL 反应管中分别加入 Fc-azido(8.95 mg), 中间体化合物 Int-D(4.49 mg)的 1 $\times$ PBS pH=6.3 (76 μ L)溶液和 click 试剂(499 μ L), 室温下振荡 20 小时。用 PBS (pH=5.0)脱盐过柱纯化得偶联物 1-D-E1 (6.9 mg, 收率 86.4%, 纯度 98.2%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 3.86。

实施例 14 基于赖氨酸偶联的偶联物 1-L-E1 的合成



步骤 1: 采用与实施例 13 中相同的方法制备 Fc-azido(8.81 mg,收率 88.1%,纯度 97.7%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 5.57。

步骤 2: 向 15 mL 反应管中分别加入 Fc-azido(8.81 mg), 中间体化合物 Int-L (4.07mg)的 1 $\times$ PBS pH=6.3 (313 μ L)溶液和 click 试剂(490 μ L), 室温下振荡 20 小时。用 PBS (pH=5.0)脱盐过柱纯化得偶联物 1-L-E1 (6.6 mg, 收率 74.9%, 纯度 98.8%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 3.98。

实施例 15 基于链间二硫键半胱氨酸偶联的偶联物分子合成

用截留分子量 30,000 道尔顿的离心浓缩管将纯化好的 Fc 置换到含有 2 mM EDTA 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中, 终浓度为 2.5 mg/ml。向 2.5 mg Fc 中加入终浓度为 3 mM 的 DTT (碧云天), 混匀后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2-3 小时。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin (Cytiva)

去除过量的 DTT。用 DTNB (Solarbio) 测定溶液中还原型半胱氨酸的含量。

向 2.5 mg 被还原的 Fc 中加入 10 个当量的 Azido-PEG3-Maleimide (购自 Alfa Aesar, 溶解于 DMSO/PBS 中的 0.01 M 母液), 混匀后在室温震荡孵育 2-3 小时得 Fc-azido。之后立即加入 20 个当量的游离半胱氨酸去淬灭未反应的 Azido-PEG3-Maleimide, 在 10°C 淬灭 30 分钟。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin 将缓冲溶液置换到 PBS 中。向 Fc-azido 中加入 10 当量的前述中间体, 混合均匀后再加入 10 当量铜离子催化试剂 (0.005 M 硫酸铜, 0.02 M BTAA 和 0.25 M 抗坏血酸钠) 启动点击反应。室温反应 12-20 小时。反应完毕后, 用 MabPurix 预装柱和 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 纯化得标题偶联物分子并分析其 DAR 值。

10 实施例 16 基于单点半胱氨酸突变偶联的偶联物分子合成

用截留分子量 30,000 道尔顿的离心浓缩管将纯化好的 Fc 单点半胱氨酸突变体置换到含有 2 mM EDTA 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中, 终浓度为 2.5 mg/ml。在 2.5 mg Fc 突变体中加入终浓度为 3 mM 的 DTT, 混匀后在 37°C 孵育 2-3 小时。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin 去除过量的 DTT。用 DTNB 测定溶液中还原型半胱氨酸的含量。用 Sephadex G-25 resin 将被还原的 Fc 突变体置换到含有 2 mM EDTA 和 1 mM 脱氢抗坏血酸的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.5) 中。室温孵育 2-3 小时后, 用 Sephadex G-25 resin 将 Fc 突变体置换到含有 2 mM EDTA 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中。用 DTNB 测定溶液中还原型半胱氨酸的含量。

向 2.5 mg 被重氧化的 Fc 突变体中加入 5 个当量的 Azido-PEG3-Maleimide (溶解于 DMSO/PBS 中的 0.01 M 母液), 混匀后在室温震荡孵育 2-3 小时 Fc 突变体-azido。之后立即加入 20 个当量的游离半胱氨酸去淬灭未反应的 Azido-PEG3-Maleimide, 在 10°C 淬灭 30 分钟。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin 将缓冲溶液置换到 PBS 中。向 Fc 突变体-azido 中加入 5 当量的前述中间体, 混合均匀后再加入 10 当量铜离子催化试剂 (0.005 M 硫酸铜, 0.02 M BTAA 和 0.25 M 抗坏血酸钠) 启动点击反应。室温反应 12-20 小时。反应完毕后, 用 MabPurix 预装柱和 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 纯化得偶联物分子并分析其 DAR 值。

实施例 17 基于双点半胱氨酸突变偶联的偶联物分子合成

用截留分子量 30,000 道尔顿的离心浓缩管将纯化好的 Fc 双点半胱氨酸突变体置换到含有 2 mM EDTA 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中, 终浓度为 2.5 mg/ml。在 2.5 mg Fc 突变体中加入终浓度为 3 mM 的 DTT, 混匀后在 37°C 孵育 2-3 小时。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin 去除过量的 DTT。用 DTNB 测定溶液中还原型半胱氨酸的含量。用 Sephadex G-25 resin 将被还原的 Fc 突变体置换到含有 2 mM EDTA 和 1 mM 脱氢抗坏血酸的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.5) 中。室温孵育 2-3 小时后, 用 Sephadex G-25 resin 将 Fc 突变体置换到含有 2 mM EDTA 的 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 (pH 8.0) 中。用 DTNB 测定溶液中还原型半胱氨酸的含量。

向 2.5 mg 被重氧化的 Fc 突变体中加入 10 个当量的 Azido-PEG3-Maleimide (溶解于 DMSO/PBS 中的 0.01 M 母液), 混匀后在室温震荡孵育 2-3 小时 Fc 突变体-azido。之后立即

加入 20 个当量的游离半胱氨酸去淬灭未反应的 Azido-PEG3-Maleimide, 在 10℃淬灭 30 分钟。反应完毕后通过 Sephadex G-25 resin 将缓冲溶液置换到 PBS 中。向 Fc 突变体-azido 中加入 10 当量的前述中间体, 混合均匀后再加入 10 当量铜离子催化试剂 (0.005 M 硫酸铜, 0.02 M BTAA 和 0.25 M 抗坏血酸钠) 启动点击反应。室温反应 12-20 小时。反应完毕后, 用 MabPurix 预装柱和 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 纯化得偶联物分子并分析其 DAR 值。

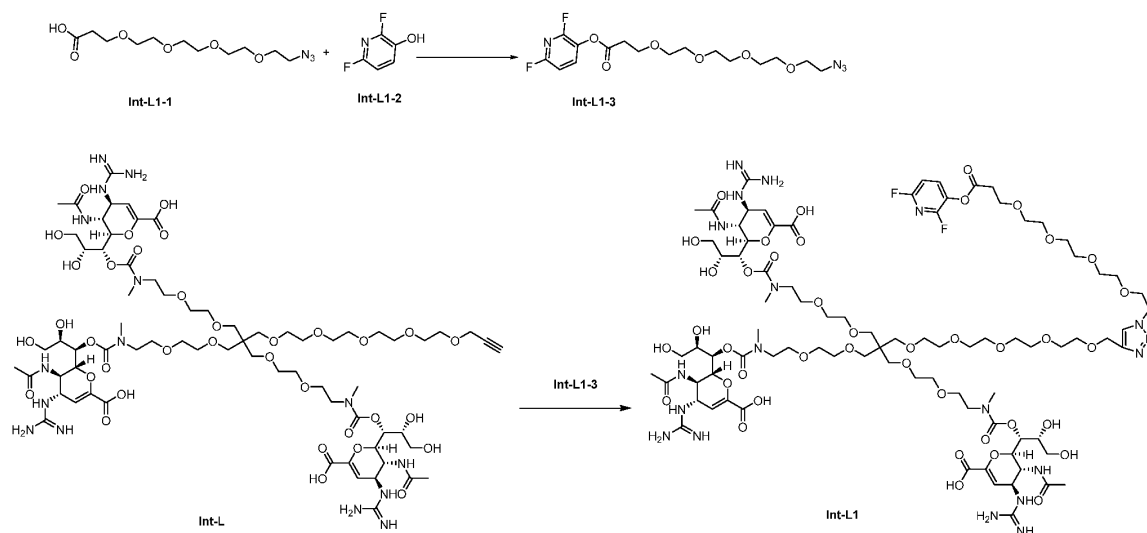
实施例 18 基于糖定点偶联的偶联物 2-D-E1 的合成

配制 click 试剂: 10.0 mg 的 CuSO₄ (5 MM) 溶于 12.53 ml 的 1×PBS 中, 取 5 ml 加入到 43.1 mg 的 BTAA (20MM, CAS: 1334179-85-9, 购自安耐吉) 和 247.5 mg 的抗坏血酸钠 (250 MM) 中溶解备用。

步骤 1: 15 mL 反应管中分别加入 Fc (963.4 μL, 10.38 mg/mL)、1×PBS pH 7.2 (36.6 μL) 和 Endos(WT)(0.1 mg, 122ul, 0.82 mg/ml), 37 度下振荡 3 小时。取出后加入 N₃-PEG3-Oxa(3.11 mg)的 1×PBS pH=7.2 (30 ul) 缓冲溶液, 37 度下振荡 1 小时。反应完毕后, 用 MabPurix 预装柱和 HiLoad Superdex 200 16/600 PG 纯化得 9.5 mg 偶联物分子 Fc-1(收率 95.0%, 纯度 98.5%), DAR 值为 1.82。

步骤 2: 向 15 mL 反应管中分别加入 Fc-1(9.5 mg), 中间体化合物 Int-D(3.39 mg)的 1×PBS pH=6.3 (76 μL)溶液和 click 试剂(529 μL), 室温下振荡 20 小时。用 PBS (pH=5.0)脱盐过柱纯化得偶联物 2-D-E1 (7.5 mg, 收率 78.9%, 纯度 98.0%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 3.80。

实施例 19 中间体 Int-L1 的合成



步骤 1: Int-L1-3 的合成

氮气保护下, 将化合物 Int-L1-1 (0.35 g, 1.20 mmol)和 2, 6-二氟-3 羟基吡啶(0.2 g, 1.56 mmol)溶于 DCM (5 mL)中, 冰水浴冷却下加入 EDCI (0.30 g, 1.56 mmol), 随后反应升到室温搅拌 2 h; 直接浓缩, 反相柱纯化(0.1%的 TFA in H₂O:ACN=60:40)得到 0.48 g Int-L1-3, 收率:

98%。

MS m/z (ESI): 427.1 [M+Na]。

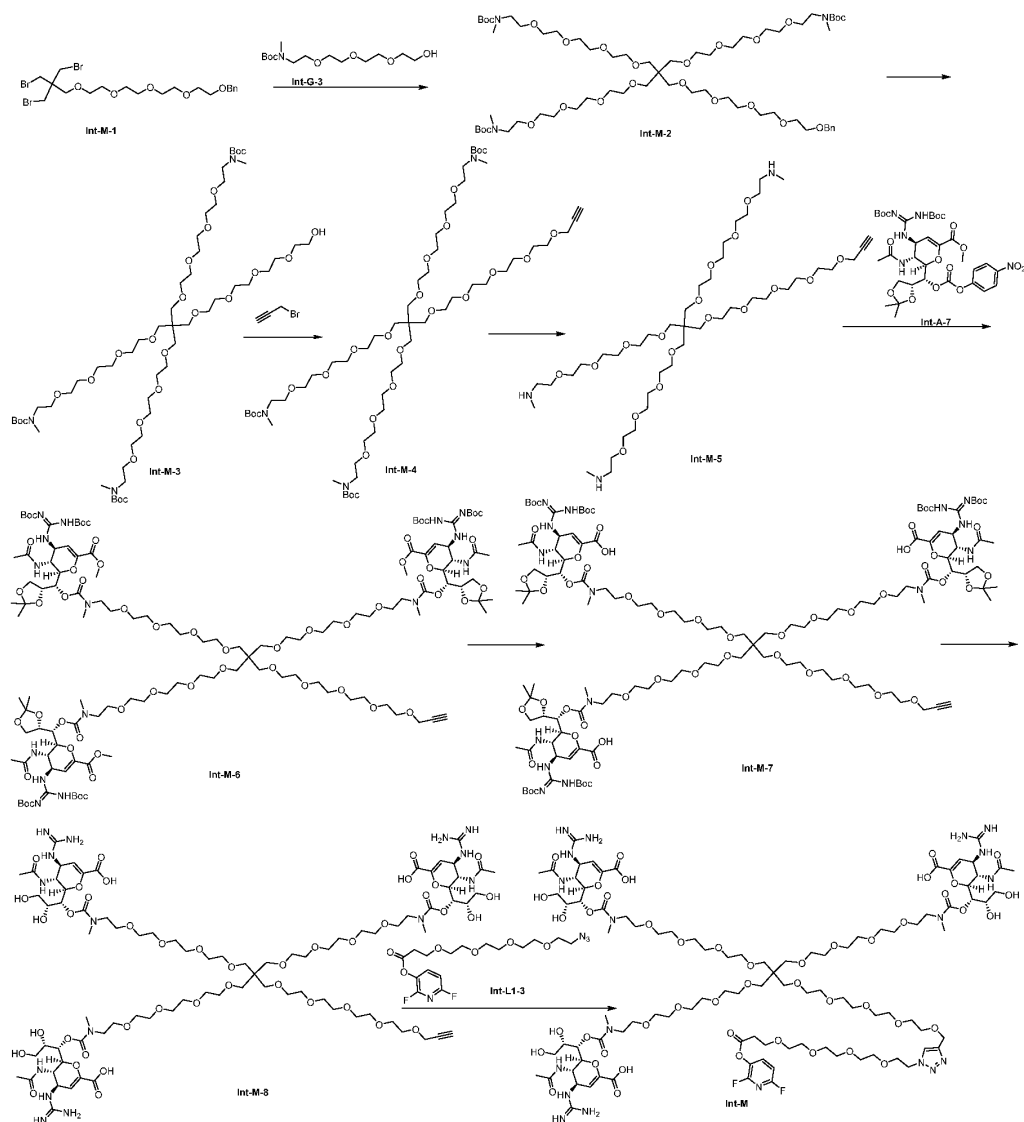
步骤 2: Int-L1 的合成

5 氮气保护下,将化合物 **Int-L**(TFA 盐,0.32 g,0.139 mmol)和 **Int-L1-3**(0.23 g,0.556 mmol)溶于 NMP(1 mL)中,室温下加入六氟磷酸四乙腈铜(0.16 g,0.418 mmol),随后室温反应 20 分钟;直接送 HPLC 制备纯化(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液,流动相 B: 乙腈,梯度配比: B 相 5%-95%)得到 0.2 g 化合物 **Int-L1** 的 TFA 盐,收率: 53.7%, 纯度: 93.9%。

10 ^1H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8.02 (s, 1H), 7.90-7.82 (m, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 5.87 (s, 3H), 4.92-4.89 (m, 5H), 4.59-4.48 (m, 7H), 4.36 (d, 3H), 4.13-3.98 (m, 6H), 3.89-3.81 (m, 5H), 3.75-3.51 (m, 51H), 3.46-3.38 (m, 11H), 3.32-3.13 (m, 3H), 2.93-2.74 (m, 9H), 1.89 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 1067.3 [M/2+H]⁺。

15 实施例 20 中间体 **Int-M** 的合成



步骤 1: Int-M-2 的合成

室温将 KOH (756 mg, 13.5 mmol) 加入 25 mL 的单口瓶中, 加入 DMSO (无水, 5 mL) 搅拌均匀; 加入化合物 **Int-G-3** (1.38 g, 4.5 mmol), 维持室温搅拌 15 分钟; 加入 **Int-M-1** (591 mg, 1.0 mmol), 采用公知方法制备而得, *Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 77, # 20, p. 8879 – 8887) 和 KI (83 mg, 0.5 mmol), 搅拌 10 分钟; 升温至外温 75°C 反应 6 小时; 冷却至室温, 加入 20 mL 乙酸乙酯稀释, 冰水浴下慢慢加入 30 mL 的去离子水, 水相用乙酸乙酯 (2×20 mL) 萃取两次, 合并有机相, 饱和食盐水洗 (20 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到粗品; 粗品经反相柱纯化 (ACN:H₂O = 90%) 得到 1.0 g 化合物 **Int-M-2**, 产率: 78.7%, 纯度: 95%。

MS m/z (ESI): 1293.7 [M+Na].

步骤 2: 化合物 Int-M-3 的合成

将化合物 **Int-M-2** (1.0 g, 0.787 mmol) 和 20% Pd(OH)₂/C (0.8 g) 加入到 50 mL 的单口瓶里, 随后加入 MeOH (30 mL), 室温下搅拌 5 分钟; 随后在一个大气压的氢气压力下置换三次, 加

热到 30 °C, 反应 18 小时; 硅藻土过滤, 滤饼用甲醇(10 mL×3)洗涤三次, 所得滤液直接浓缩得 0.9 g 粗品化合物 **Int-M-3**, 收率 106.06%, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 1198.7 [M+H₂O]。

步骤 3: 化合物 **Int-M-4** 的合成

- 5 将化合物 **Int-M-3** (0.9 g, 0.762 mmol) 溶解在无水 THF (10 mL) 中, 冰水浴冷却至 0 °C, 开启搅拌; 加入叔丁醇钾(1.54 mL, 1.54 mmol, 1M in THF), 随后升到室温并搅拌一个小时; 再次冰浴冷却, 滴入 3-溴丙炔(272 mg, 2.29 mmol), 随后反应慢慢升到室温并反应两个小时; 冰水浴冷却, 反应液用饱和氯化铵水溶液(30 mL)淬灭, 随后用 EtOAc (30 mL×3) 萃取, 有机相合并, 依次用水 (20 mL) 洗和饱和食盐水(20 mL)洗, 无水硫酸钠(30 g)干燥, 过滤减压旋干, 10 所得残留物用反相柱层析纯化(ACN:0.1%TFA in H₂O=50%-75%), 得到 0.8 g 化合物 **Int-M-4**, 纯度: 80 %, 收率: 86%。

MS m/z (ESI): 1118.4 [M-100]。

步骤 4: 化合物 **Int-M-5** 的合成

- 15 将化合物 **Int-M-4** (0.9 g, 0.75 mmol) 溶于 DCM (11 mL) 里, 冰水浴冷却, 开启搅拌, 随后滴入 TFA (11 mL), 反应升到室温并反应两个小时; 停止反应, 直接浓缩, 残余用 DCM (10 mL x 2) 带两次, 随后油泵抽干得粗品化合物 **Int-M-5**, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 459.8 [M/2+H]⁺。

步骤 5: 化合物 **Int-M-6** 的合成

- 20 取化合物 **Int-M-5** (350 mg, 0.382 mmol) 加入到单口瓶里, 室温下加入 DCM (6 mL) 和 DMF (6 mL), 加入 DIEA (0.99 g, 7.65 mmol), 室温下搅拌 5 分钟; 分批加入化合物 **Int-A-7** (0.862 g, 1.15 mmol), 氮气保护下置换三次, 随后加热到 49 °C 反应 10 小时, 停止反应, 直接浓缩, 残余溶于 H₂O (20 mL) 和 EA (20 mL x 2) 萃取, 有机相合并, 减压浓缩, 然后过反相柱纯化 (ACN/H₂O, 90~93% 出产物), 得 0.8 g 化合物 **Int-M-6**, 收率: 75.9%, 纯度: 84%。

MS m/z (ESI): 919.5 [M/3+H]⁺。

- 25 步骤 6: 化合物 **Int-M-7** 的合成

将化合物 **Int-M-6** (0.8 g, 0.29 mmol) 溶于 MeOH (7 mL) 和 THF (7 mL) 里, 冰水浴冷却, 加入 H₂O (7 mL), 随后加入一水合氢氧化锂(88 mg, 2.32 mmol), 反应升到室温并搅拌 3 个小时; 加入阳离子交换树脂, 直到 pH 为 5~6, 随后过滤, 滤饼用 MeOH (10 mL x 2) 洗涤, 滤液浓缩得 0.6g 化合物 **Int-M-7**, 收率: 76.2%。直接下一步。

- 30 MS m/z (ESI): 905.3 [M/3+H]⁺。

步骤 7: 化合物 **Int-M-8** 的合成

- 将化合物 **Int-M-7** (0.6 g, 0.224 mmol) 溶于 DCM (4 mL) 中, 冰水浴冷却下加入 TFA (4 mL), 随后反应升到室温并搅拌 2 个小时; 直接浓缩, 残余用二氯甲烷(4 mL)带两次, 随后溶于 ACN (5 mL) 和 H₂O (5 mL) 里, 室温搅拌 3 个小时; 直接浓缩, 反相柱纯化(ACN/0.1%TFA in H₂O, 35 40% 出产物)得到 0.42g 化合物 **Int-M-8** 的 TFA 盐, 收率: 73%, 纯度: 87.6%。

MS m/z (ESI): 997.3 [M/2+H]⁺。

步骤 8: 化合物 **Int-M** 的合成

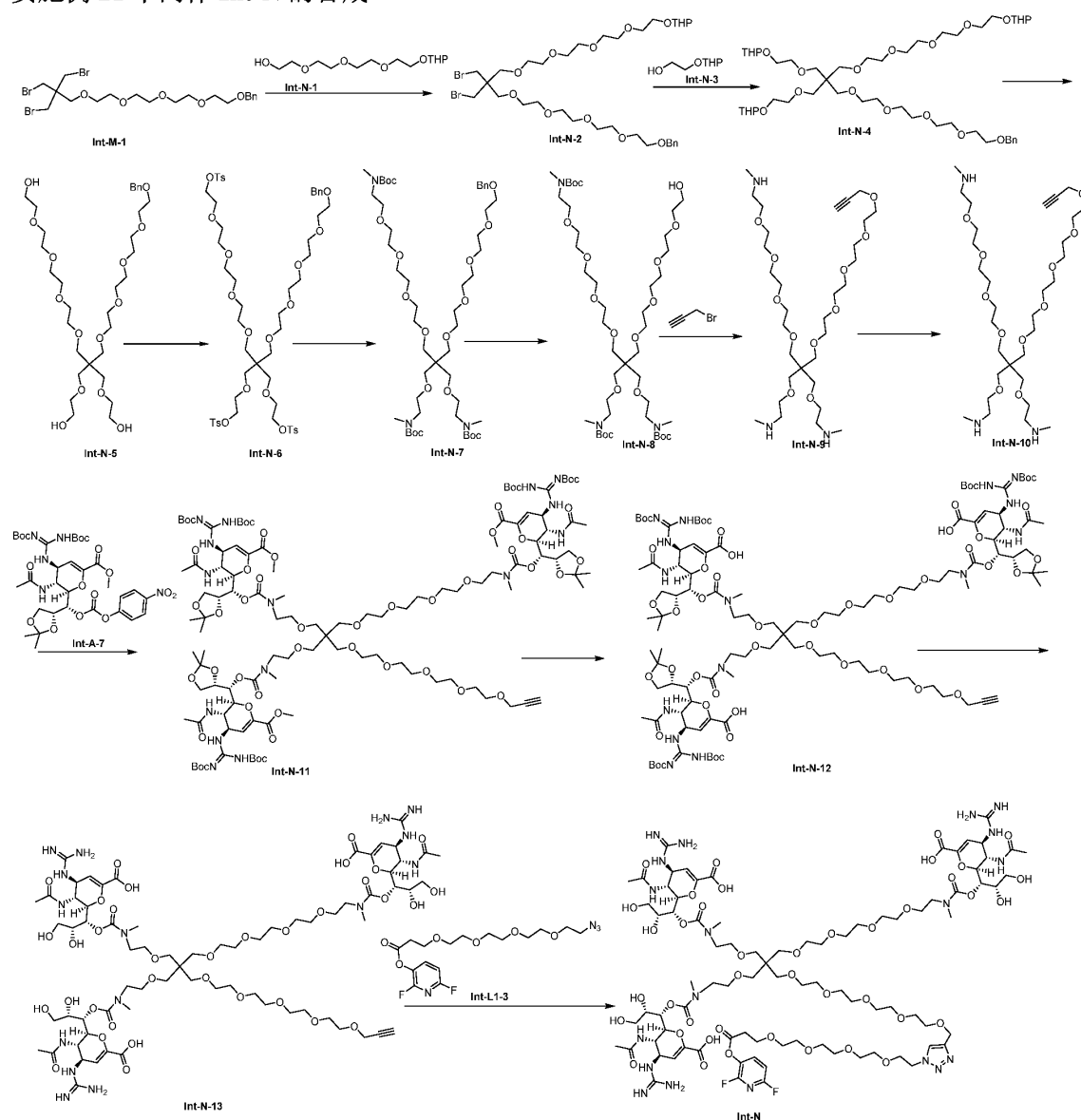
氮气保护下, 将化合物 **Int-M-8** (TFA 盐, 50 mg, 0.025 mmol) 和化合物 **Int-L1-3** (55 mg, 0.15 mmol) 溶于 NMP (1 mL) 中, 室温下加入六氟磷酸四乙腈铜 (27 mg, 0.075 mmol), 随后室温反应 20 分钟; 直接送 HPLC 制备纯化 (Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 得到 35 mg 化合物 **Int-M** 的 TFA 盐, 5 收率: 58%, 纯度: 92.8%。

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.99 (s, 1H), 7.90-7.82 (m, 1H), 7.02-6.98 (m, 1H), 5.77 (s, 3H), 4.92-4.88 (m, 5H), 4.59-4.46 (m, 13H), 4.35 (d, 5H), 4.13-3.98 (m, 10H), 3.89-3.81 (m, 6H), 3.68-3.50 (m, 47H), 3.46-3.39 (m, 11H), 3.30-3.15 (m, 11H), 2.93-2.88 (m, 7H), 2.81 (s, 6H), 1.89 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 1199.4 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$.

10

实施例 21 中间体 **Int-N** 的合成



步骤 1: 化合物 Int-N-2 的合成

冰水浴下, 将化合物 **Int-M-1** (2.2 g, 3.72 mmol, 采用公知方法制备而得, *Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 77, # 20, p. 8879–8887) 加入 50 mL 的单口瓶中, 加入 DMAc (无水, 10 ml) 搅拌均匀; 加入 tBuOK (477 mg, 5.0 mmol), 搅拌 10 分钟; 加入化合物 **Int-N-1** (购自乐研, 5 0.69 g, 2.47 mmol), 升温至外温 60°C 反应 16 小时; 冷却至室温, 加入 20 mL 乙酸乙酯稀释, 冰水浴下慢慢加入 30 ml 的去离子水, 水相用乙酸乙酯(2×20 ml)萃取两次, 合并有机相, 饱和食盐水洗 (20 ml), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到粗品; 粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O =70%)得到 1.5 g 化合物 **Int-N-2**, 产率: 76%, 纯度: 92%。

MS m/z (ESI): 806.2 [M+H₂O]。

10 步骤 2: 化合物 Int-N-4 的合成

室温将 KOH (1.92 g, 34.24 mmol) 加入 25 mL 的单口瓶中, 加入 DMSO (无水, 5 ml) 搅拌均匀; 加入化合物 **Int-N-3** (1.67 g, 11.41 mmol), 维持室温搅拌 15 分钟; 加入化合物 **Int-N-2** (1.5 g, 1.9 mmol) 和 KI (157 mg, 0.95 mmol), 搅拌 10 分钟; 升温至外温 75°C 反应 6 小时; 冷却至室温, 加入 20 mL 乙酸乙酯稀释, 冰水浴下慢慢加入 30 ml 的去离子水, 水相用乙酸乙酯(2×20 ml)萃取两次, 合并有机相, 饱和食盐水洗 (20 ml), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到粗品; 粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O =90%)得到 1.5 g 化合物 **Int-N-4**, 产率: 85%, 纯度: 90%。

MS m/z (ESI): 936.6 [M+ H₂O]。

步骤 3: 化合物 Int-N-5 的合成

20 将化合物 **Int-N-4** (1.5 g, 1.63 mmol) 溶于无水甲醇(15 mL), 加入盐酸 (0.4 mL, 5.0 mmol, 12M)。反应在室温下搅拌 1 小时, 反应结束后, 浓缩, 得到 1.1 g 粗品化合物 **Int-N-5**, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 667.4 [M+H]⁺。

步骤 4: 化合物 Int-N-6 的合成

25 冰水浴下, 将粗品化合物 **Int-N-5** (1.1 g, 1.63 mmol) 溶于吡啶 (20 mL), 加入对甲苯磺酰氯 (6.29 g, 33.0 mmol)。反应在室温下搅拌过夜, 反应结束后, 浓缩, 粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O =90%)得到 0.75 g 化合物 **Int-N-6**, 产率: 40%, 纯度: 95%。

MS m/z (ESI): 1129.5 [M+H]⁺。

步骤 5: 化合物 Int-N-7 的合成

30 将化合物 **Int-N-6** (0.75 g, 0.67 mmol) 溶于甲胺的乙醇溶液(5 mL, 约 30%), 室温下搅拌过夜。反应结束后, 浓缩, 浓缩液用 DCM (10 mL) 溶解, 加入 Boc₂O (2.47 g, 11.33 mmol) 和三乙胺(2.29 g, 22.66 mmol), 搅拌过夜, 直接浓缩, 粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O =95%)得到 0.2 g 化合物 **Int-N-7**, 收率: 35%, 纯度: 94%。

MS m/z (ESI): 1023.6 [M+ H₂O]。

35 步骤 6: 化合物 Int-N-8 的合成

将化合物 **Int-N-7** (0.2 g, 0.198 mmol) 和 20% Pd(OH)₂/C (0.1 g) 加入到 50 mL 的单口瓶里, 随后加入 MeOH (10 mL), 室温下搅拌 5 分钟; 随后在一个大气压的氢气压力下置换三次, 加

热到 30 °C, 反应 18 小时; 硅藻土过滤, 滤饼用甲醇(5 mL×3)洗涤三次, 所得滤液直接浓缩得 0.182 g 粗品化合物 **Int-N-8**, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 933.6 [M+18]。

步骤 7: 化合物 **Int-N-9** 的合成

- 5 将化合物 **Int-N-8** (0.182 g, 0.198 mmol) 溶解在无水 THF (5 mL) 中, 冰水浴冷却至 0°C, 开启搅拌; 加入叔丁醇钾(0.5 mL, 0.5 mmol, 1M in THF), 随后升到室温并搅拌一个小时; 再次冰浴冷却, 滴入 3-溴丙炔(70.9 mg, 0.595 mmol), 随后反应慢慢升到室温并反应两个小时; 冰水浴冷却, 反应液用饱和氯化铵水溶液(10 mL)淬灭, 随后用 EtOAc (10 mL×3) 萃取, 有机相合并, 依次用水 (10 mL) 洗和饱和食盐水(10 mL)洗, 无水硫酸钠(5 g)干燥, 过滤减压旋干, 10 所得残留物用反相柱层析纯化(ACN:0.1%TFA in H₂O =65%-75%), 得到 0.15 g 化合物 **Int-N-9**, 收率: 79%。

MS m/z (ESI): 971.6 [M+ H₂O]。

步骤 8: 化合物 **Int-N-10** 的合成

- 15 将化合物 **Int-N-9** (0.15 g, 0.157 mmol) 溶于 DCM (1.5 mL) 里, 冰水浴冷却, 开启搅拌, 随后滴入 TFA (1.5 mL), 反应升到室温并反应两个小时; 停止反应, 直接浓缩, 残余用 DCM (5 mL x 2) 带两次, 随后油泵抽干得粗品化合物 **Int-N-10**, 直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 654.3 [M+H]⁺。

步骤 9: 化合物 **Int-N-11** 的合成

- 20 取化合物 **Int-N-10** (103 mg, 0.157 mmol) 加入到单口瓶里, 室温下加入 DCM (2 mL) 和 DMF (2 mL), 加入 DIEA (0.41 g, 3.15 mmol), 室温下搅拌 5 分钟; 分批加入化合物 **Int-A-7** (0.355 g, 0.472 mmol), 氮气保护下置换三次, 随后加热到 49°C 反应 10 小时, 停止反应, 直接浓缩, 残余溶于 H₂O (10 mL) 和 EA (10 mL x2) 萃取, 有机相合并, 减压浓缩, 然后过反相柱纯化 (ACN/H₂O, 90~93% 出产物), 得 0.2 g 化合物 **Int-N-11**, 收率: 50.95%。

MS m/z (ESI): 831.4 [M/3+H]⁺。

- 25 步骤 10: 化合物 **Int-N-12** 的合成

将化合物 **Int-N-11** (0.2 g, 0.083 mmol) 溶于 MeOH (1.5 mL) 和 THF (1.5 mL) 里, 冰水浴冷却, 加入 H₂O (1.5 mL), 随后加入一水合氢氧化锂(25 mg, 0.66 mmol), 反应升到室温并搅拌 3 个小时; 加入阳离子交换树脂, 直到 pH 为 5~6, 随后过滤, 滤饼用 MeOH (3 mL x 2) 洗涤, 滤液浓缩得 0.19g 粗品化合物 **Int-N-12**, 直接下一步。

- 30 MS m/z (ESI): 817.3 [M/3+H]⁺。

步骤 11: 化合物 **Int-N-13** 的合成

- 将化合物 **Int-N-12** (0.19 g, 0.08 mmol) 溶于 DCM (1.8 mL) 中, 冰水浴冷却下加入 TFA (1.8 mL), 随后反应升到室温并搅拌 2 个小时; 直接浓缩, 残余用二氯甲烷(3 mL)带两次, 随后溶于 ACN (3 mL) 和 H₂O (3 mL) 里, 室温搅拌 3 个小时; 直接浓缩, 反相柱纯化(ACN/0.1%TFA 35 in H₂O, 40% 出产物)得到 90 mg 化合物 **Int-N-13** 的 TFA 盐, 收率: 46%。

MS m/z (ESI): 577.1 [M/3+H]⁺。

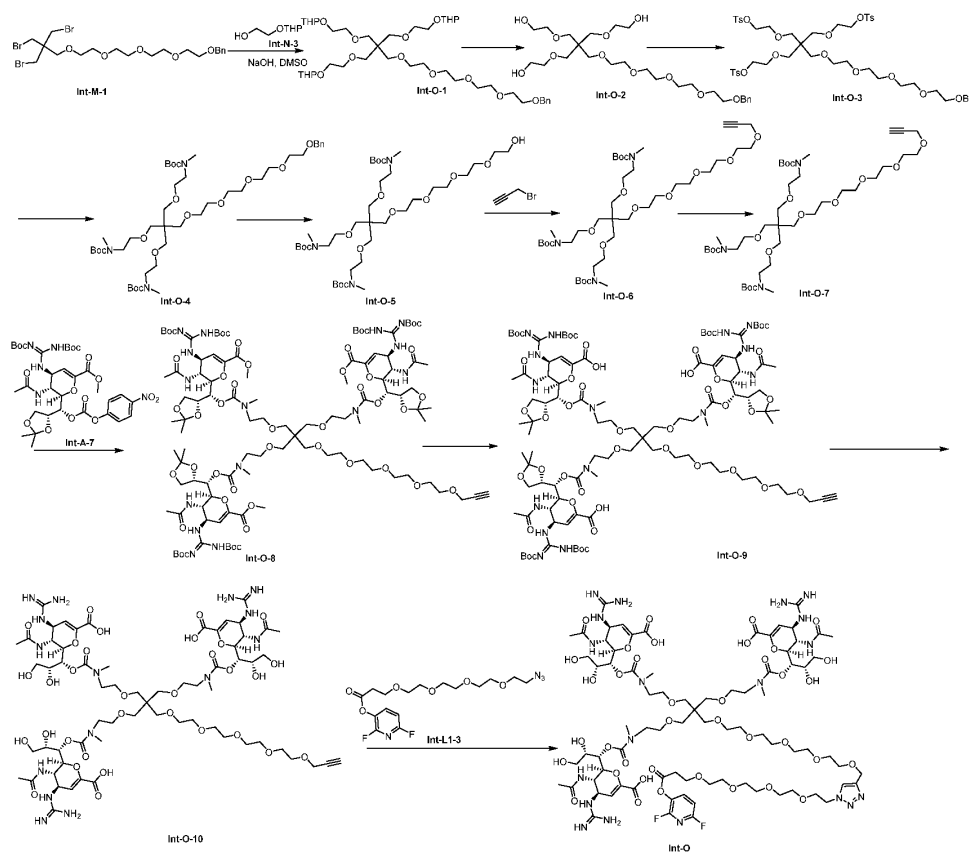
步骤 12: 化合物 **Int-N** 的合成

氮气保护下, 将化合物 **Int-N-13** (TFA 盐, 80 mg, 0.035 mmol) 和化合物 **Int-L1-3** (140 mg, 0.35 mmol) 溶于 NMP (1 mL) 中, 室温下加入六氟磷酸四乙腈铜 (65 mg, 0.174 mmol), 随后室温反应 20 分钟; 直接送 HPLC 制备纯化 (Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 得到 12.5 mg 化合物 **Int-N** 的 TFA 盐, 收率: 10%, 纯度: 90.8%。

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.98 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 1H), 7.01-6.97 (m, 1H), 5.80 (s, 3H), 4.91-4.85 (m, 5H), 4.60-4.46 (m, 10H), 4.34 (d, 5H), 4.12-3.98 (m, 8H), 3.88-3.81 (m, 6H), 3.62-3.50 (m, 44H), 3.45-3.29 (m, 10H), 2.93-2.88 (m, 6H), 2.81 (s, 6H), 1.88 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 711.9 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$.

实施例 22 中间体 **Int-O** 的合成



步骤 1: 化合物 **Int-O-1** 的合成

室温将 KOH (0.96 g, 17.12 mmol) 加入 25 mL 的单口瓶中, 加入 DMSO (无水, 5 mL) 搅拌均匀; 加入化合物 **Int-N-3** (购自乐研, 1.32 g, 9.0 mmol), 维持室温搅拌 15 分钟; 加入化合物 **Int-M-1** (1.18 g, 2.0 mmol, 采用公知方法制备而得, *Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 77, # 20, p. 8879 – 8887) 和 KI (166 mg, 0.5 mmol), 搅拌 10 分钟; 升温至外温 75 $^{\circ}\text{C}$ 反应 6 小时; 冷却至室温, 加入 20 mL 乙酸乙酯稀释, 冰水浴下慢慢加入 20 mL 的去离子水, 水相用乙酸乙酯 (2 $\times$ 20 mL) 萃取两次, 合并有机相, 饱和食盐水洗 (20 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩过

得到粗品；粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O=90%)得到 1.0 g 化合物 **Int-O-1**，产率：67%，纯度：95%。

MS m/z (ESI): 804.5 [M+ H₂O]。

步骤 2: 化合物 **Int-O-2** 的合成

- 5 将化合物 **Int-O-1** (1.0 g, 1.27 mmol)溶于无水甲醇(10 mL)，加入盐酸 (0.53 mL, 6.4 mmol, 12M)。反应在室温下搅拌 1 小时，反应结束后，浓缩，得到 0.9 g 粗品化合物 **Int-O-2**，直接用于下一步。

MS m/z (ESI):535.3 [M+H]⁺。

步骤 3: 化合物 **Int-O-3** 的合成

- 10 冰水浴下，将粗品化合物 **Int-O-2** (0.9 g, 1.27 mmol) 溶于吡啶 (15 mL)，加入对甲苯磺酰氯 (4.2 g, 22.0 mmol)。反应在室温下搅拌过夜，反应结束后，浓缩，粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O=90%)得到 0.8 g 化合物 **Int-O-3**，产率：63%，纯度：95%。

MS m/z (ESI):997.5 [M+H]⁺。

步骤 4: 化合物 **Int-O-4** 的合成

- 15 将化合物 **Int-O-3** (0.8 g, 0.8 mmol) 溶于甲胺的乙醇溶液(8 mL, 约 30%)，室温下搅拌过夜。反应结束后，浓缩，浓缩液用 DCM (10 mL)溶解，加入 Boc₂O (2.18 g, 10.0 mmol)和三乙胺(2.02 g, 20.0 mmol)，搅拌过夜，直接浓缩，粗品经反相柱纯化(ACN:H₂O=95%)得到 0.5 g 化合物 **Int-O-4**，收率:72%，纯度：95%。

MS m/z (ESI):891.6 [M+ H₂O]。

20 步骤 5: 化合物 **Int-O-5** 的合成

将化合物 **Int-O-4** (0.255 g, 0.291 mmol)溶于 10 mL MeOH 中，加入 20% 氢氧化钡碳(0.255 g)。用氢气置换体系中的空气四次，然后在氢气气氛下室温反应十小时。反应结束后，过滤、浓缩得 0.22 g 粗品化合物 **Int-O-5**，直接用于下一步。收率：96.1%

MS m/z (ESI):806.48 [M+Na]。

25 步骤 6: 化合物 **Int-O-6** 的合成

- 将化合物 **Int-O-5** (0.2 g, 0.28 mmol)溶于干燥四氢呋喃(4 mL)，然后在冰水浴冷却下加入叔丁醇钾的 THF 溶液 (0.56 mL, 0.56 mmol)。加完后，反应在室温下搅拌一小时。再用冰水浴冷却，向其中加入溴代丙炔(0.1 g, 0.84 mmol)，加完后反应自然升至室温搅拌 2h。反应液冰水浴降温后，饱和氯化铵水溶液淬灭，乙酸乙酯萃取干燥，浓缩，浓过柱纯化(水: 乙腈=35%)
30 得 0.174 g 化合物 **Int-O-6**，收率:75%。

MS m/z (ESI):844.53 [M+Na]。

步骤 7: 化合物 **Int-O-7** 的合成

- 将化合物 **Int-O-6** (174 mg, 0.211 mmol)溶于 DCM (2 mL)，然后在冰水浴冷却下加入三氟乙酸 (2 mL)。反应自然升温下搅拌 1 小时，反应结束后，浓缩，得到 147 mg 粗品化合物 **Int-O-7**，直接用于下一步。

MS m/z (ESI): 522.4 [M+H]⁺。

步骤 8: 化合物 **Int-O-8** 的合成

往化合物 **Int-O-7** (147 mg, 0.295 mmol) 的 *N,N*-二甲基甲酰胺(4 mL)和二氯甲烷 (4 mL) 溶液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(728 mg, 5.64 mmol)室温搅拌 5min, 分批次加入化合物 **Int-A-7** (635 mg, 0.845 mmol), 然后加热到 49°C 搅拌过夜。反应液室温浓缩去除二氯甲烷和 *N,N*-二甲基甲酰胺, 过柱纯化 (乙腈: 水=95%) 得 274 mg 化合物 **Int-O-8**, 收率: 41%。

5 MS m/z (ESI): 787.2 [M/3+H]⁺。

步骤 9: 化合物 **Int-O-9** 的合成

冰水浴下, 往化合物 **Int-O-8** (274 mg, 0.116 mmol) 的甲醇(3 mL)、四氢呋喃(3 mL)溶液中加入氢氧化锂一水合物(38 mg, 0.928 mmol)的水溶液(3 mL)。自然升温反应完后反应液使用离子交换树脂 IRN77 调至 pH=5~6, 过滤后的母液浓缩得到 243 mg 化合物 **Int-O-9**, 收率:

10 90%。

MS m/z (ESI): 773.3 [M/3+H]⁺。

步骤 10: 化合物 **Int-O-10** 的合成

冰水浴下, 往化合物 **Int-O-9** (243 mg, 0.104 mmol) 的二氯甲烷(2 mL)溶液中加入三氟乙酸 (2 mL)。反应在室温下搅拌 1 小时。反应结束后, 减压浓缩, 随后加入乙腈 (2mL) 和水(1 mL), 并在室温下搅拌 3 小时。反应液浓缩后, 过柱纯化 (0.1%TFA in H₂O : 乙腈 = 75%) 得到 213 mg 化合物 **Int-O-10** 的 TFA 盐, 收率: 93.75%。

MS m/z (ESI): 573.1 [M/3+H]⁺。

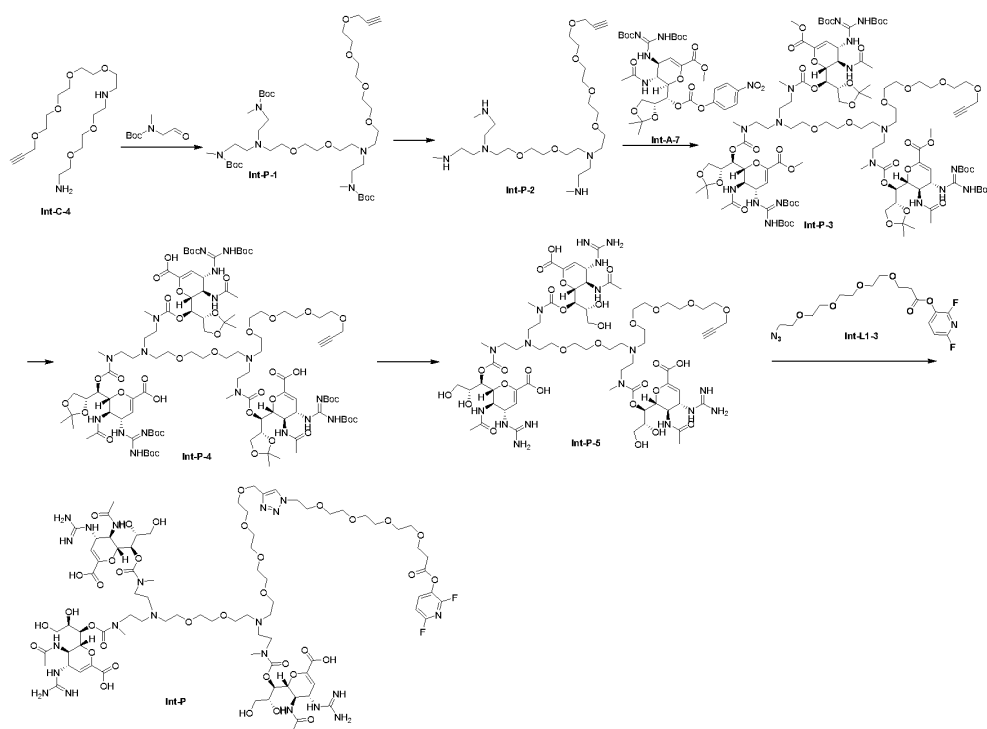
步骤 11: 化合物 **Int-O** 的合成

往化合物 **Int-O-10** (TFA 盐, 200 mg, 0.092 mmol) 的 *N*-甲基吡咯烷酮 (0.5 mL) 溶液中依次加入六氟磷酸四乙腈铜(103 mg, 0.276 mmol)和化合物 **Int-L1-3** (149 mg, 0.369 mmol)。反应在室温下搅拌 20 分钟。反应液经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5μm; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%)制备纯化得到 38 mg 化合物 **Int-O** 的 TFA 盐, 收率: 20.57%。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.99 (s, 1H), 7.77 (t, 1H), 7.01-6.97 (m, 1H), 5.66 (s, 3H), 4.89-4.83 (m, 5H), 4.59-4.31 (m, 13H), 4.06 (d, 9H), 3.88-3.81 (m, 6H), 3.62-3.42 (m, 42H), 3.41-3.27 (m, 12H), 3.22-2.97 (m, 3H), 2.93-2.88 (m, 8H), 2.81 (s, 6H), 2.62 (s, 2H), 1.87 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 667.8 [M/3+H]⁺。

实施例 23 中间体 **Int-P** 的合成



步骤 1: 化合物 Int-P-1 的合成

将化合物 Int-C-4 (1 g, 2.76 mmol) 溶解在甲醇 (10 mL) 中, 再加入 N-叔丁氧羰基-(甲氨基) 乙醛 (2.87 g, 16.55 mmol, 购自乐研) 和 1 滴醋酸, 20 度下搅拌 1 小时。冰水冷却下再加入三乙氧基硼氢化钠 (2.92 g, 13.79 mmol), 后自然升至 20 度反应 16 小时。旋干溶剂, 残留物加水 and 二氯甲烷搅拌, 分液, 有机相浓缩至干, 过柱纯化 (甲醇: 二氯甲烷=7%) 出产物, 收集旋干得到 1.9 g 化合物 Int-P-1, 收率 82.57%。

MS (ESI): m/z 835.6 $[M+1]^+$ 。

步骤 2: 化合物 Int-P-2 的合成

将化合物 Int-P-1 (0.52 g, 623.43 μmol) 溶解于二氯甲烷 (2.5 mL) 中搅拌。冰水冷却下再加入 4.0 M 氯化氢二氧六环溶液 (5 mL) 搅拌 1-2 小时。旋干溶剂, 得到 330 mg 化合物 Int-P-2, 收率 100%。

MS (ESI): m/z 535.4 $[M+1]^+$ 。

步骤 3: 化合物 Int-P-3 的合成

将化合物 Int-P-2 (0.33 g, 623.43 μmol) 和 Int-A-7 (1.82 g, 1.37 mmol) 溶解在 N, N-二甲基甲酰胺 (4 mL) 中。冰水冷却下再加入二异丙基乙胺 (1.21 g, 9.35 mmol), 再自然升至室温反应 16 小时。反应液直接上反相柱, 过柱纯化 (甲醇: 水=100%) 出产物, 收集旋干得到 0.76 g 化合物 Int-P-3 的 TFA 盐 (收率 51.4%)。

MS (ESI): m/z 1186.3 $([M+1]/2)^+$ 。

步骤 4: 化合物 Int-P-4 的合成

将化合物 **Int-P-3** (0.76 g, 320.46 μmol) 溶解在甲醇 (6 mL) 和水 (6 mL) 中。冰水冷却下再加入一水合氢氧化锂 (80.69 mg, 1.92 mmol)，自然升至室温反应 3 小时。冰水冷却下反应液加强酸性树脂调节 pH 值到 5-6，抽滤旋干得到 0.74 g 化合物 **Int-P-4**，收率 99%。

MS (ESI): m/z 1165.1 ($[M+1]/2$)⁺。

5 步骤 5: 化合物 **Int-P-5** 的合成

将化合物 **Int-P-4** (0.74 g, 317.66 μmol) 溶解在二氯甲烷 (4 mL) 中。冰水冷却下再加入三氟醋酸 (3.5 mL)，自然升至室温反应 3 小时。旋干溶剂再加水 (4 mL) 溶解，反相制备(乙腈:0.1%TFA in H₂O = 25%)得到 0.15 g 化合物 **Int-P-5** 的 TFA 盐，收率 29.35%。

MS (ESI): m/z 804.9 ($[M+1]/2$)⁺。

10 步骤 6: 化合物 **Int-P** 的合成

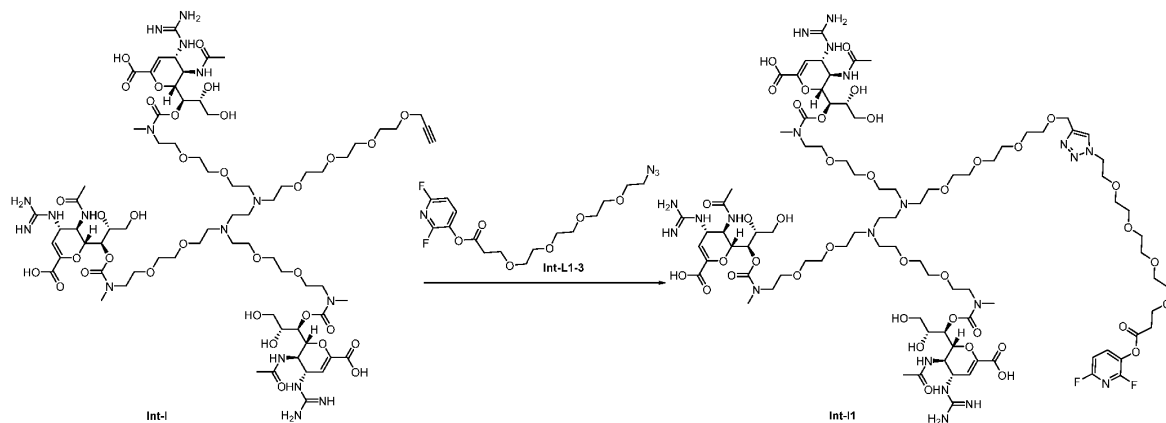
往化合物 **Int-P-5** (TFA 盐, 143 mg, 0.064 mmol) 的 N-甲基吡咯烷酮 (1.0 mL) 溶液中依次加入六氟磷酸四乙腈铜(71.8 mg, 0.193 mmol) 和化合物 **Int-L1-3** (155 mg, 0.385 mmol)。反应在室温下搅拌 20 分钟。反应液经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μm ; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到 80 mg 化合物 **Int-P** 的 TFA 盐, 收率: 48.2%。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.98 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 1H), 7.01-6.97 (m, 1H), 5.88 (d, 3H), 4.99-4.84 (m, 3H), 4.62-4.32 (m, 14H), 4.15-3.99 (m, 7H), 3.89-3.74 (m, 10H), 3.65-3.40 (m, 50H), 2.93-2.82 (m, 9H), 1.89 (s, 9H)。

MS m/z (ESI): 671.8 $[M/3+H]$ ⁺。

20

实施例 24 中间体 **Int-I1** 的合成



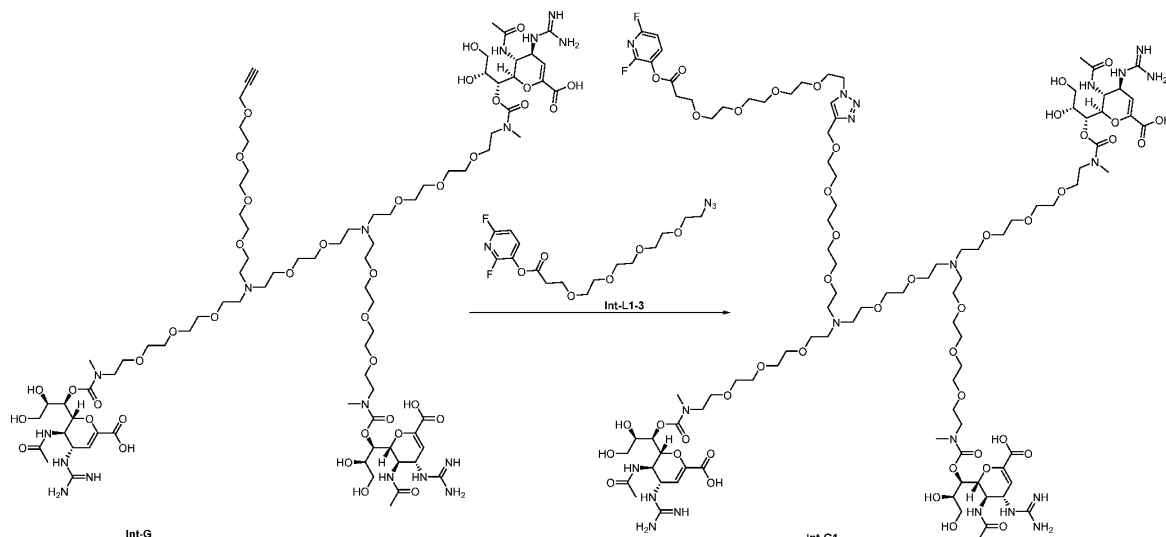
往化合物 **Int-I** (TFA 盐, 182 mg, 0.0741 mmol) 的 N-甲基吡咯烷酮 (1.5 mL) 溶液中依次加入六氟磷酸四乙腈铜(83 mg, 0.222 mmol) 和化合物 **Int-L1-3** (179 mg, 0.444 mmol)。反应在室温下搅拌 20 分钟。反应液经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μm ; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到 70 mg 化合物 **Int-I1** 的 TFA 盐, 收率: 34.2%。

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.99 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 5.80 (d, 3H),

4.90-4.86 (m, 3H), 4.59-4.34 (m, 10H), 4.14-4.05 (m, 6H), 3.88-3.74 (m, 10H), 3.63-3.41 (m, 64H), 3.21-3.09 (m, 3H), 2.93-2.85 (m, 6H), 2.81 (s, 6H), 1.89 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 730.9 $[M/3+H]^+$.

5 实施例 25 中间体 Int-G1 的合成

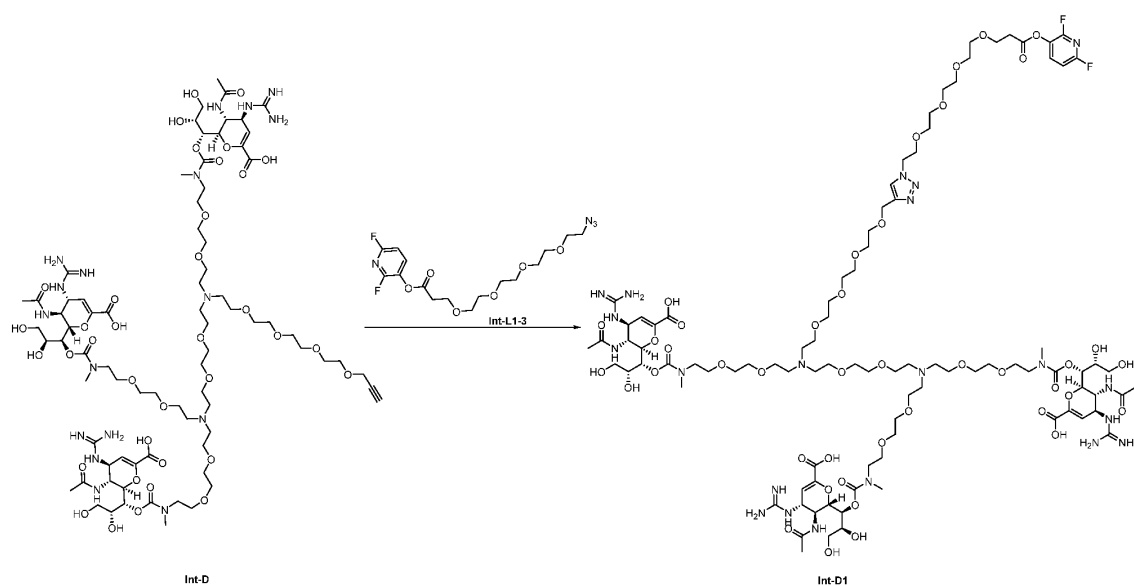


往化合物 **Int-G** (TFA 盐, 240 mg, 0.089 mmol) 的 N-甲基吡咯烷酮 (1.0 mL) 溶液中依次加入六氟磷酸四乙腈铜 (109 mg, 0.293 mmol) 和化合物 **1-3** (237 mg, 0.586 mmol)。反应在室温下
 10 搅拌 20 分钟。反应液经高效液相色谱法 (Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到 100 mg 化合物 **Int-G1** 的 TFA 盐, 收率: 37.1%。

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.99 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 1H), 7.01-6.99 (m, 1H), 5.84 (d, 3H), 4.91-4.87 (m, 3H), 4.61-4.47 (m, 7H), 4.38-4.35 (m, 3H), 4.14-3.98 (m, 7H), 3.88-3.78 (m, 16H),
 15 3.64-3.41 (m, 76H), 3.21-3.11 (m, 4H), 2.93-2.83 (m, 6H), 2.81 (s, 6H), 1.89 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 804.0 $[M/3+H]^+$.

实施例 26 中间体 Int-D1 的合成

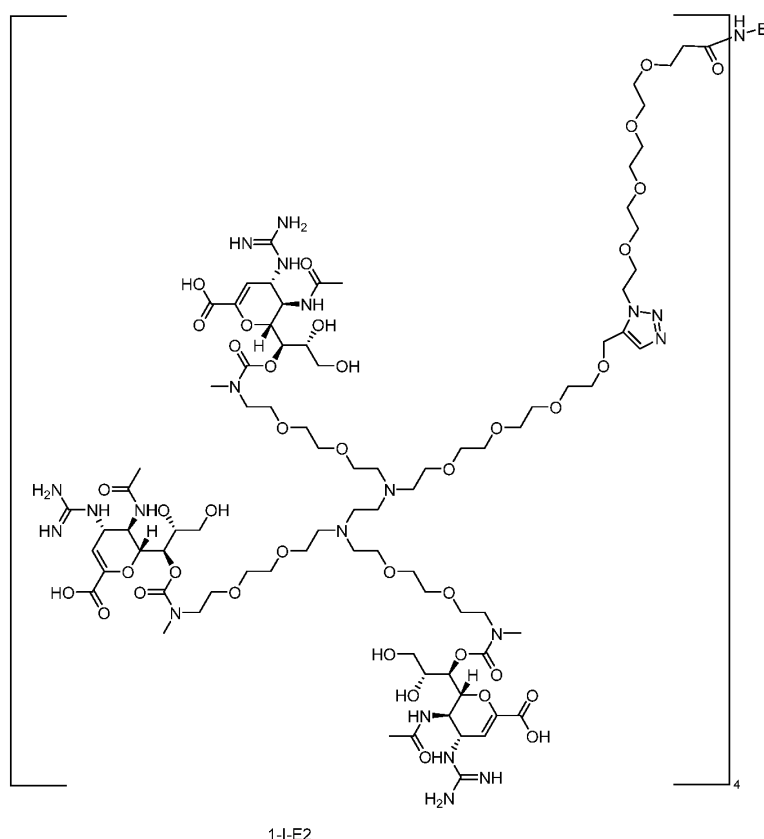


往化合物 **Int-D** (TFA 盐, 260 mg, 0.139 mmol) 的 N-甲基吡咯烷酮 (2.5 mL) 溶液中依次加入六氟磷酸四乙腈铜(156 mg, 0.419 mmol) 和化合物 **Int-L1-3** (339 mg, 0.838 mmol)。反应在室温下搅拌 20 分钟。反应液经高效液相色谱法(Waters XBridge, 19*150mm, 5 μ m; 流动相 A: 0.05% TFA 水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度配比: B 相 5%-95%) 制备纯化得到 210 mg 化合物 **Int-D1** 的 TFA 盐, 收率: 53.1%。

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 7.99 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 5.91 (d, 3H), 4.91-4.87 (m, 3H), 4.59-4.48 (m, 6H), 4.37-4.36 (m, 3H), 4.13-3.97 (m, 6H), 3.88-3.78 (m, 12H), 3.64-3.41 (m, 70H), 3.20-3.09 (m, 4H), 2.93-2.87 (m, 6H), 2.80 (s, 6H), 1.88 (s, 9H).

MS m/z (ESI): 759.9 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$ 。

实施例 27 偶联物 1-I-E2 的制备

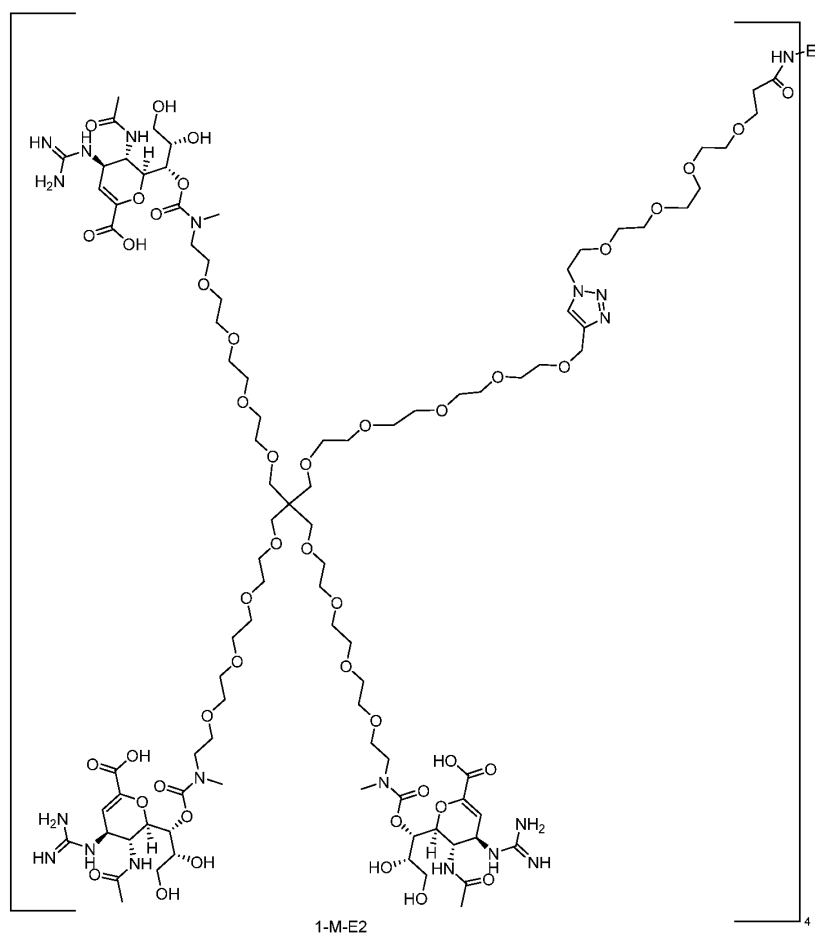


20 mM NaOAc/HOAc pH=5.0 的配制: NaOAc 3.28 g 溶于 1.8 L 注射用水中, 用浓 HOAc 调 pH=5.0, 定容成 2.0 L, 用 20 uM 膜过滤系统过滤。

1.0 M NaHCO₃/Na₂CO₃ pH 9.5 的配制: A 相: 50 mL 1.0 M NaHCO₃(4.2 g), B 相: 50 mL 1.0 M Na₂CO₃(5.3 g) 往 A 相中加入 B 相调 pH 为 9.5 备用。

步骤: 2mL 反应管中分别加入蛋白 E2 (3.0 mg, 0.05 μ mol, 103.5 μ L, 其序列如 SEQ ID NO: 8 所示), 20 mM NaOAc/HOAc pH=5.0 buffer 46.5 μ L), 用 1.0 M NaHCO₃/Na₂CO₃ pH=9.5 (6 uL) 调 pH 至 9.0-9.5 之间, 大约 pH=9.23。加入 **Int-I1**(593.03 μ g, 0.27 μ mol, 5eq) 的 DMSO 溶液 (9 μ L), pH=8.83, 用 1.0 M NaHCO₃/Na₂CO₃ pH=9.5 (0.6 uL) 调 pH 至 9.0-9.5, 大约 pH=9.21。25 度振荡 1 小时。每隔 1h, 补加 **Int-I1** 分别为 2/2/1eq, 用 1.0 M NaHCO₃/Na₂CO₃ pH=9.5 (0.5uL) 调 pH 至 9.0-9.5, pH=9.35, 25 度振荡 1 小时; 共补加 3 次, 小分子总量为 10eq 后, 用 PBS 5.0buffer 超滤 4 次, 得偶联产物 **1-I-E2** (2.92mg, 收率 97.4%, 纯度 98.3%)。经质谱分析, DAR=4.36。

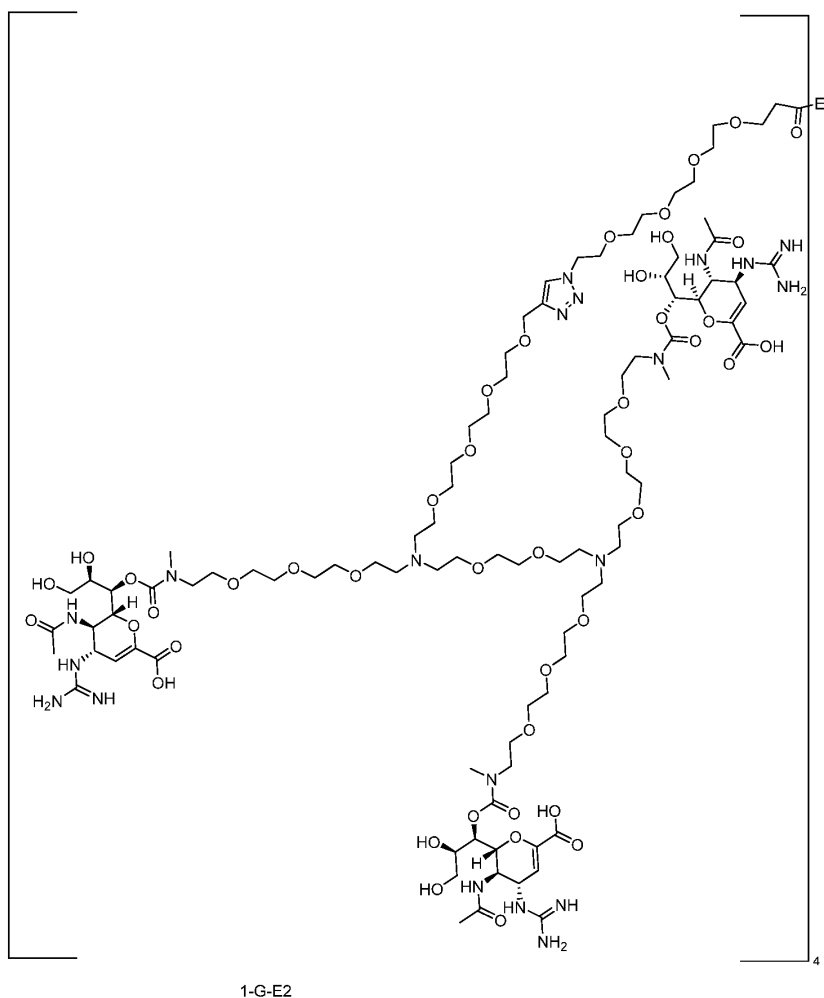
15 实施例 28 偶联物 1-M-E2 的制备



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1h，补加 **Int-M** 分别为 1/1/1 eq，共补加 3 次，小分子总量为 8 eq，超滤后得偶联产物 **1-M-E2** (2.51mg, 收率 83.7%, 纯度 98.4%)。经质谱分析，DAR=4.48。

5

实施例 29 偶联物 **1-G-E2** 的制备

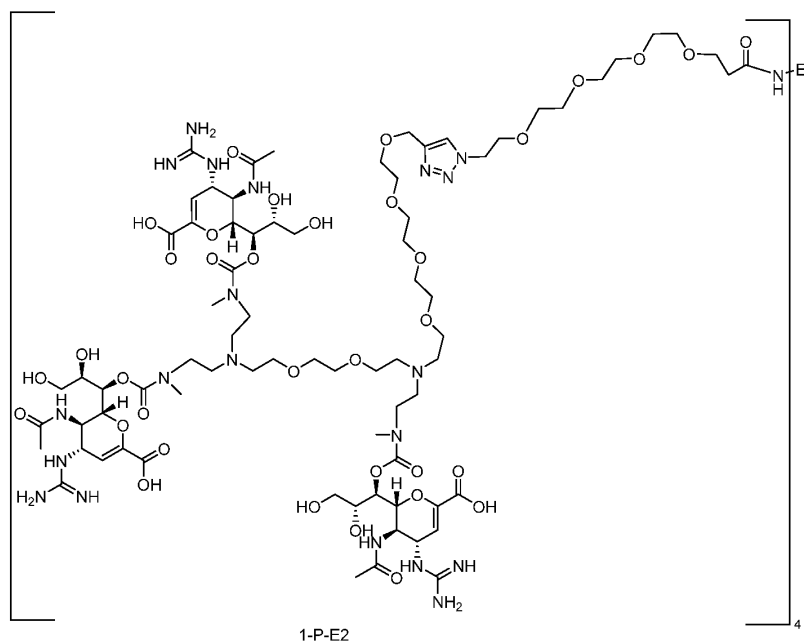


步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1 h，补加 **Int-G1** 分别为 2/1 eq，共补加 2 次，小分子总量为 8 eq，超滤后得偶联产物 **1-G-E2** (2.98 mg，收率 99.5%，纯度 98.6%)。经质谱分析，DAR=4.14。

5

实施例 30 偶联物 1-P-E2 的制备

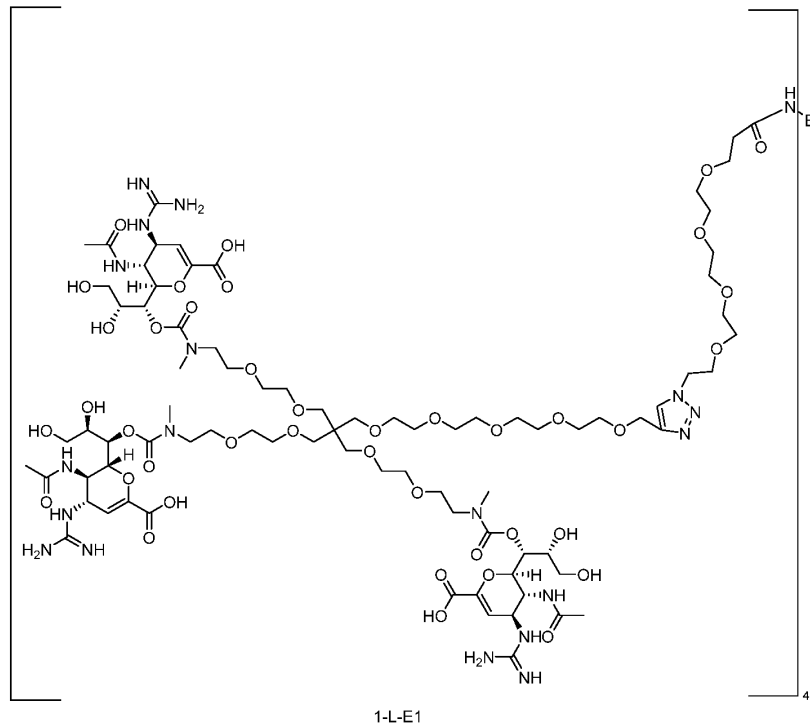
123



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1h，补加 **Int-P** 分别为 2/2/1 eq，共补加 3 次，小分子总量为 10 eq，超滤后得偶联产物 **1-P-E2** (2.95 mg, 收率 98.4%, 纯度 98.4%)。经质谱分析，DAR=4.54。

5

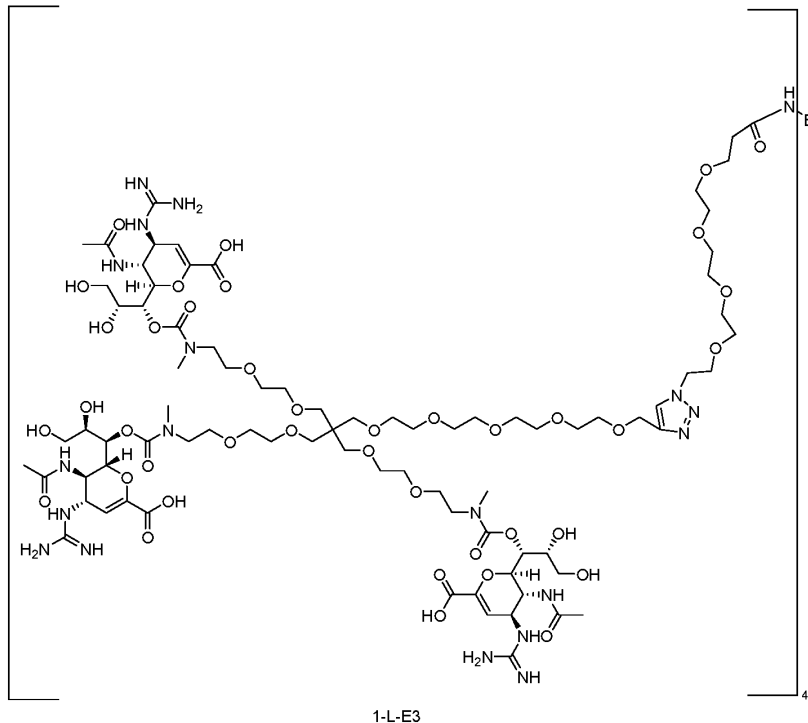
实施例 31 偶联物 1-L-E1 的制备



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备，蛋白 Fc 序列如 SEQ ID NO: 1 所示。每隔 1h，补加 **Int-L1** 分别为 1/1/1 eq，共补加 3 次，小分子总量为 8 eq，超滤后得偶联产物 **1-L-**

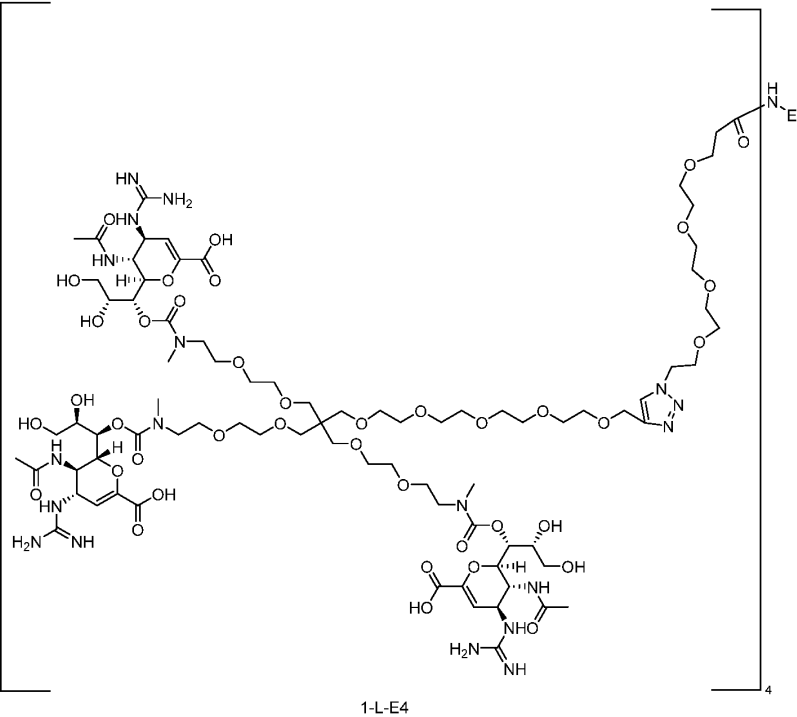
E1 (2.88 mg, 收率 96.1%, 纯度 99.3%)。经质谱分析, DAR=4.46。

实施例 32 偶联物 1-L-E3 的制备



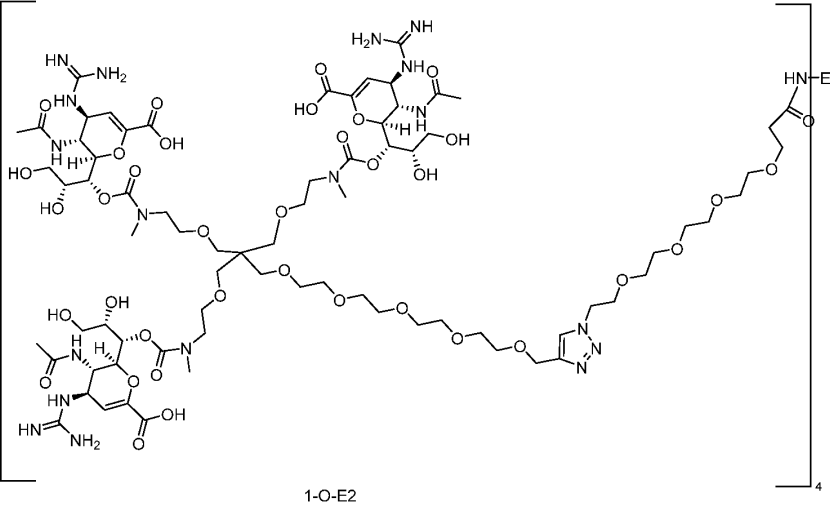
步骤: 采用与实施例 27 中相同的方法制备, 蛋白采用 hIgG1 (其重链序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 轻链序列如 SEQ ID NO: 10 所示)。每隔 1 h, 补加 **Int-L1** 分别为 2/2/1 eq, 共补加 3 次, 小分子总量为 10 eq, 超滤后得偶联产物 **1-L-E3** (2.86 mg, 收率 95.6%, 纯度 98.7%)。经质谱分析, **DAR=4.59**。

10 实施例 33 偶联物 1-L-E4 的制备



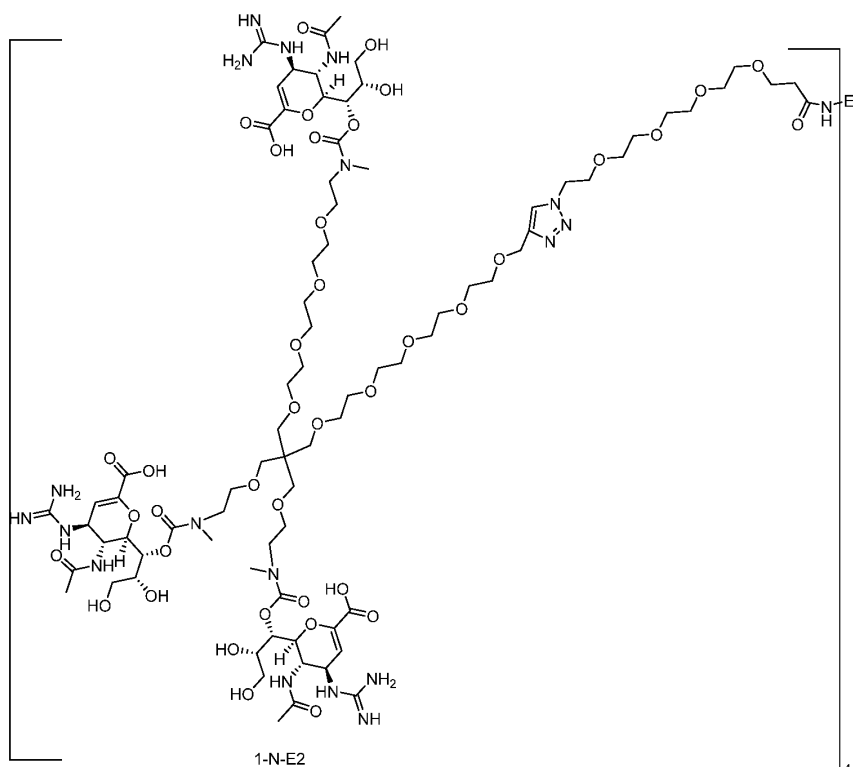
步骤: 采用与实施例 27 中相同的方法制备, 蛋白采用人血清白蛋白(Human serum albumin, 厂家 MCE, 货号 HY-P1956-100mg)。每隔 1 h, 补加 **Int-L1** 分别为 2/2 eq, 共补加 2 次, 小分子总量为 9 eq, 超滤后纯度为 80.1%, 过 HiLoad Superdex 200 pg 制备级 SEC 层析柱 (流动相: 1×PBS 5.0) 得到偶联产物 **1-L-E4** (0.97mg, 收率 32.3%, 纯度 95.6%)。经质谱分析, DAR=4.53。

实施例 34 偶联物 1-O-E2 的制备



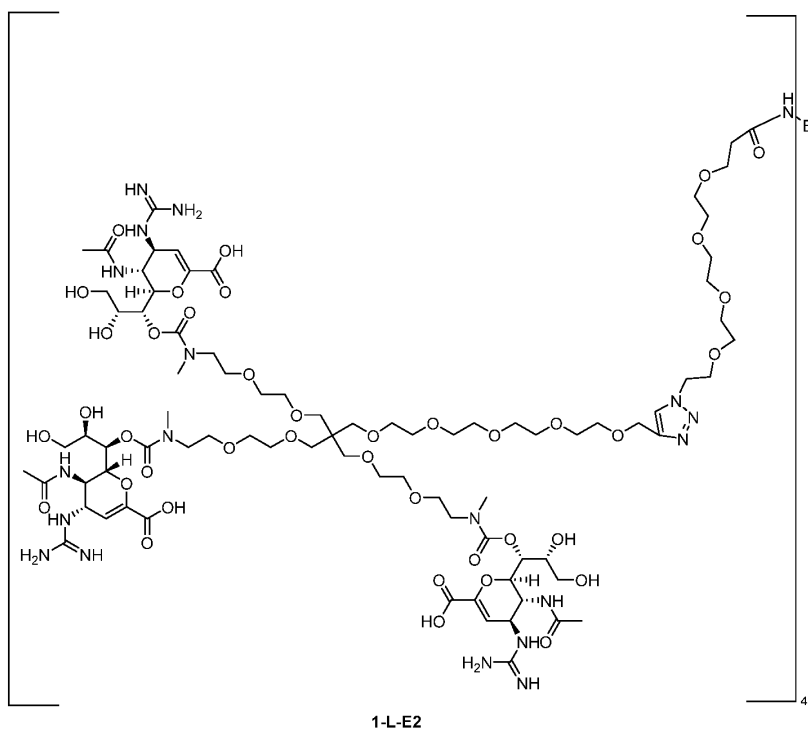
步骤: 采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1 h, 补加 **Int-O** 分别为 2/2 eq, 共补加 2 次, 小分子总量为 9 eq, 超滤后得偶联产物 **1-O-E2** (2.65 mg, 收率 88.6%, 纯度 98.3%)。经质谱分析, DAR=4.46。

实施例 35 偶联物 1-N-E2 的制备



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1 h，补加 **Int-N** 为 2 eq，共补加 1 次，
5 小分子总量为 7 eq，超滤后得偶联产物 **1-N-E2** (2.94 mg，收率 98.2%，纯度 98.6%)。经质谱
分析，DAR=4.28。

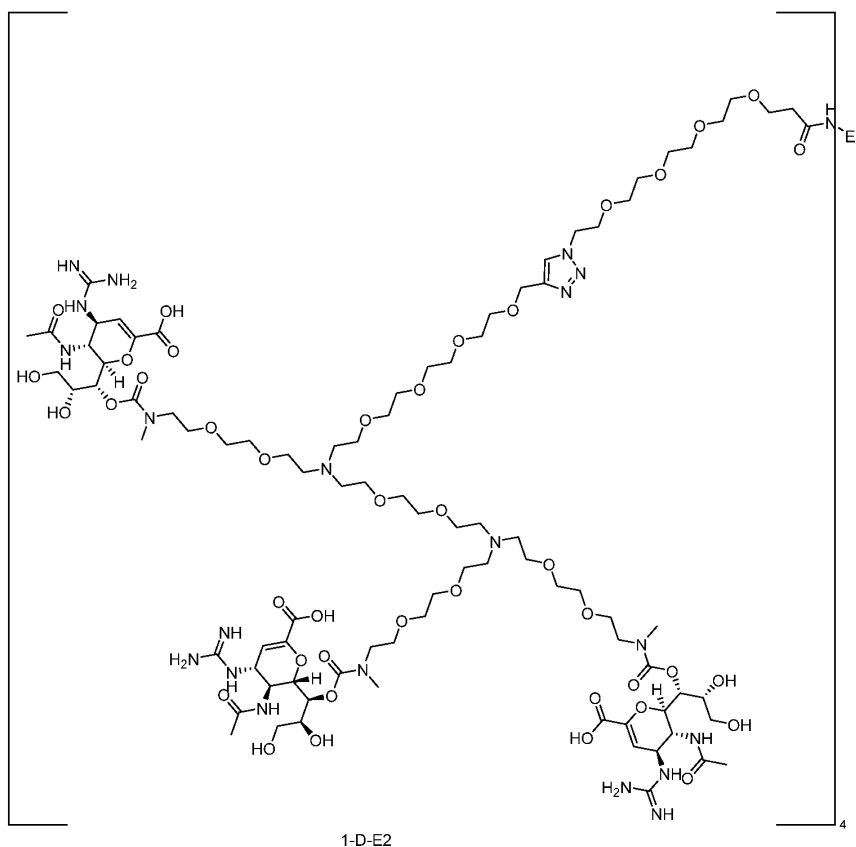
实施例 36 偶联物 1-L-E2 的制备



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1h，补加 **Int-L1** 分别为 1/1 eq，共补加 2 次，小分子总量为 7 eq，超滤后得偶联产物 **1-L-E2** (2.40 mg, 收率 80.6%, 纯度 98.8%)。经质谱分析，DAR=4.39。

5

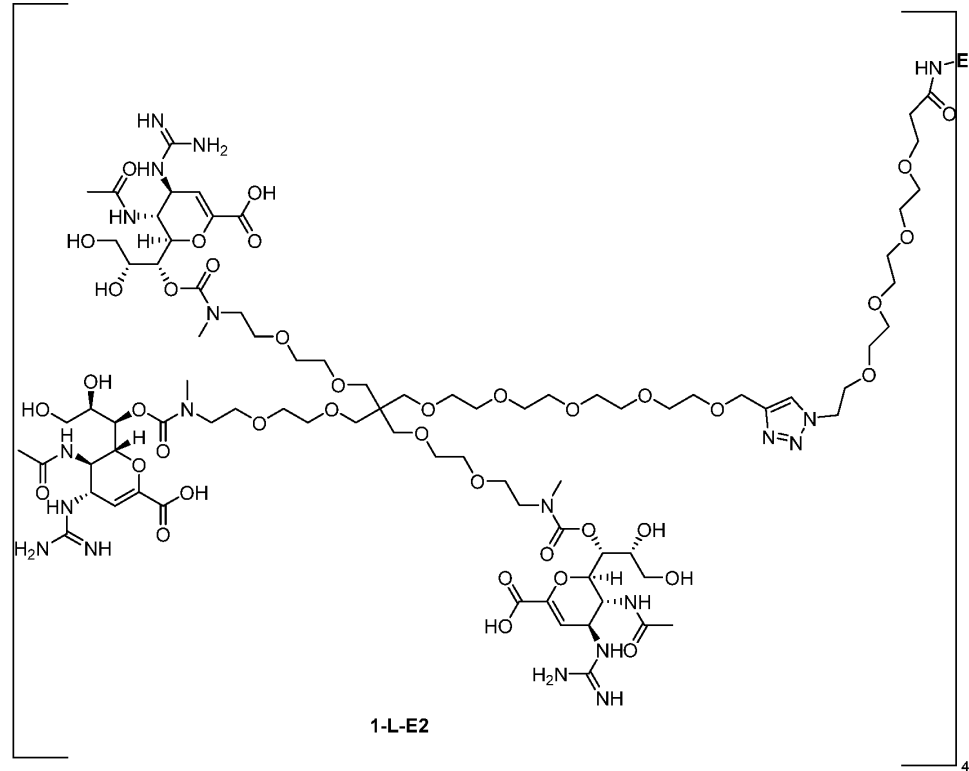
实施例 37 偶联物 1-D-E2 的制备



步骤：采用与实施例 27 中相同的方法制备。每隔 1 h，补加 **Int-D1** 分别为 1/1 eq，共补加 2 次，小分子总量为 7 eq，超滤后得偶联产物 **1-D-E2** (2.77 mg, 收率 92.3%, 纯度 98.8%)。经质谱分析，DAR=4.28。

5

实施例 38 偶联物 **1-L-E2** 的制备



步骤 1: 1: 采用与实施例 13 中相同的方法制备 Fc-azido (7.66 mg, 收率 76.6%, 纯度 99.3%, Fc 序列如 SEQ ID NO: 8 所示)。

步骤 2: 向 15 mL 反应管中分别加入 Fc-azido(7.66 mg), 化合物 **Int-L** (3.61 mg, 15.0 eq) 的 1×PBS pH=6.3 (277.7 μL)溶液和 click 试剂(428 μL), 室温下振荡 20 小时。用 PBS (pH=5.0) 脱盐纯化后, 过 HiLoad Superdex 200 pg 制备级 SEC 层析柱 (流动相: 1×PBS 5.0), 并将收集液浓缩得偶联物 **1-L-E2** (5.26 mg, 收率 68.7%, 纯度 98.0%)。经 Maldi tof 分析, DAR 值为 4.25。

10

生物学评价

以下结合测试例进一步描述解释本公开中, 但这些实施例并非意味着限制本公开中的范围。

测试例 1: 偶联物分子细胞毒性以及抗流感病毒功能的细胞水平检测

1、供试品

15

待测化合物 (偶联物 1-D-E1、偶联物 1-L-E1): 测试起始浓度分别为 1μM, 以 3.16 倍梯度分别稀释 9 个浓度。

参比药物 1: Zanamivir (购自上海毕得, 批号 139110-90-8), 测试起始浓度为 100μM, 以 3.16 倍梯度稀释共 9 个浓度。

20

参比药物 2: 偶联物 C3-E1 (根据实施例 13 的方法制备, 其中使用的中间体对照化合物结构如下所示, 参考 WO2021046549A1 中实施例 145. Int-83 合成的方法制备), 测试起始浓度为 1 μ M, 以 3.16 倍梯度稀释共 9 个浓度。

将培养的 MDCK 细胞重悬在 OptiPRO™ SFM 培养基中，以 5×10^3 每 100 μl OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin 每孔种于 96 孔板中，并在 37°C 培养箱中培养过夜（细胞培养箱型号：ESCO CCL-170B-8）。第二天，待测化合物以及参比药物在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释至指定浓度，并以每孔 50 μl 的体积加入提前铺好细胞的孔中，

5 37°C 下孵育 2 小时后，在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释流感病毒（Influenza H1N1 A/PR/8/34），并以每孔 50 μl 的体积加入含细胞以及化合物的孔中。将混合好的 96 孔板置于 37°C 下孵育培养 5 天。5 天后，向每孔中加入 20 μl CCK-8 溶液，放置在 37°C 培养箱中孵育 2 小时后，在 450nm 下检测吸光度。

10 4、试验结果

表 1 偶联物/化合物在 MDCK 细胞水平上的 EC₅₀ 与 CC₅₀

偶联物/化合物	EC ₅₀ /μM	CC ₅₀ /μM
Zanamivir	3.528	>100
偶联物 C3-E1	0.01709	>1
偶联物 1-L-E1	0.001585	>1
偶联物 1-D-E1	0.002081	>1

测试例 2： 偶联物分子抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 流感病毒功能的细胞水平检测

1、供试品

15 待测化合物（偶联物 1-D-E2，偶联物 1-L-E2）：测试起始浓度分别为 1μM，以 3.16 倍梯度分别稀释 9 个浓度。

参比药物 1： Zanamivir（购自上海毕得，批号 139110-90-8），测试起始浓度为 100μM，以 3.16 倍梯度稀释共 9 个浓度。

参比药物 2： 偶联物 C3-E1，测试起始浓度分别为 1μM，以 3.16 倍梯度分别稀释 9 个浓度。

20 度。

2、实验仪器及材料

试剂名称	厂商	货号
MDCK 细胞	ATCC	CCL-34
FBS	Gibco	10091-141C
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
DMEM	Gibco	11995-065
Trypsin	Sigma	T8802-100MG
OptiPRO™ SFM	Gibco	12309-019
PBS	BasalMedia	B310KJ
0.25%Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25200-056
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Dojindo	CK04
T75 flask	Greiner	658175
50mL conical tubes	Greiner	227261
5mL pipette	Sanifico	SEP05005

10mL pipette	Sanifico	SEP05010
25mL pipette	Sanifico	SEP02525
96 well cell culture plate, Flat	Corning	3599
1000ul pipette tips	Rainin	30389211
250ul pipette tips	Rainin	30859285
20ul pipette tips	Rainin	30389200

3、试验方法

1) 检测试剂配制:

MDCK 细胞培养基: DMEM+10%FBS+1% Penicillin-Streptomycin

5 2g/ml Trypsin: 10g Trypsin 粉末溶于 5ml DMEM 培养基

感染前细胞培养基: OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin

感染用细胞培养基: OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin

2) 检测方法:

将培养的 MDCK 细胞重悬在 OptiPRO™ SFM 培养基中, 以 5×10^3 每 100 μ l OptiPRO™
10 SFM+1% Penicillin-Streptomycin 每孔种于 96 孔板中, 并在 37°C 培养箱中培养过夜 (细胞培
养箱型号: ESCO CCL-170B-8)。第二天, 待测化合物以及参比药物在 OptiPRO™
SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释至指定浓度, 并以每孔 50 μ l 的体积加入提前铺好细胞的孔中,
37°C 下孵育 2 小时后, 在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释流感病毒 (Influenza H1N1
A/PR/8/34), 并以每孔 50 μ l 的体积加入含细胞以及化合物的孔中。将混合好的 96 孔板置于
15 37°C 下孵育培养 5 天。5 天后, 向每孔中加入 20 μ l CCK-8 溶液, 放置在 37°C 培养箱中孵育 2
小时后, 在 450nm 下检测吸光度。

4、试验结果

表 2 偶联物/化合物抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 流感病毒 EC₅₀

偶联物/化合物	EC ₅₀ /nM
Zanamivir	12140
偶联物 C3-E1	8.112
偶联物 1-L-E2	1.063
偶联物 1-D-E2	1.191

20

测试例 3: 偶联物分子抗 Influenza B/Lee 流感病毒功能的细胞水平检测

1、供试品

待测化合物 (偶联物 1-D-E2, 偶联物 1-L-E2): 测试起始浓度分别为 1 μ M, 以 3.16 倍梯
度分别稀释 9 个浓度。

25 参比药物: Zanamivir (购自上海毕得, 批号 139110-90-8), 测试起始浓度为 100 μ M, 以
3.16 倍梯度稀释共 9 个浓度。

2、实验仪器及材料

试剂名称	厂商	货号
MDCK 细胞	ATCC	CCL-34
FBS	Gibco	10091-141C
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
DMEM	Gibco	11995-065
Trypsin	Sigma	T8802-100MG
OptiPRO™ SFM	Gibco	12309-019
PBS	BasalMedia	B310KJ
0.25%Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25200-056
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Dojindo	CK04
T75 flask	Greiner	658175
50mL conical tubes	Greiner	227261
5mL pipette	Sanifico	SEP05005
10mL pipette	Sanifico	SEP05010
25mL pipette	Sanifico	SEP02525
96 well cell culture plate, Flat	Corning	3599
1000ul pipette tips	Rainin	30389211
250ul pipette tips	Rainin	30859285
20ul pipette tips	Rainin	30389200

3、试验方法

1) 检测试剂配制:

MDCK 细胞培养基: DMEM+10%FBS+1% Penicillin-Streptomycin

5 2g/ml Trypsin: 10g Trypsin 粉末溶于 5ml DMEM 培养基

感染前细胞培养基: OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin

感染用细胞培养基: OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin

2) 检测方法:

将培养的 MDCK 细胞重悬在 OptiPRO™ SFM 培养基中, 以 5×10^3 每 100 μl OptiPRO™
10 SFM+1% Penicillin-Streptomycin 每孔种于 96 孔板中, 并在 37°C培养箱中培养过夜 (细胞培
养箱型号: ESCO CCL-170B-8)。第二天, 待测化合物以及参比药物在 OptiPRO™
SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释至指定浓度, 并以每孔 50 μl 的体积加入提前铺好细胞的孔中,
37°C下孵育 2 小时后, 在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释流感病毒(Influenza B/Lee),
并以每孔 50 μl 的体积加入含细胞以及化合物的孔中。将混合好的 96 孔板置于 37°C下孵育培
15 养 5 天。5 天后, 向每孔中加入 20 μl CCK-8 溶液, 放置在 37°C培养箱中孵育 2 小时后, 在
450nm 下检测吸光度。

4、试验结果

表 3 偶联物/化合物抗 Influenza B/Lee 流感病毒 EC₅₀

偶联物/化合物	EC ₅₀ /nM
Zanamivir	2383
偶联物 1-L-E2	0.225
偶联物 1-D-E2	0.170

测试例 4： 偶联物分子抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 病毒功能的细胞水平检测

1、供试品

5 待测化合物(偶联物 1-L-E2,偶联物 1-L-E3,偶联物 1-L-E4):测试起始浓度分别为 10μM,以 3 或 2 倍梯度分别稀释 12 个浓度。

参比药物 1: Zanamivir (购自上海毕得,批号 139110-90-8),测试起始浓度为 300μM,以 3 或 2 倍梯度分别稀释 12 个浓度。

10 2、实验仪器及材料

试剂名称	厂商	货号
MDCK 细胞	ATCC	CCL-34
FBS	Gibco	10091-141C
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
DMEM	Gibco	11995-065
Trypsin	Sigma	T8802-100MG
OptiPRO™ SFM	Gibco	12309-019
PBS	BasalMedia	B310KJ
0.25%Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25200-056
CellCounting-Lite 2.0 Luminescent Cell Viability Assay (CCL)	Vazyme	DD1101-01
T75 flask	Greiner	658175
50mL conical tubes	Greiner	227261
5mL pipette	Sanifico	SEP05005
10mL pipette	Sanifico	SEP05010
25mL pipette	Sanifico	SEP02525
96 well cell culture plate, Flat	Corning	3599
1000ul pipette tips	Rainin	30389211
250ul pipette tips	Rainin	30859285
20ul pipette tips	Rainin	30389200

3、试验方法

1) 检测试剂配制:

MDCK 细胞培养基: DMEM+10%FBS+1% Penicillin-Streptomycin

2g/ml Trypsin: 10g Trypsin 粉末溶于 5ml DMEM 培养基
感染前细胞培养基: OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin
感染用细胞培养基: OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin

2) 检测方法:

5 将培养的 MDCK 细胞重悬在 OptiPRO™ SFM 培养基中, 以 5×10^3 每 100 μ l OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin 每孔种于 96 孔板中, 并在 37°C培养箱中培养过夜 (细胞培养箱型号: 海尔, HCB-168)。第二天, 待测化合物以及参比药物在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释至指定浓度, 并以每孔 50 μ l 的体积加入提前铺好细胞的孔中, 37°C下孵育 2 小时后, 在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释流感病毒 (Influenza H1N1 A/PR/8/34), 并以每孔 50 μ l 的体积加入含细胞以及化合物的孔中。将混合好的 96 孔板置于 37°C下孵育培养, 每天观察细胞状态, 当病变达 80%以上时, 利用 CellCounting-Lite 2.0 Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒在酶标仪中检测细胞生存力, 并计算抑制率。

4、试验结果

15 表 4 偶联物/化合物抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 流感病毒 EC₅₀

偶联物/化合物	EC ₅₀ /nM
Zanamivir	1836
偶联物 1-L-E2	1.76
偶联物 1-L-E3	1.20
偶联物 1-L-E4	1.76

测试例 5: 联物分子抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 病毒功能的细胞水平检测

1、供试品

待测化合物 (偶联物 1-M-E2、偶联物 1-N-E2、偶联物 1-O-E2): 测试起始浓度分别为 10 μ M, 以 3 或 2 倍梯度分别稀释 12 个浓度。

参比药物 1: Zanamivir (购自上海毕得, 批号 139110-90-8), 测试起始浓度为 300 μ M, 以 3 或 2 倍梯度分别稀释 12 个浓度。

2、实验仪器及材料

试剂名称	厂商	货号
MDCK 细胞	ATCC	CCL-34
FBS	Gibco	10091-141C
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
DMEM	Gibco	11995-065
Trypsin	Sigma	T8802-100MG
OptiPRO™ SFM	Gibco	12309-019
PBS	BasalMedia	B310KJ
0.25%Trypsin-EDTA (1x)	Gibco	25200-056

CellCounting-Lite 2.0 Luminescent Cell Viability Assay (CCL)	Vazyme	DD1101-01
T75 flask	Greiner	658175
50mL conical tubes	Greiner	227261
5mL pipette	Sanifico	SEP05005
10mL pipette	Sanifico	SEP05010
25mL pipette	Sanifico	SEP02525
96 well cell culture plate, Flat	Corning	3599
1000ul pipette tips	Rainin	30389211
250ul pipette tips	Rainin	30859285
20ul pipette tips	Rainin	30389200

3、试验方法

1) 检测试剂配制:

MDCK 细胞培养基: DMEM+10%FBS+1% Penicillin-Streptomycin

5 2g/ml Trypsin: 10g Trypsin 粉末溶于 5ml DMEM 培养基

感染前细胞培养基: OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin

感染用细胞培养基: OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin

2) 检测方法:

10 将培养的 MDCK 细胞重悬在 OptiPRO™ SFM 培养基中, 以 5×10^3 每 100 μ l OptiPRO™ SFM+1% Penicillin-Streptomycin 每孔种于 96 孔板中, 并在 37°C 培养箱中培养过夜 (细胞培养箱型号: 海尔, HCB-168)。第二天, 待测化合物以及参比药物在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释至指定浓度, 并以每孔 50 μ l 的体积加入提前铺好细胞的孔中, 37°C 下孵育 2 小时后, 在 OptiPRO™ SFM+2ug/ml Trypsin 中稀释流感病毒 (Influenza H1N1 A/PR/8/34), 并以每孔 50 μ l 的体积加入含细胞以及化合物的孔中。将混合好的 96 孔板置于 37°C 下孵育培养, 每天观察细胞状态, 当病变达 80% 以上时, 利用 CellCounting-Lite 2.0 Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒在酶标仪中检测细胞生存力, 并计算抑制率。

15

4、试验结果

表 5 偶联物/化合物抗 Influenza H1N1 A/PR/8/34 流感病毒 EC₅₀

偶联物/化合物	EC ₅₀ /nM
Zanamivir	1688
偶联物 1-L-E2	1.88
偶联物 1-M-E2	3.86
偶联物 1-N-E2	4.55
偶联物 1-O-E2	4.29

测试例 6：单次静脉注射给予食蟹猴不同供试品的药代动力学研究

1、供试品

参比（偶联物 C3-E1）以及供试品（偶联物 1-L-E2），各供试品具体信息见表 6。

表 6. 样品信息

名称	浓度	保存条件
偶联物 C3-E1	5 mg/mL	干燥，避光，-80℃
偶联物 1-L-E2	5 mg/mL	

5

给药制剂配置方法：

1) 溶媒：注射用 PBS（Gibco®，批号：2436336）。

2) 供试品配制：在生物安全柜和/或超净工作台内进行无菌操作，所使用的容器需经过灭菌处理。从-80℃冰箱里取出供试品，直至完全融化后，按照供试品的浓度直接分装或用溶媒
10 稀释到所需给药浓度即可，各组实际给药剂量、给药制剂浓度及给药体积见表 7，供试品各组给药制剂完成后现配现用，经四肢静脉注射给药。

表 7. 各组给药剂量、浓度、体积

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药制剂浓度 (mg/mL)	给药体积 (mL/kg)
偶联物 C3-E1	2	5	0.4
偶联物 1-L-E2	2	5	0.4

2、试验动物

15 食蟹猴，普通级，每组两只，雌雄各半，年龄 5.0~6.0 岁；动物来源为广西防城港常春生物技术开发有限公司、海南金港生物技术股份有限公司，合格证编号：0003029、460012000000545、44818300000229。所有实验动物完成检疫，每只动物单笼饲养，饲养温度 18 °C~26 °C，湿度 40%~70%，每小时换气次数≥8 次，使用 100%的全新风。动物在试验前经过 2~5 天适应期，给药前 2~3 天内由实验人员进行一次笼旁观察，试验当日按照体重进行
20 随机分组。

3、试验方法

给药前称重，根据体重，计算给药量，两组以相同剂量通过静脉注射给药。在给药前及给药开始后 0.25 h、2 h、6 h、24 h（D1）、72 h（D3）、120 h（D5）、168 h（D7）、240 h（D10）、
25 336 h（D14）、672 h（D28）经四肢静脉取血 1 mL/只/时间点，全血收集至含促凝剂和分离胶促凝剂的试管中，离心前室温静置约 30 min，血液收集后 1 小时内待血样凝集后于 4℃离心（2000 g，10 分钟）。收集到的血清置于-80℃保存。利用 ELISA 方法检测药物浓度：在 96 孔酶标板（Corning，Cat No. 9018）中加入浓度为 1 µg/ml、体积为 100 µL/孔的 Goat anti-human IgG Monkey ads UNLB 抗体（Southern Biotech，Cat No. 2049-01），于 4℃孵育过夜，对酶标

板进行包被。弃去液体后，用 PBST（pH 7.4，0.05% Tween-20）缓冲液洗板 5 次后，每孔加入 200 μL 4%牛血清白蛋白溶液，室温孵育 2 小时进行封闭。弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液洗板 4 次后，每孔加入 100 μL 稀释后的样品进行 1.5 小时的室温孵育。孵育后弃去反应液，用 PBST 洗板 4 次，每孔加入 1: 25k 稀释后的 100 μL Goat Anti-Human IgG Monkey ads HRP 5 检测抗体（Southern Biotech，Cat No. 2049-05）进行 1 小时的室温孵育。用 PBST 洗板 4 次后，加入 100 μL TMB（Sigma，Cat No. T0440）显色底物，室温避光孵育 10 分钟进行显色，使用 1M 硫酸终止反应，用 SpectraMax M5 酶标仪在 450 nm 处读取吸收值。

4、试验结果

10 各组动物的药代动力学曲线、参数如图 2 和表 8 所示（数据表示为 Mean±SEM），试验结果显示，在以相同剂量进行静脉注射给药后，供试品偶联物 1-L-E2 组 AUC_{last} 为 14466±123 h*μg/mL，较参比偶联物 C3-E1 组（8691±1713 h*μg/mL）提高 1.7 倍。供试品偶联物 1-L-E2 组 T_{1/2}（h）为 687±79 h，较参比偶联物 C3-E1 组（342±85 h）提高 2 倍。上述结果显示，相较于偶联物 C3-E1，偶联物 1-L-E2 在食蟹猴体内的药物暴露量及半衰期显著提升。

15

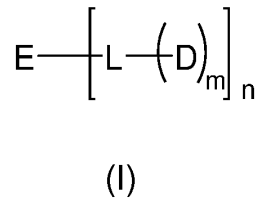
表 8 单次静脉注射给予食蟹猴不同供试品 PK 参数

供试品	偶联物 C3-E1	偶联物 1-L-E2
T _{1/2} （h）	342±85	687±79
AUC _{last} （h*μg/mL）	8691±1713	14466±123
AUC _{INF_obs} （h*μg/mL）	11536±3489	28631±3512
Cl _{obs} （mL/h/kg）	0.182±0.055	0.0704±0.0086
MRT _{last} （h）	222±19	276±5
C _{max} （μg/ml）	71.74±9.18	74.90±8.95
T _{max} （h）	0.25±0.0	0.25±0.0

。

权利要求书:

1. 式 (I) 所示的偶联物,



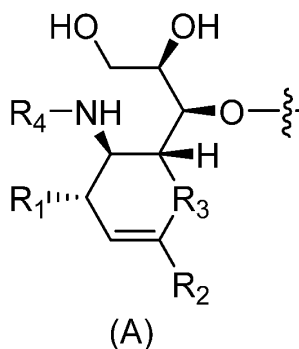
5 其中, E 为蛋白或多肽;

L 为将 E 共价连接于 D 的连接子;

m 选自 3、4、5、6、7、8、9 和 10;

n 为 1 至 20 (包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意两数值之间任意数值);

10 D 各自独立地选自式 (A) 所示结构,



R₁ 选自 -OH、-NH₂ 和 -NHC(=NH)NHR₅;

R₂ 选自 -CO₂H、-P(=O)(OH)₂ 和 -SO₃H;

R₃ 为 -O- 或 -S-;

15 R₄ 选自 -COCH₃、-COCF₃ 和 -SO₂CH₃;

R₅ 选自氢、羟基、巯基、硝基、氰基、-NR_iR_j、-C(O)R_k、-C(O)OR_k、-S(O)R_k、-S(O)OR_k、-S(O)(O)R_k、-S(O)(O)OR_k、-C(S)R_k、C₁-C₁₀ 烷基、C₁-C₁₀ 烷氧基、C₂-C₁₀ 烯基和 C₂-C₁₀ 炔基, 其中所述的烷基、烷氧基、烯基和炔基任选被选自 C₁-C₆ 烷基、卤素、羟基、巯基、-NR_iR_j、氧代、硫代、-C(O)R_k、-C(O)OR_k、-S(O)R_k、-S(O)OR_k、-S(O)(O)R_k、-S(O)(O)OR_k、-C(S)R_k、硝基、氰基、C₁-C₆ 烷氧基、C₁-C₆ 烷硫基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、3 至 10 元环烷基、3 至 10 元杂环基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代;

R_i、R_j 各自独立地选自氢原子、羟基、C₁-C₆ 烷基和 C₁-C₆ 烷氧基;

R_k 独立地选自氢原子、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、羟基、 $-NR_iR_j$ ，其中所述的烷基、烷氧基、卤代烷基任选被选自 C_1 - C_6 烷基、卤素、羟基、巯基、 $-NR_iR_j$ 、氧代、硫代、羧基、硝基、氰基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷硫基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、3 至 10 元环烷基、3 至 10 元杂环基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

5

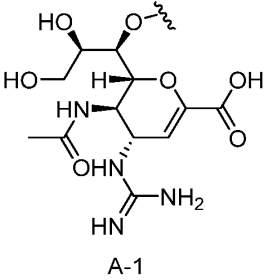
2. 根据权利要求 1 所述的偶联物，其中，

R_5 选自氢、羟基、氨基和 $-C(O)R_k$ ，

R_k 选自氢原子、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基和羟基，其中所述的烷基和烷氧基任选被选自卤素、羟基、氧代、硫代、羧基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 烷硫基、6 至 10 元芳基和 5 至 10 元杂芳基中的一个或多个取代基所取代。

10

3. 根据权利要求 1 所述的偶联物，D 选自式 (A-1) 所示结构，



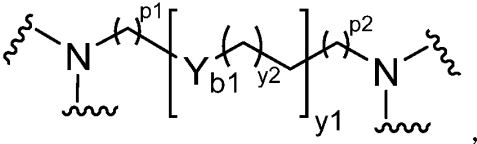
15

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的偶联物，其中 m 为 3 或 4。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的偶联物，其中所述连接子包含核心部分 L_2 及分支部分 L_1 和 L_3 ，所述分支部分 L_1 用于将 E 与核心部分相连，所述分支部分 L_3 用于将 D 与核心部分相连。

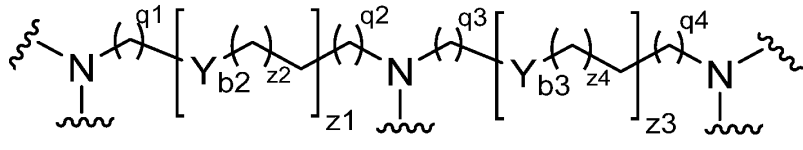
20

6. 根据权利要求 5 所述的偶联物，其中所述核心部分结构 L_2 选自

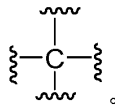


其中， y_1 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数， y_2 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2， Y_{b1} 选自 O 或 CH_2 ， p_1 、 p_2 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，或

25

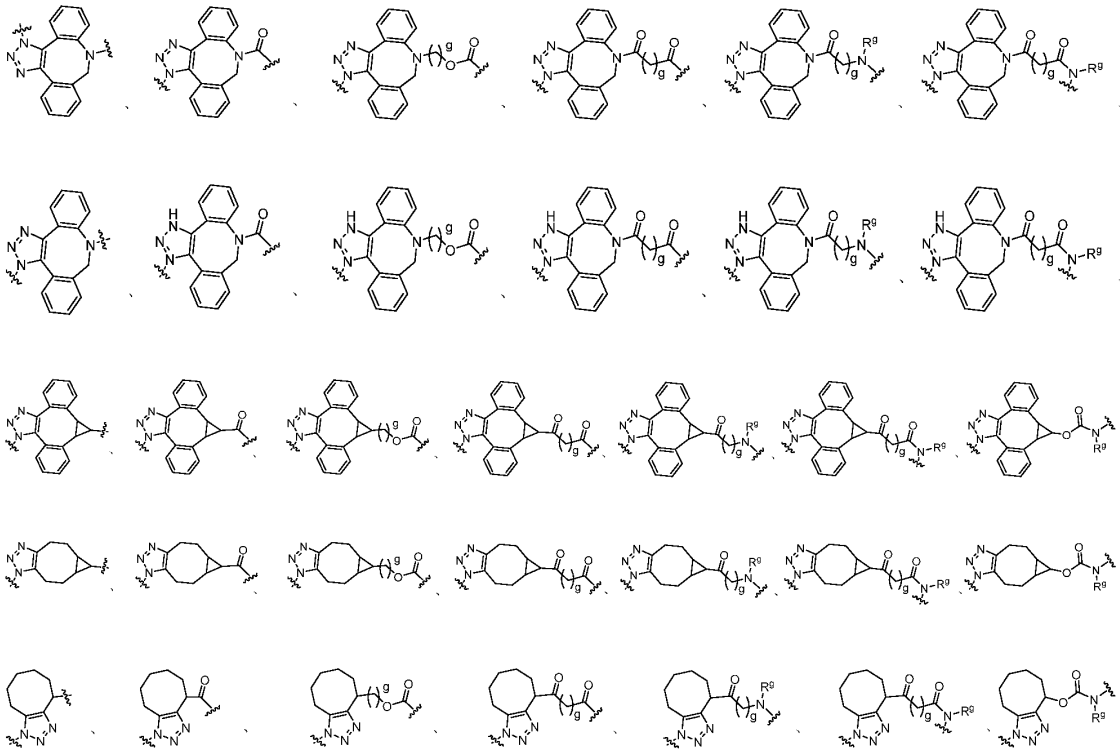


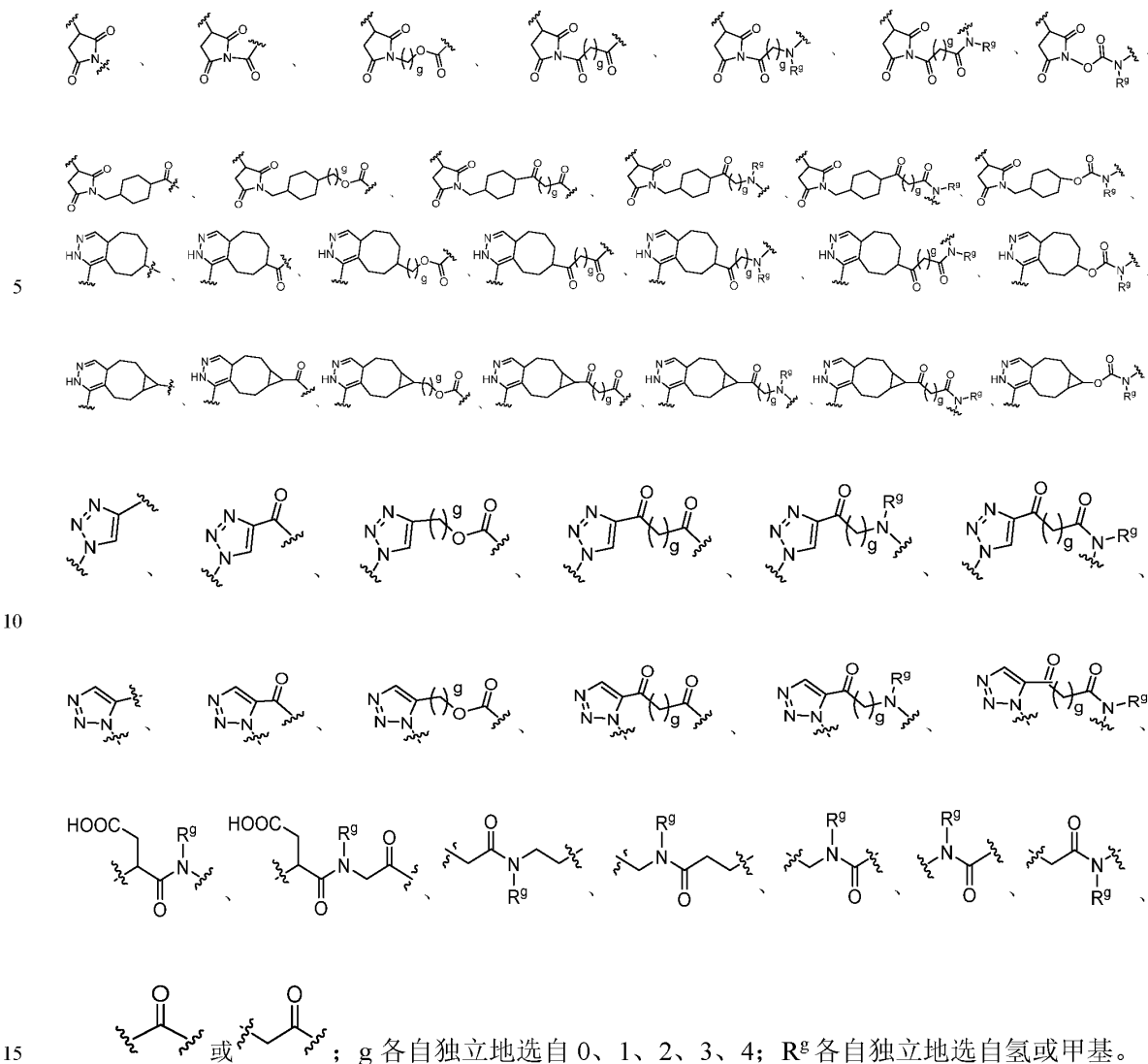
其中，z1 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，z2 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，Y_{b2} 选自 O 或 CH₂，z3 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，z4 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，Y_{b3} 选自 O 或 CH₂，q1、q2、q3、q4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数；或



7. 根据权利要求 5 或 6 所述的偶联物，其中 L₁ 选自 -G_{a1}-(CH₂)_{wa1}-[Y_{a1}-CH₂(CH₂)_{xa2}]_{xa1}-(CH₂)_{wa2}-G_{a2}-(CH₂)_{wa3}-[Y_{a2}-CH₂(CH₂)_{xa4}]_{xa3}-(CH₂)_{wa4}-G_{a3}-，其中 xa1、xa3 各自独立地选自 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，xa2、xa4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，wa1、wa2、wa3、wa4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，Y_{a1}、Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH₂，G_{a1} 为基团 G_x，G_{a2}、G_{a3} 各自独立地选自基团 G_x 或不存在，

G_x 选自





8. 根据权利要求 5-7 任意一项所述的偶联物, 其中 L_3 包含与 D 连接的端基 G_{c1} , 所述端基 G_{c1} 选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=O)CH_2-$ 或化学键, 其中 R_6 选自氢和 C_1-C_6 烷基, 优选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 和 $-NR_6(C=O)CH_2-$;

优选 L₃ 为 $-(\text{CH}_2)_{\text{wc}1}-[\text{Y}_{\text{c}1}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{\text{xc}2}]_{\text{xc}1}-(\text{CH}_2)_{\text{wc}2}-\text{G}_{\text{c}1}-$,

其中, `xc1` 各自独立地为 0 至 100 的整数, 优选 0 至 30 的整数, 更优选为 2 至 30 的整数,

xc2 各自独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 1 或 2,

Y_{cl} 各自独立地选自 O 或 CH₂, 优选 O,

wc1、wc2 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 0、1、2 或 3，

G_{c1} 各自独立地选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=O)CH_2-$ 或化学键，其中 R_6 选自氢和 C_1-C_6 烷基，优选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 和 $-NR_6(C=O)CH_2-$ ；

m 为 3 或 4。

5

9. 根据权利要求 1-8 任意一项所述的偶联物，其中 $-L(-D)_m$ 为 $-L_1-L_2(-L_3-D)_m$ ，其中，

L_1 为与 E 连接的部分， L_1 选自 $-Ga_1-(CH_2)_{wa1}-[Y_{a1}-CH_2(CH_2)_{xa2}]_{xa1}-(CH_2)_{wa2}-Ga_2-(CH_2)_{wa3}-[Y_{a2}-CH_2(CH_2)_{xa4}]_{xa3}-(CH_2)_{wa4}-Ga_3-$ ，其中，

xa_1 、 xa_3 各自独立地选自 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，

10

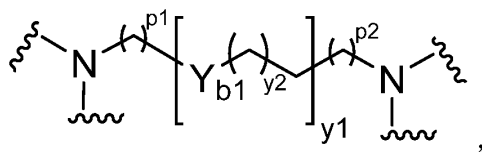
xa_2 、 xa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，

wa_1 、 wa_2 、 wa_3 、 wa_4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，

Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ，

G_{a1} 为基团 G_x ， G_{a2} 、 G_{a3} 各自独立地选自基团 G_x 或不存在；

L_2 选自



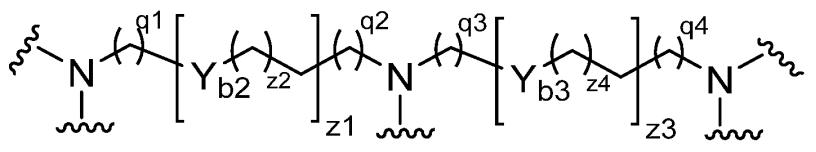
15

其中， y_1 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，

y_2 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，

Y_{b1} 选自 O 或 CH_2 ，

p_1 、 p_2 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2；或



20

其中， z_1 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，

z_2 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，

Y_{b2} 选自 O 或 CH_2 ，

z_3 为 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，

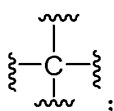
25

z_4 为 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，

Y_{b3} 选自 O 或 CH_2 ，

q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数；或

144



L_3 为 $-(CH_2)_{wc1}-[Y_{c1}-CH_2(CH_2)_{xc2}]_{xc1}-(CH_2)_{wc2}-G_{c1}-$, 其中,

$xc1$ 各自独立地为 0 至 100 的整数, 优选 0 至 30 的整数, 更优选为 2 至 30 的整数,

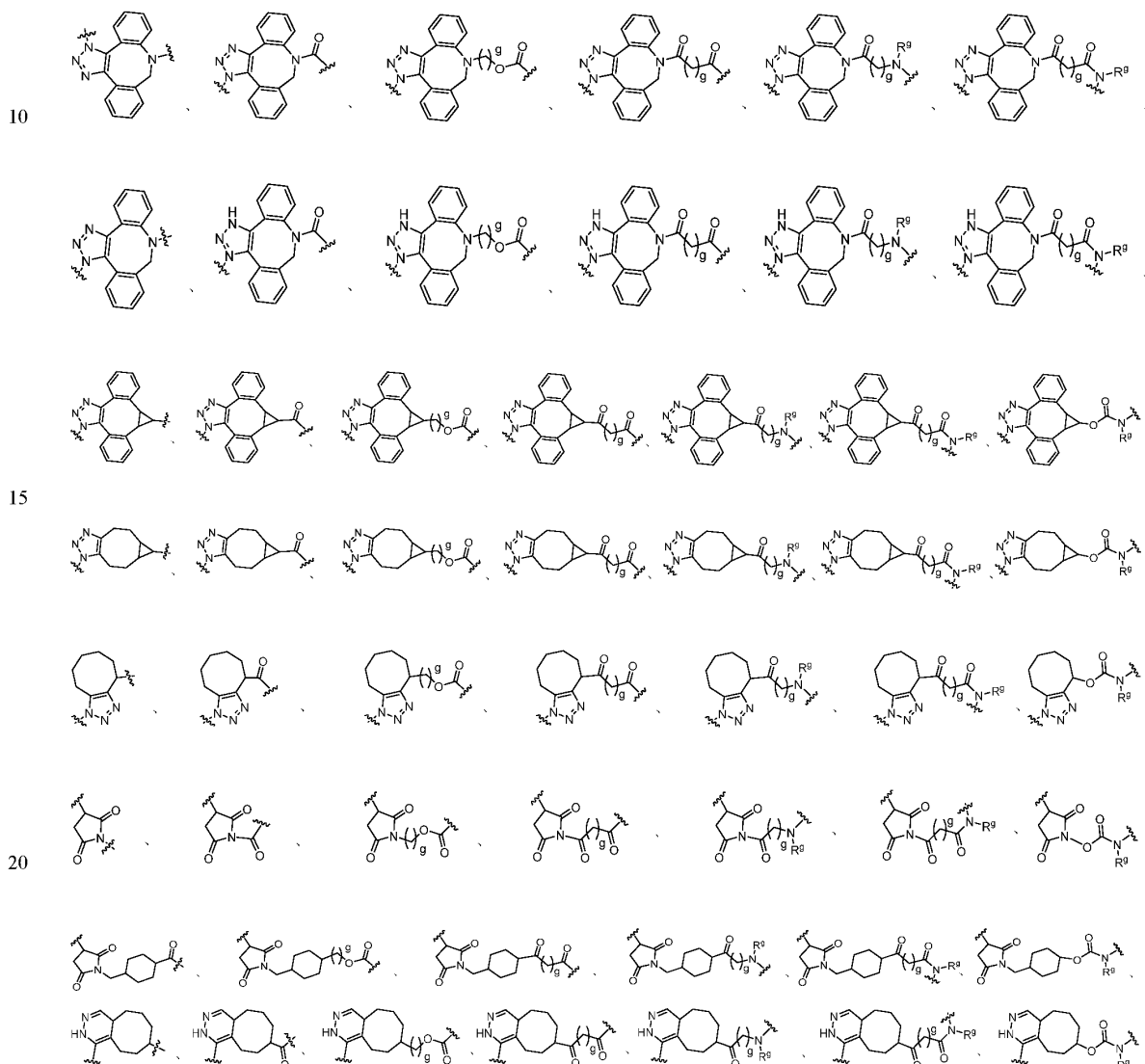
$xc2$ 各自独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 1 或 2,

5 Y_{c1} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ,

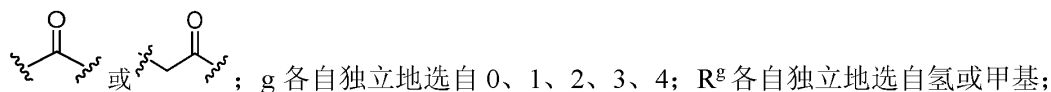
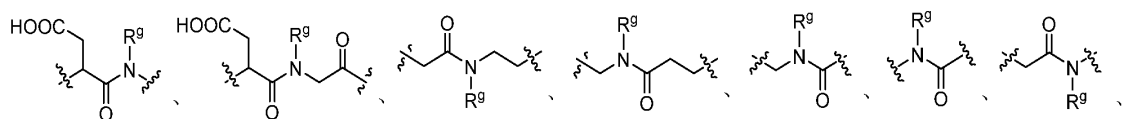
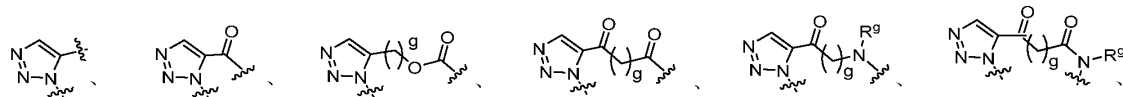
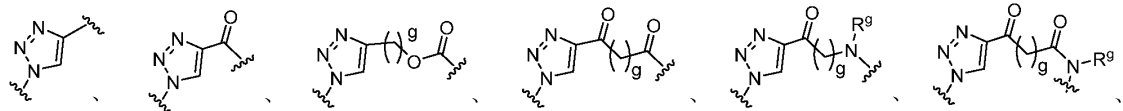
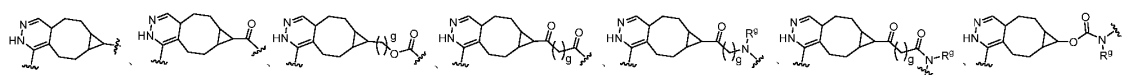
$wc1$ 、 $wc2$ 各自独立地选自 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数,

G_{c1} 各自独立地选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=O)CH_2-$ 或化学键, 其中 R_6 选自氢和 C_1 - C_6 烷基;

G_x 选自



145



或 ; g 各自独立地选自 0、1、2、3、4; R^g 各自独立地选自氢或甲基;

m 为 3 或 4。

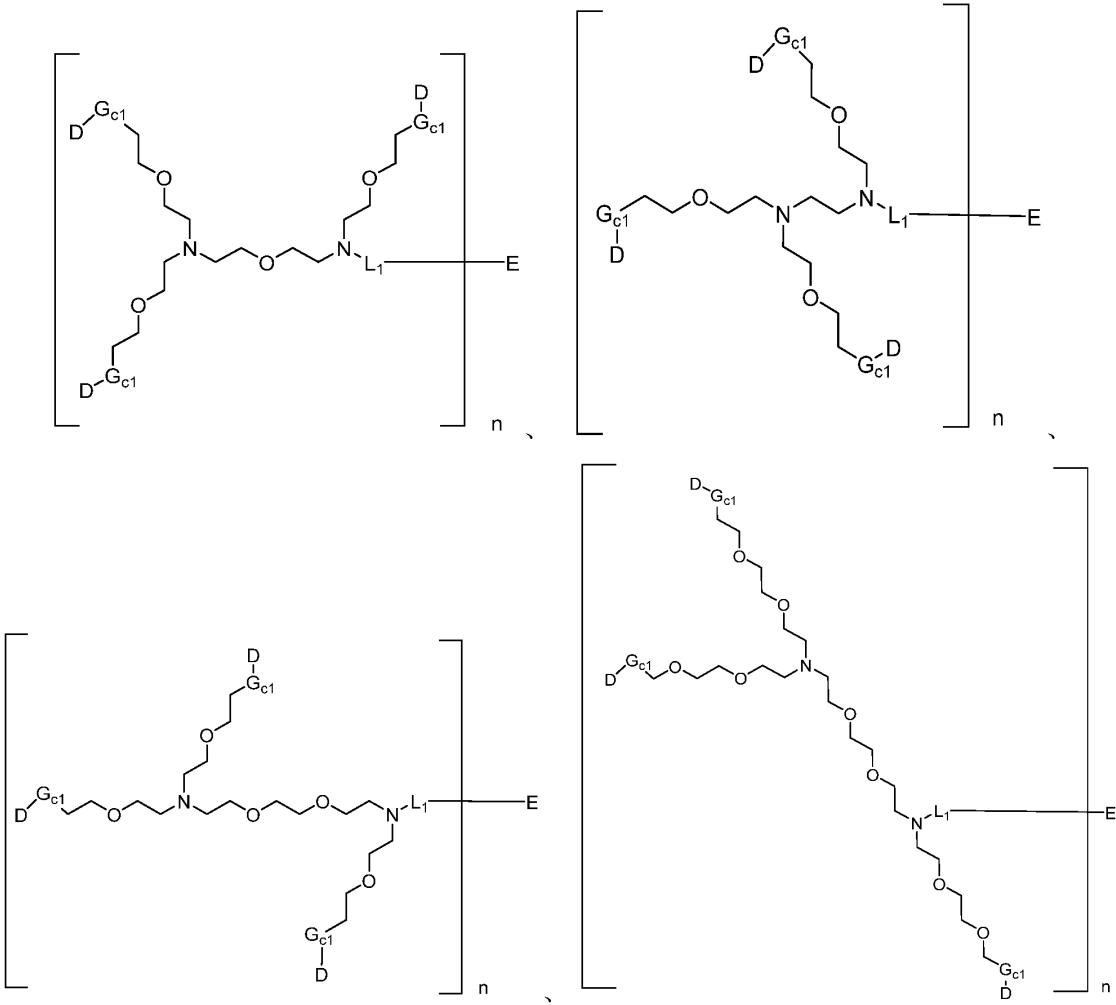
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的偶联物，其中 L₃ 主链的原子个数大于 7，优选大于 8，更优选大于 9。

11. 根据权利要求 1-10 任意一项所述的偶联物，其中所述蛋白或多肽选自 Fc 结构域、白蛋白或白蛋白结合结构域。

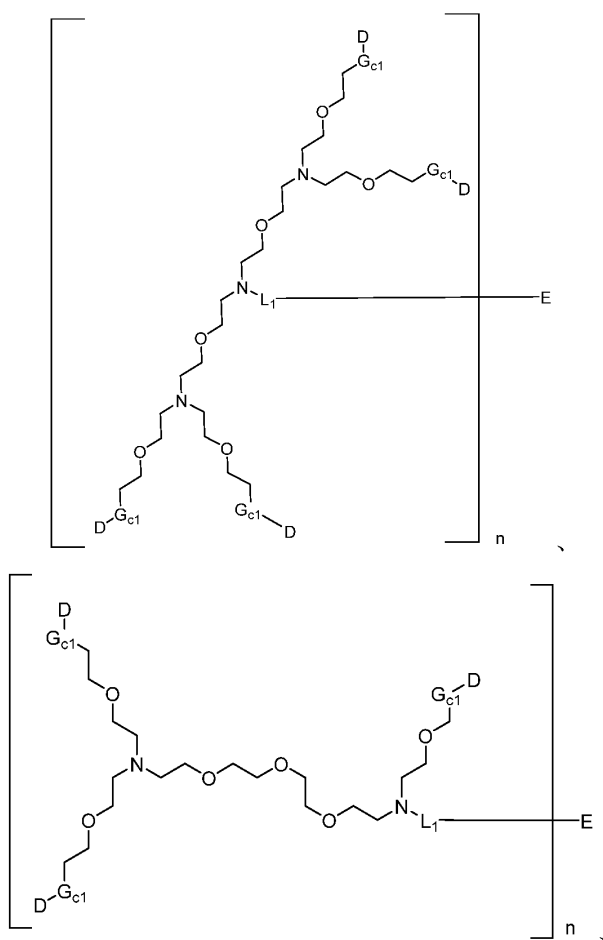
12. 根据权利要求 1-11 任意一项所述的偶联物，所述 Fc 结构域具有增强的效应子功能，优选地，所述效应子功能选自：C1q 结合和依赖补体的细胞毒性、Fc 受体结合、依赖抗体的细胞毒性、吞噬作用、细胞表面受体的下调和 B 细胞激活。

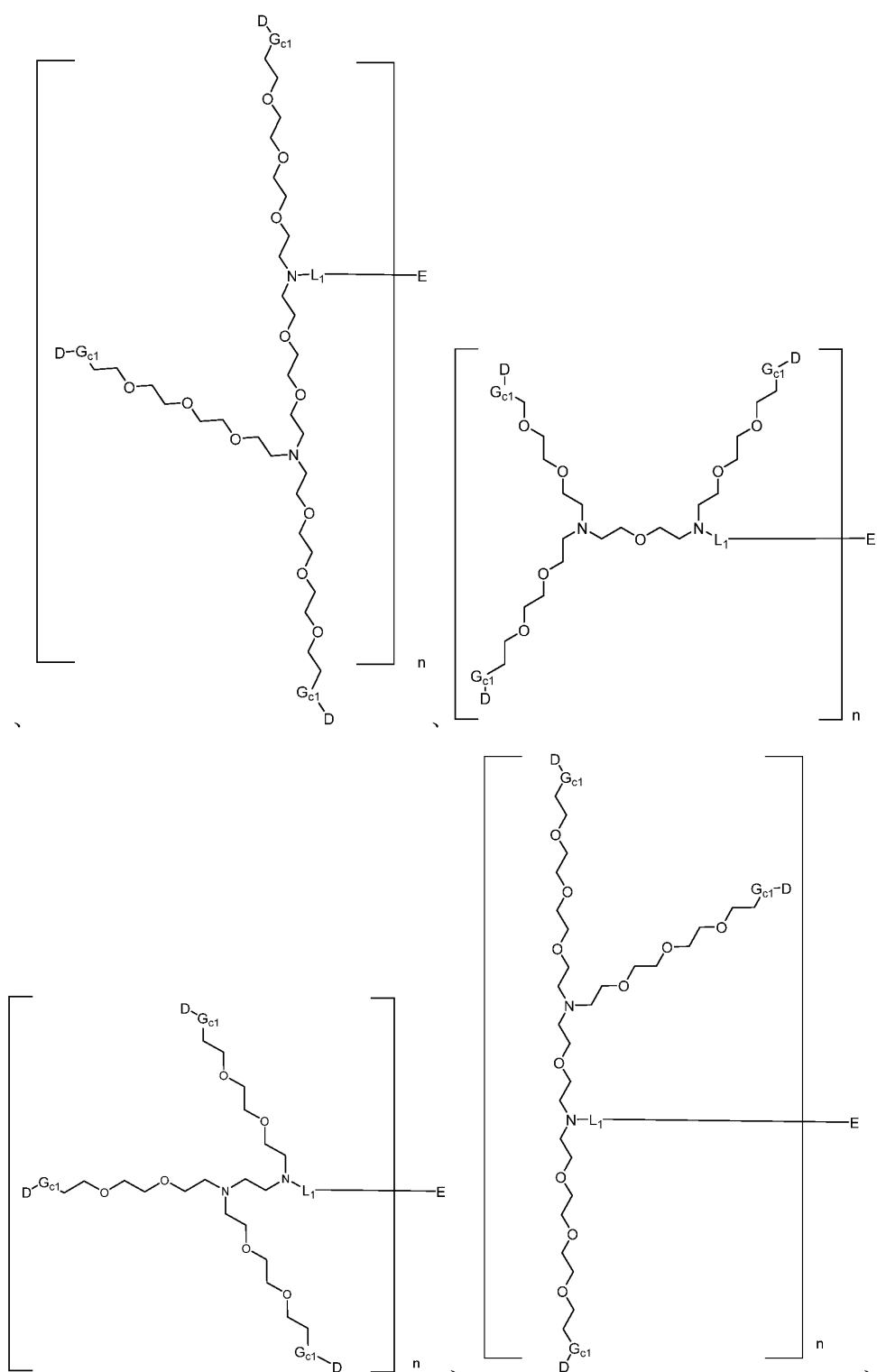
13. 根据权利要求 1-12 任意一项所述的偶联物，其中所述 Fc 结构域包含源自 IgG 的 Fc 区，优选地，所述 Fc 区选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 区；更优选地，所述 Fc 区为人 IgG1。

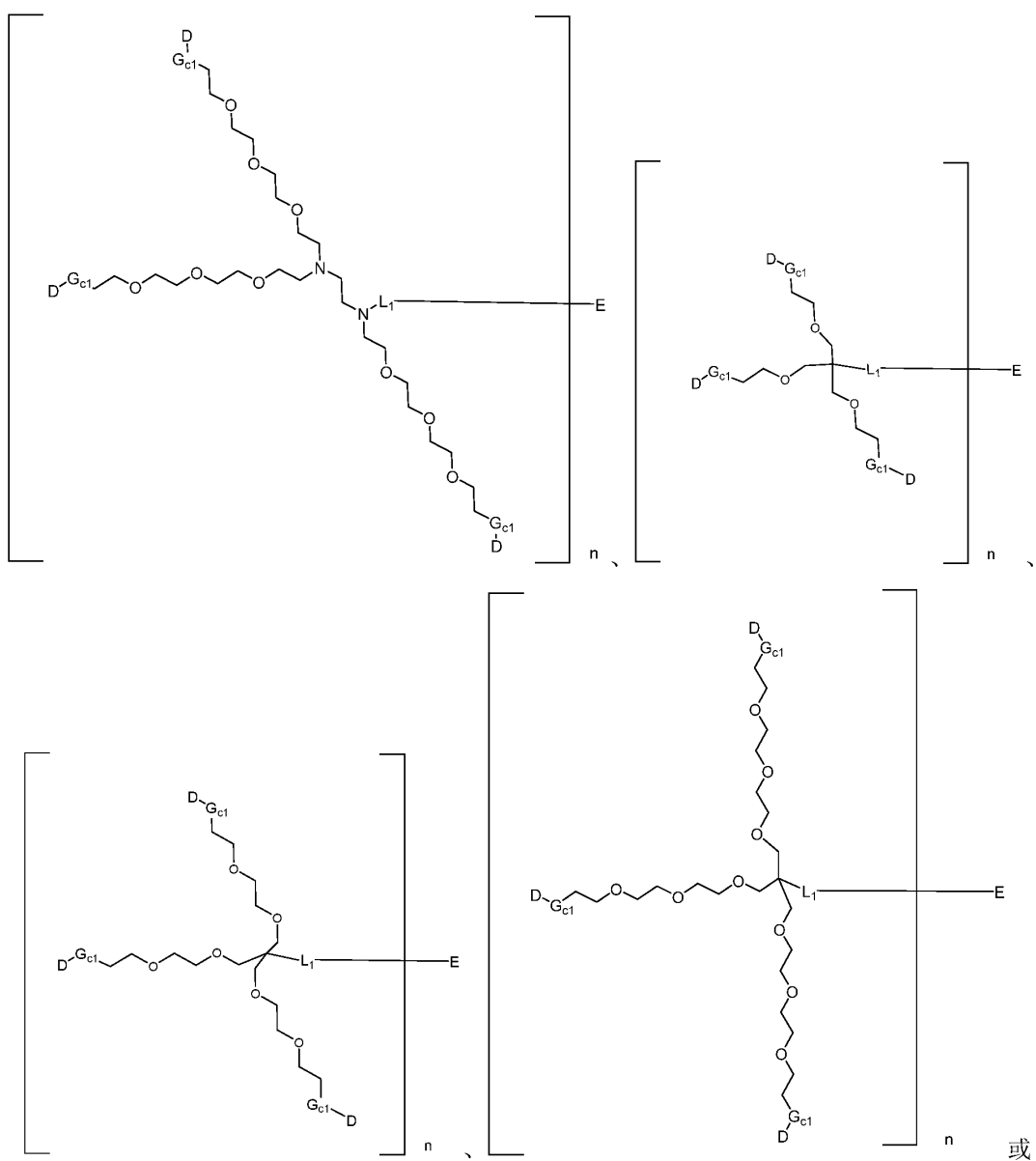
14. 根据权利要求 1-13 任意一项所述的偶联物，其选自：



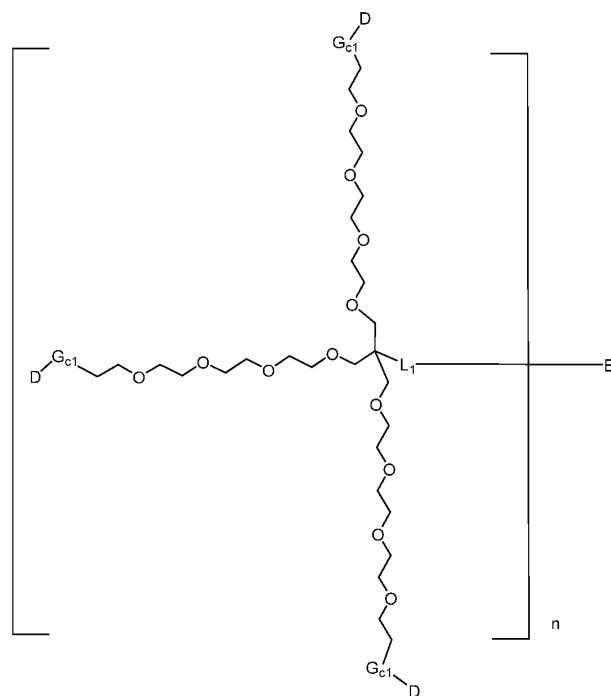
147







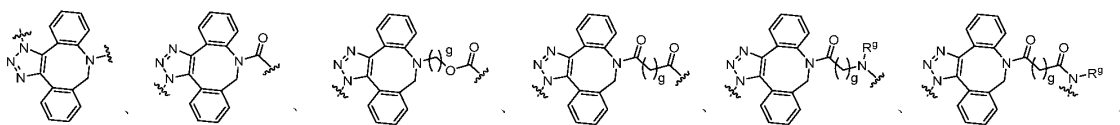
150



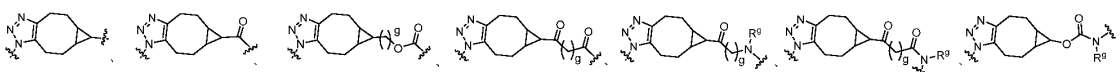
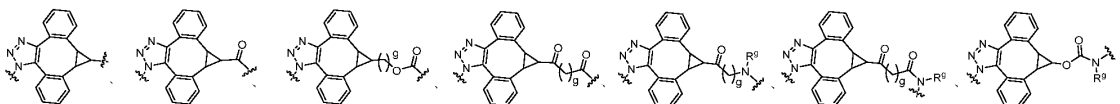
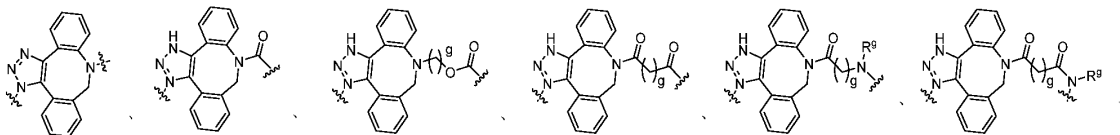
其中,

L₁选自-G_{a1}-(CH₂)_{wa1}-[Y_{a1}-CH₂(CH₂)_{xa2}]_{xa1}-(CH₂)_{wa2}-G_{a2}-(CH₂)_{wa3}-[Y_{a2}-CH₂(CH₂)_{xa4}]_{xa3}-(CH₂)_{wa4}-G_{a3}-, 其中 xa₁、xa₃各自独立地选自0至100的整数, 优选0至30的整数, xa₂、xa₄各自独立地选自0-10的整数, 优选0-6的整数, 更优选1或2, wa₁、wa₂、wa₃、wa₄各自独立地选自0-10的整数, 优选0-6的整数, Y_{a1}、Y_{a2}各自独立地选自O或CH₂, G_{a1}选自基团G_x, G_{a2}、G_{a3}各自独立地选自基团G_x或不存在;

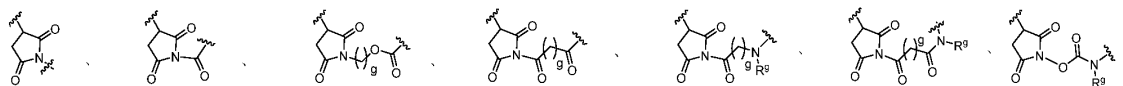
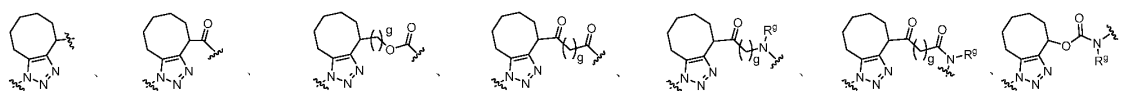
G_x 选自



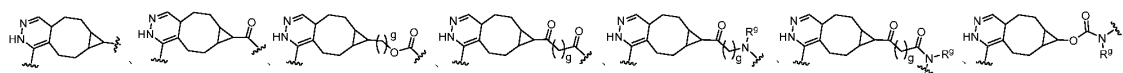
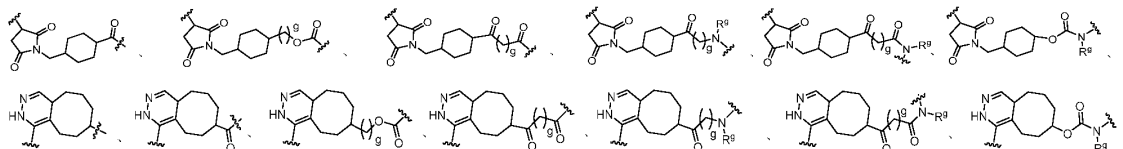
10



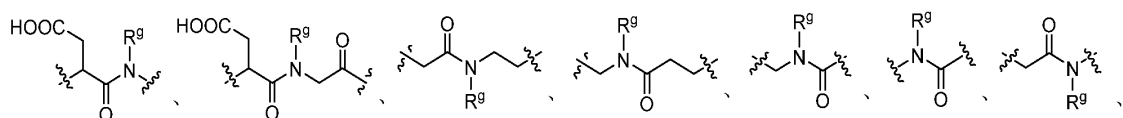
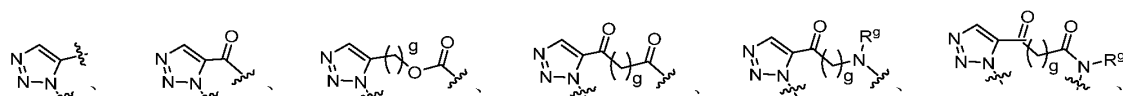
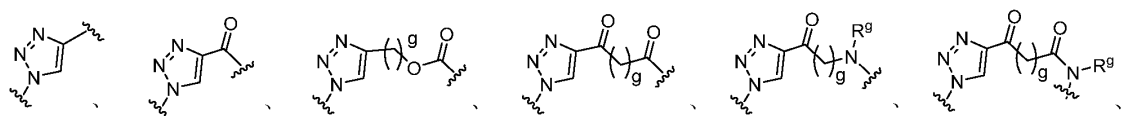
15



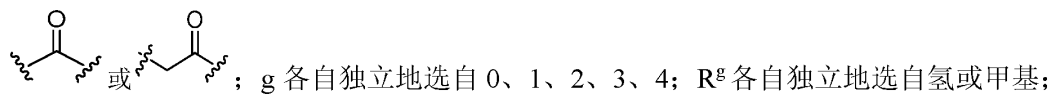
5



10



15



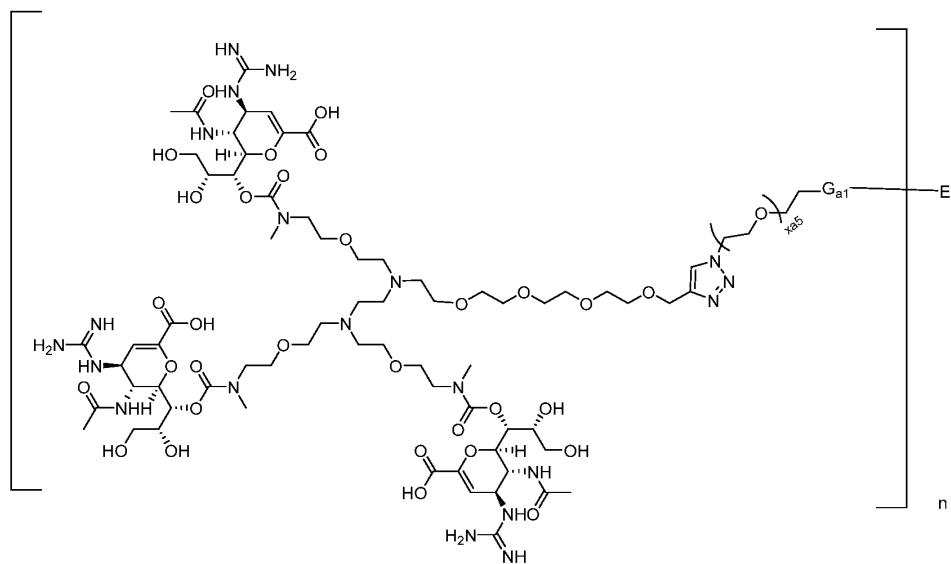
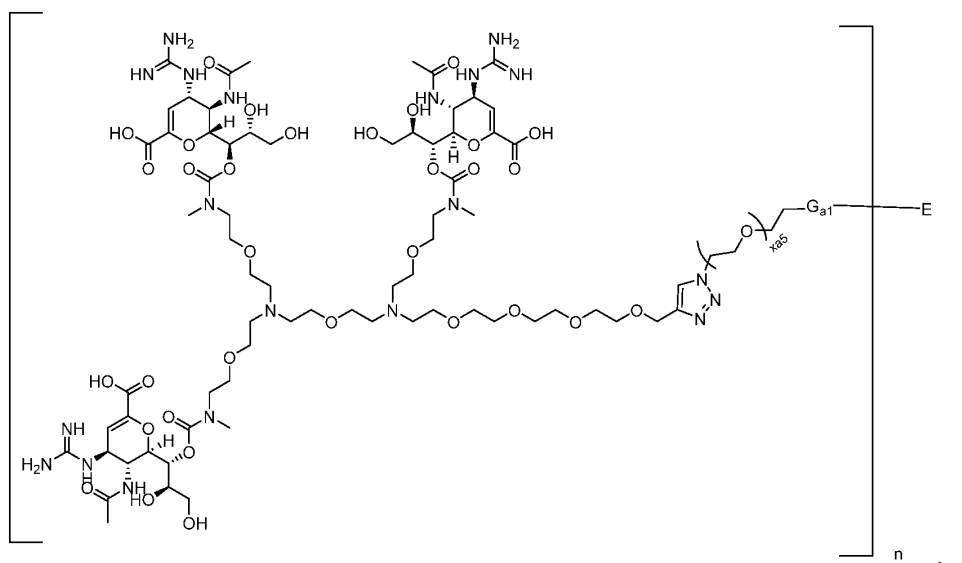
G_{C1} 选自 $-NR_6(C=O)-$ 、 $-NR_6(C=S)-$ 、 $-O(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 和 $-NR_6(C=O)CH_2-$ ，其中 R_6 选自氢和 C_1-C_6 烷基；

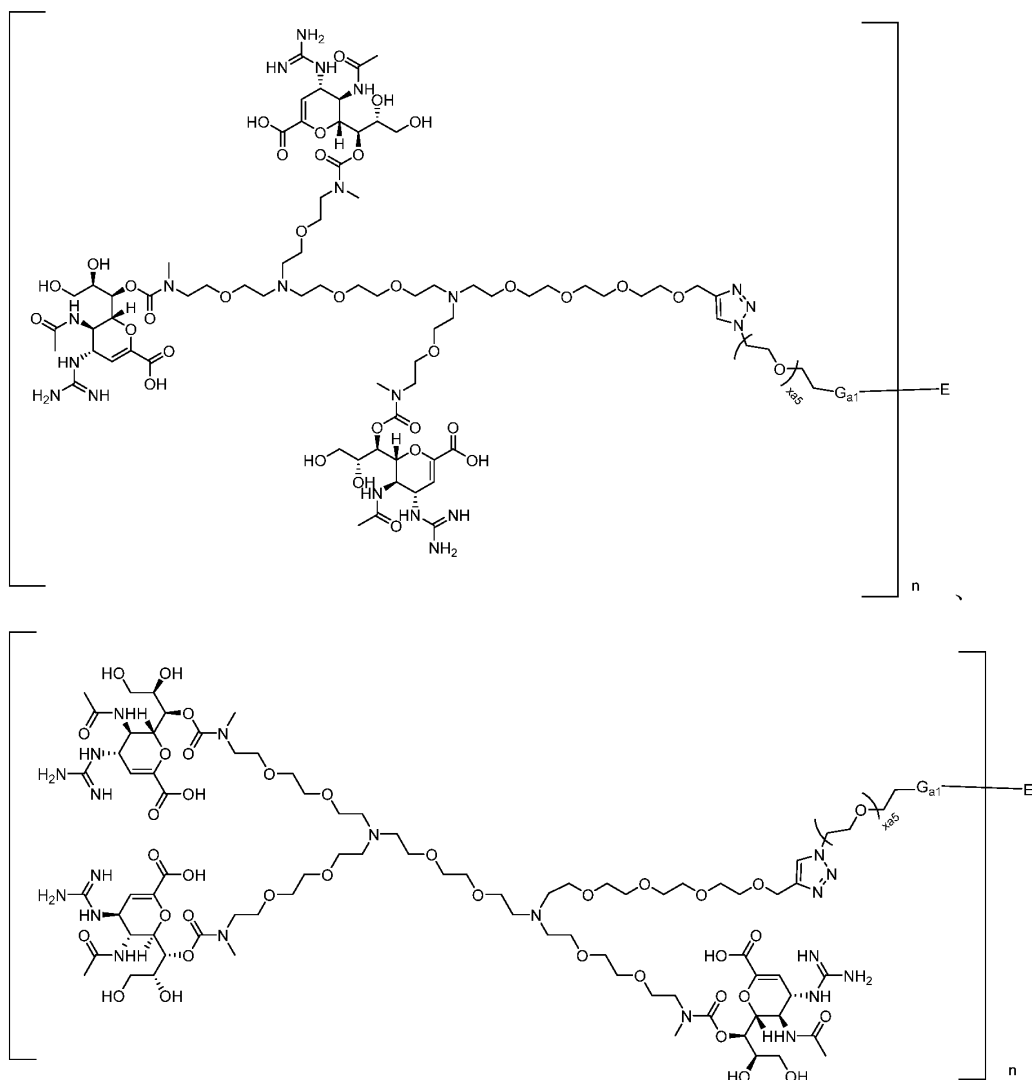
20

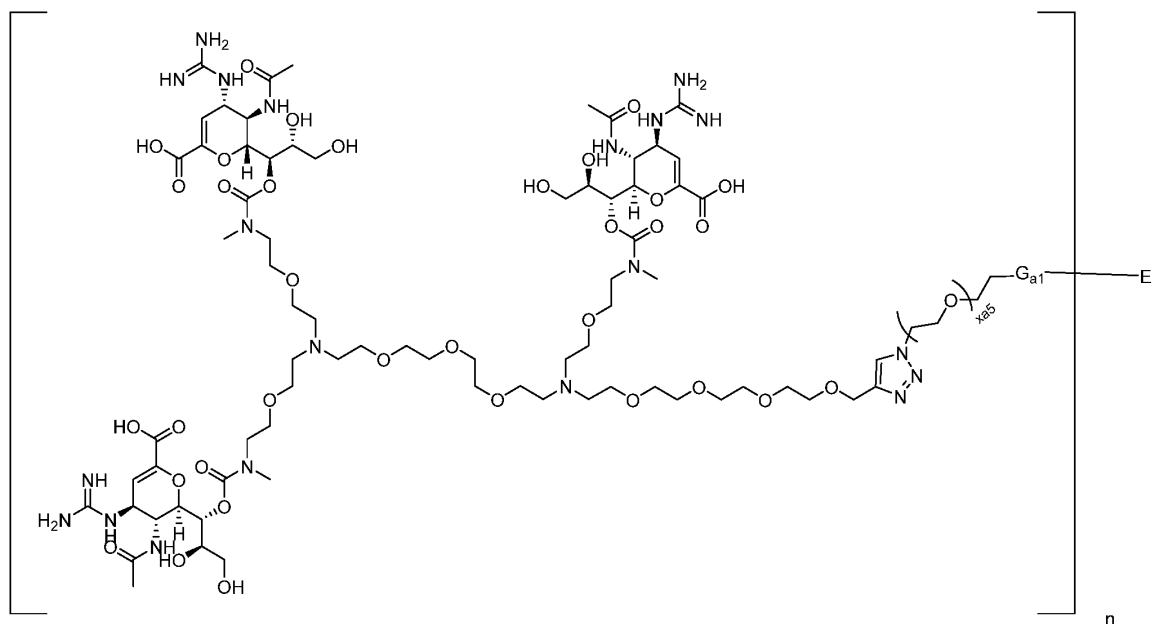
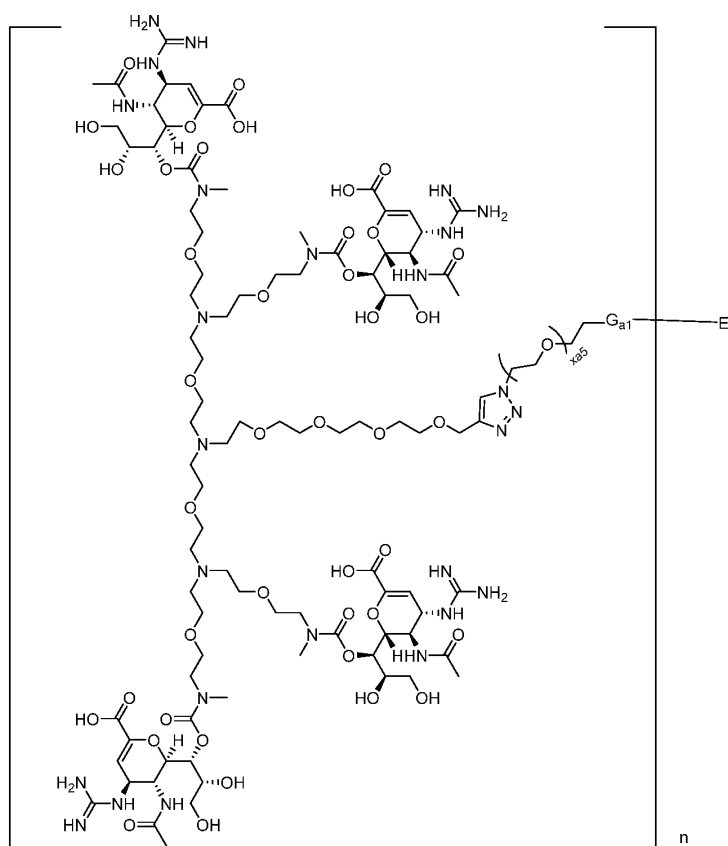
n 为 1-15 之间的任意数值，

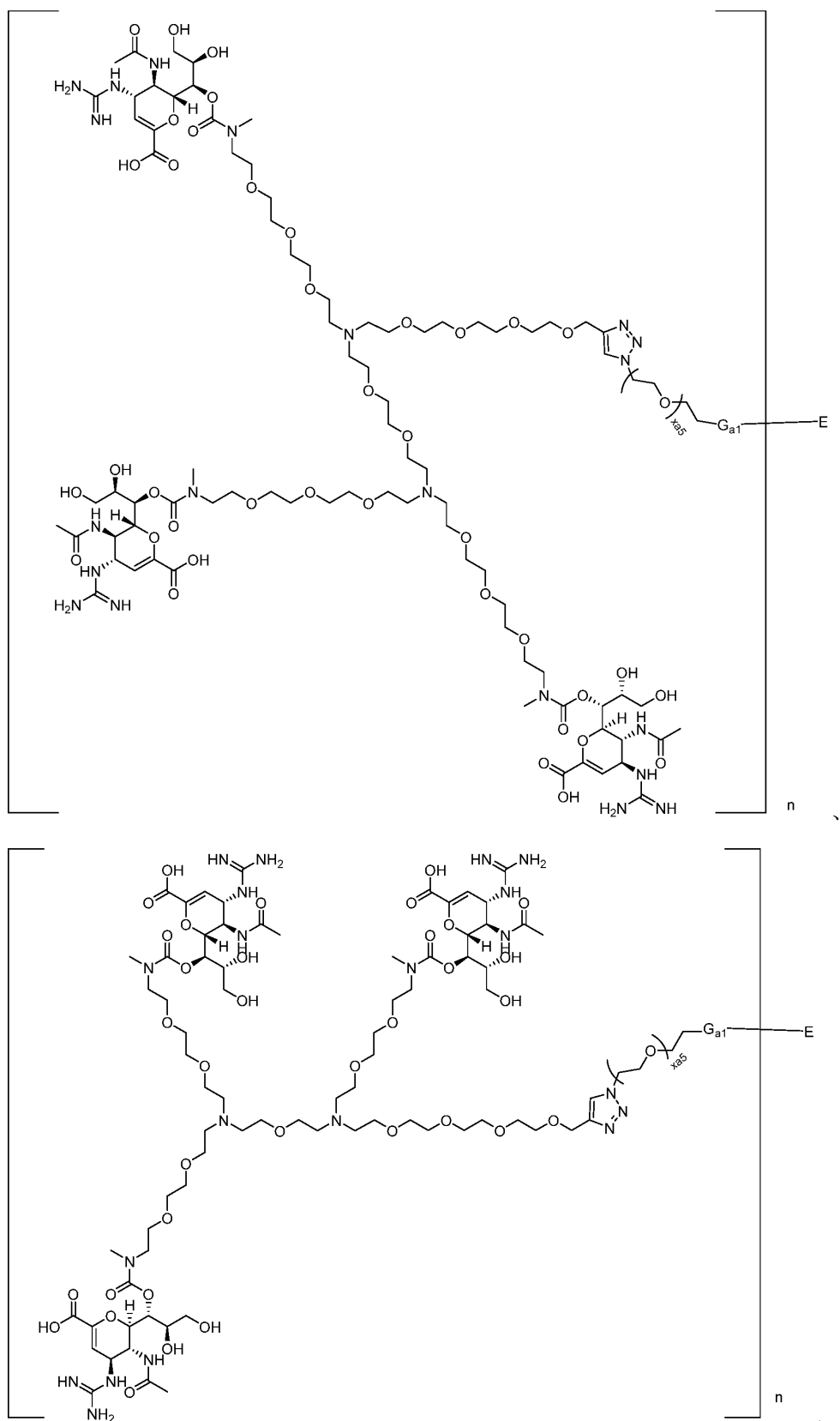
E 如权利要求 1 所述。

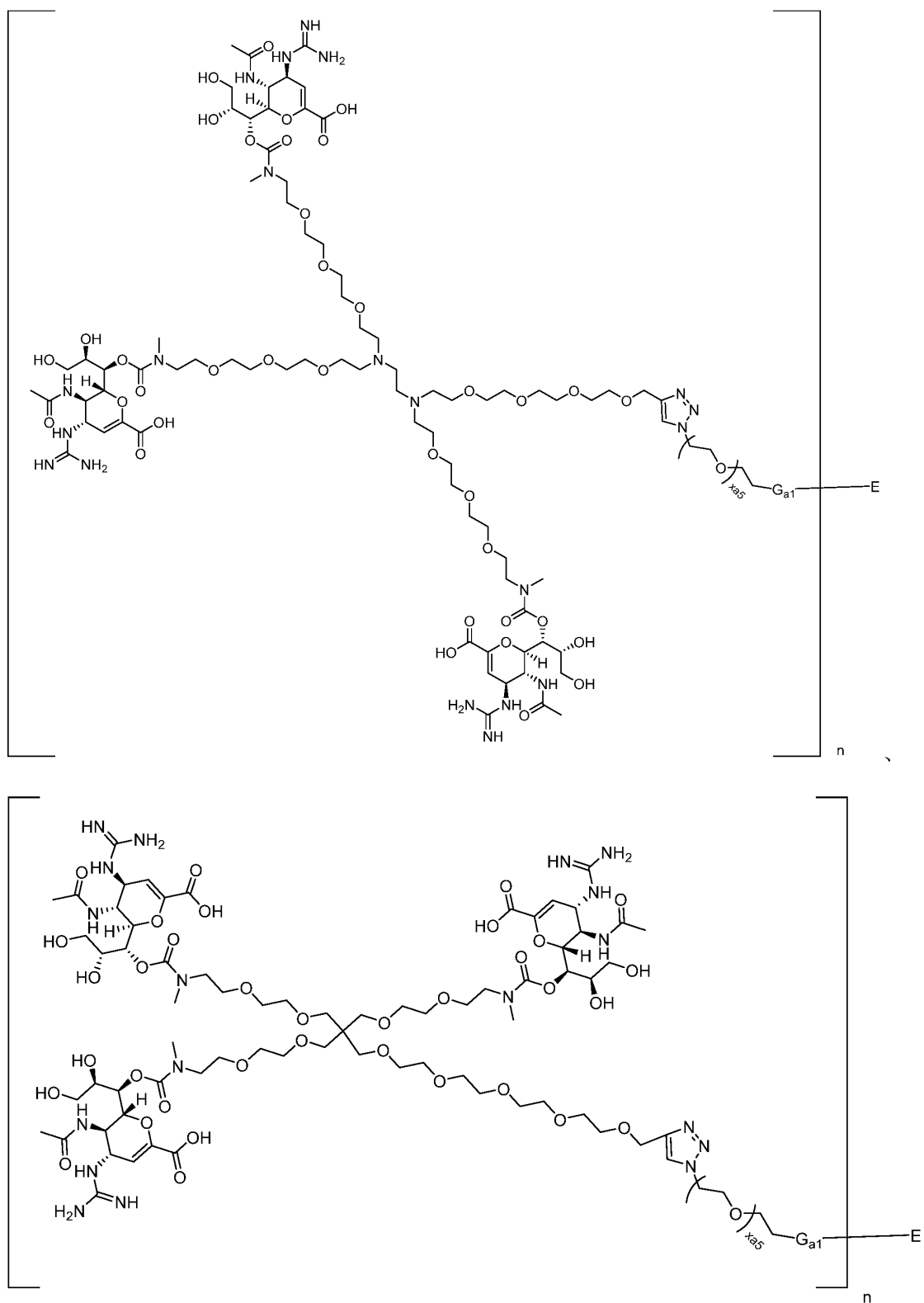
15. 根据权利要求 1-13 任意一项所述的偶联物，其选自：

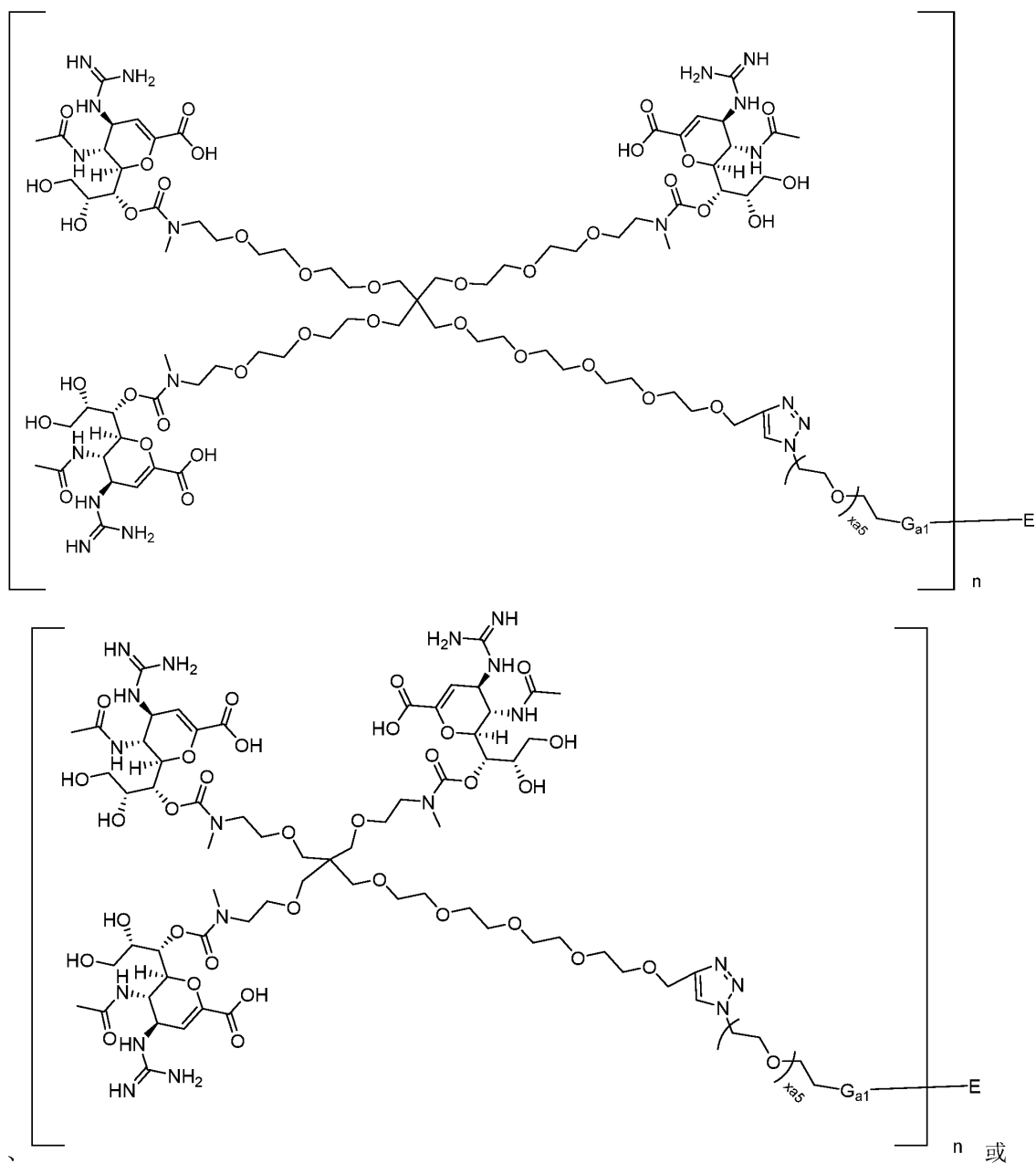


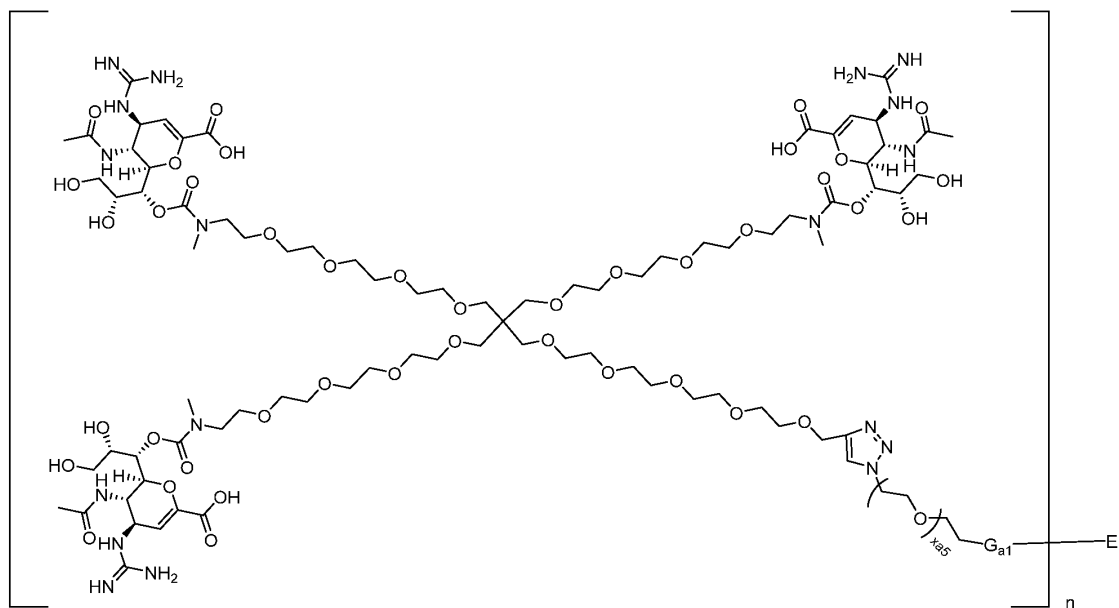








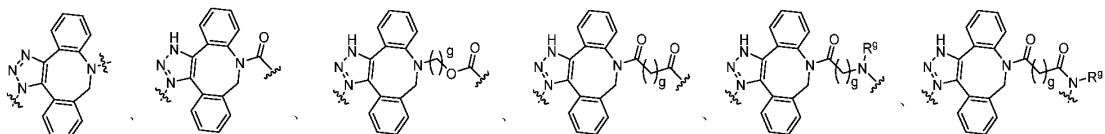
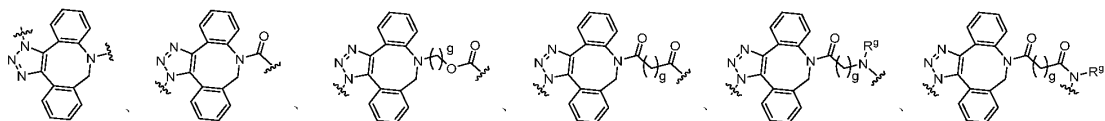




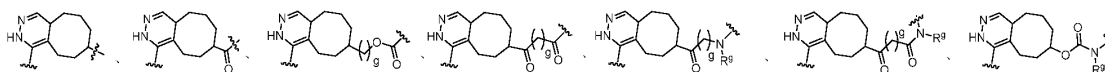
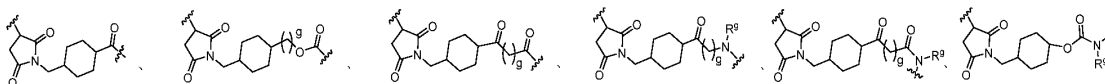
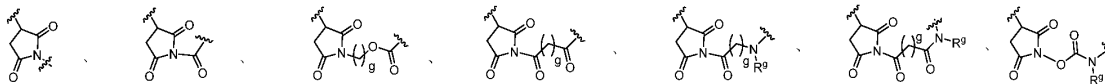
其中,

xa5 各自独立地选自 2-8 之间的整数,

5 Ga1 各自独立地选自

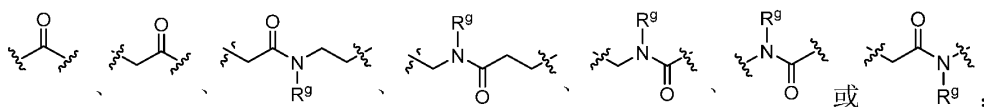


10



15

160



g 各自独立地选自 0、1、2、3、4； R^g 各自独立地选自氢或甲基；

n 为 1-15 之间的任意数值，

E 如权利要求 1 所述。

5

16. 根据权利要求 1-15 任意一项所述的偶联物，其中 n 为 1-15 之间的任意数值，优选 2-12 之间的任意数值。

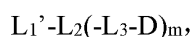
17. 一种药物组合物，包含如权利要求 1-16 任一项所述的偶联物以及药学上可接受的赋形剂。

10

18. 权利要求 1-16 任一项所述的偶联物或权利要求 17 所述的药物组合物在制备用于治疗病毒感染的药物中的用途，优选所述病毒感染是由流感病毒或副流感病毒引起，优选所述病毒感染为 A 型、B 型或 C 型流感病毒或副流感病毒。

15

19. 如下所示的化合物，



其中，

L_1' 选自 $G_X'-(\text{CH}_2)_{wa1}-[Y_{a1}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{xa2}]_{xa1}-(\text{CH}_2)_{wa2}-G_{a2}-(\text{CH}_2)_{wa3}-[Y_{a2}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{xa4}]_{xa3}-$

$(\text{CH}_2)_{wa4}-G_{a3}-$ ，其中，

20

$xa1$ 、 $xa3$ 各自独立地选自 0 至 100 的整数，优选 0 至 30 的整数，

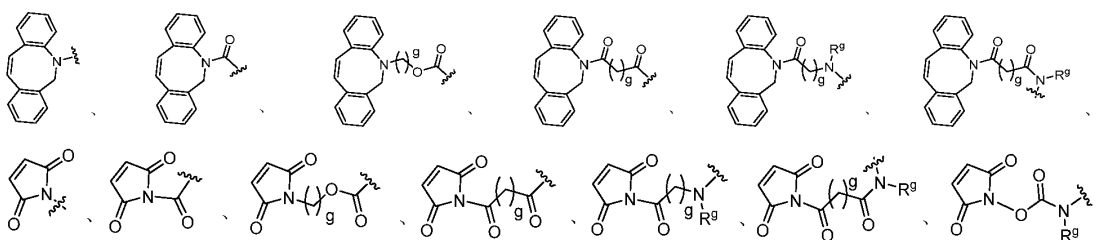
$xa2$ 、 $xa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，更优选 1 或 2，

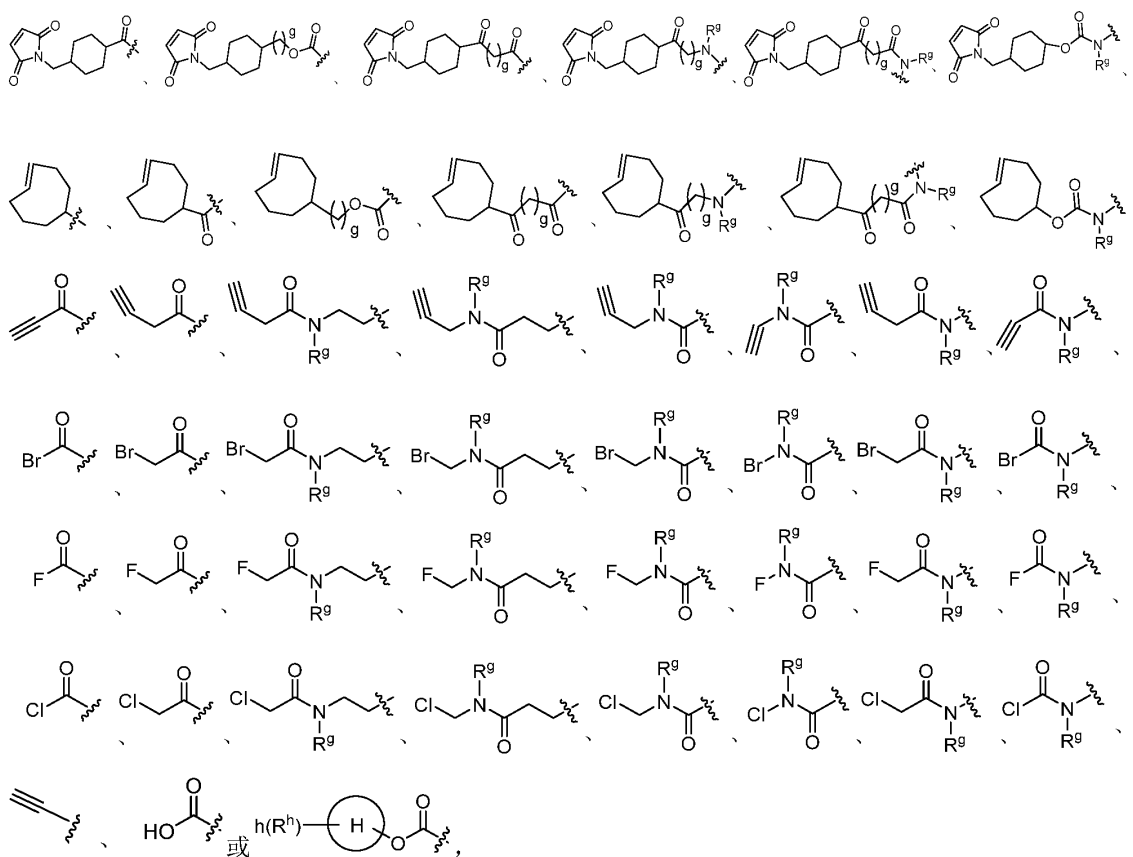
$wa1$ 、 $wa2$ 、 $wa3$ 、 $wa4$ 各自独立地选自 0-10 的整数，优选 0-6 的整数，

Y_{a1} 、 Y_{a2} 各自独立地选自 O 或 CH_2 ；

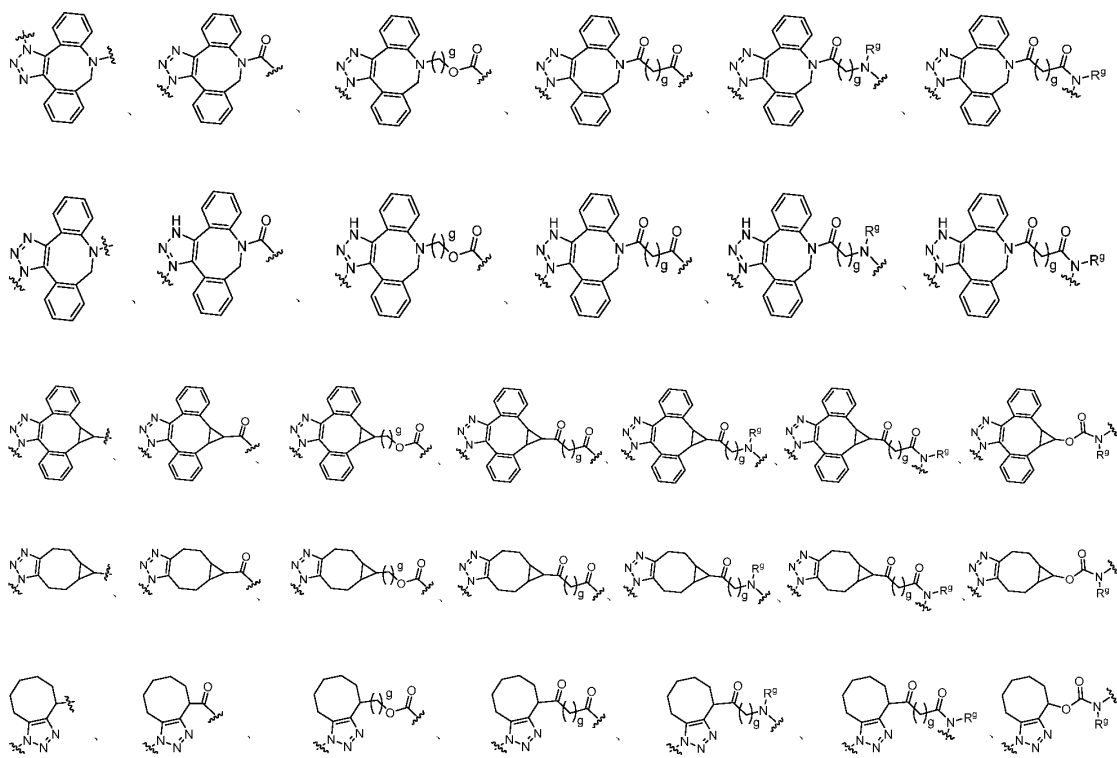
G_X' 各自独立地选自

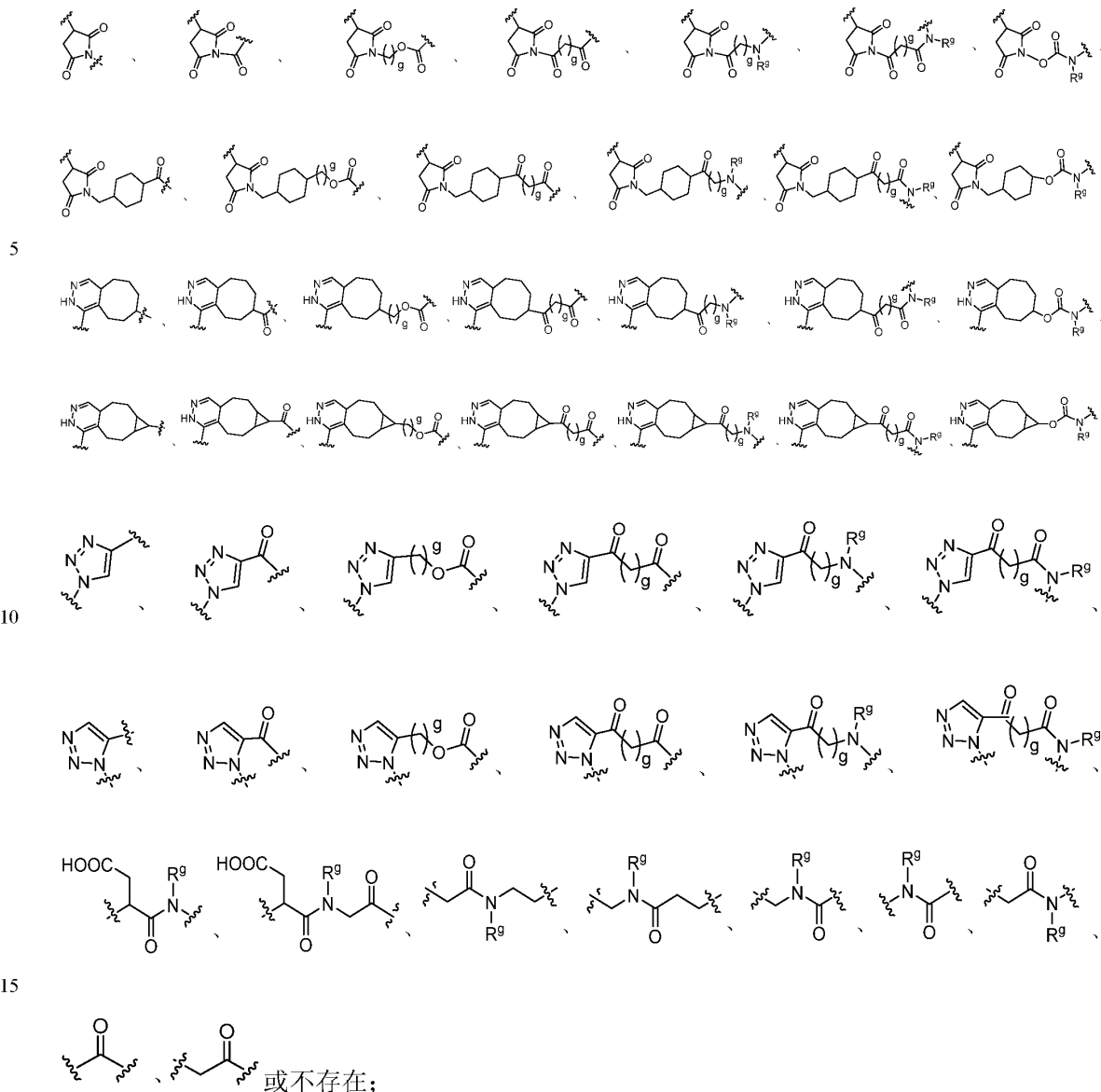
25

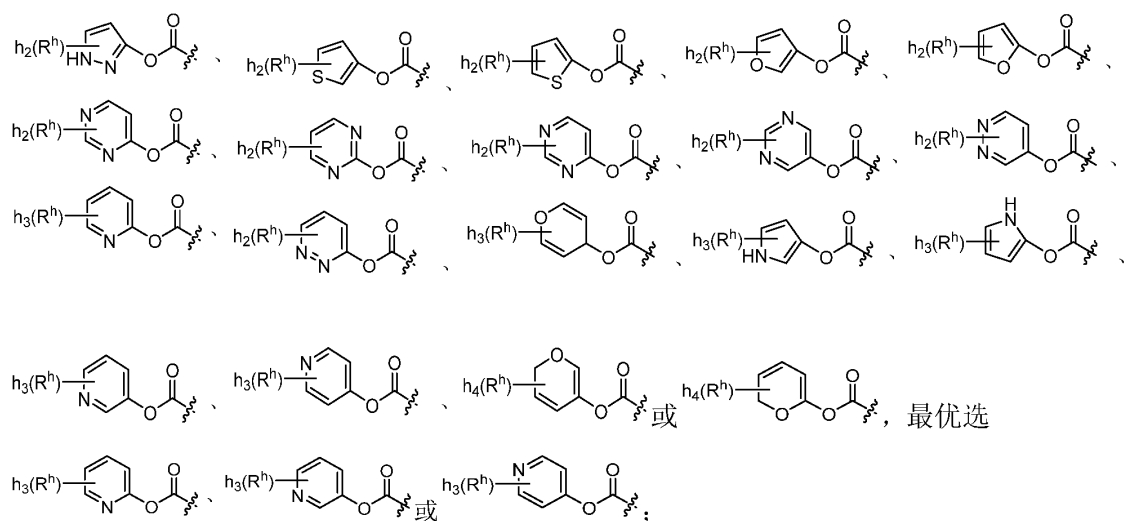




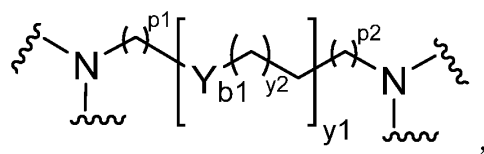
Ga₂、Ga₃ 各自独立地选自:





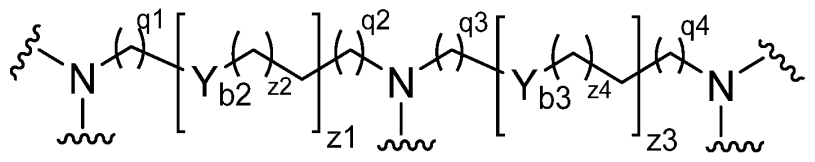


- 5 R^h 各自独立地选自卤素；
 h 选自0、1、2、3、4、5；
 h_1 各自独立地选自0、1、2；
 h_2 各自独立地选自0、1、2、3；
 h_3 各自独立地选自0、1、2、3、4；
10 h_4 各自独立地选自0、1、2、3、4、5；
 L_2 选自



其中, y_1 为0至100的整数, 优选0至30的整数,
 y_2 为0-10的整数, 优选0-6的整数, 更优选1或2,

- 15 Y_{b1} 选自O或 CH_2 ,
 p_1 、 p_2 各自独立地选自0-10的整数, 优选0-6的整数, 更优选1或2; 或



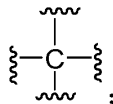
其中, z_1 为0至100的整数, 优选0至30的整数,
 z_2 为0-10的整数, 优选0-6的整数, 更优选1或2,

- 20 Y_{b2} 选自O或 CH_2 ,
 z_3 为0至100的整数, 优选0至30的整数,

z4 为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 1 或 2,

Y_{b3} 选自 O 或 CH₂,

q1、q2、q3、q4 各自独立地选自 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数; 或



5 L₃ 为 -(CH₂)_{wc1}-[Y_{c1}-CH₂(CH₂)_{xc2}]_{xc1}-(CH₂)_{wc2}-G_{c1}-, 其中,

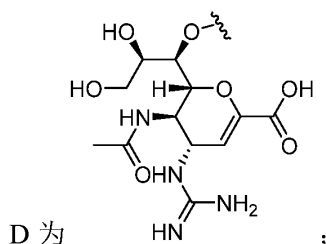
xc1 各自独立地为 0 至 100 的整数, 优选 0 至 30 的整数,

xc2 各自独立地为 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, 更优选 1 或 2,

Y_{c1} 各自独立地选自 O 或 CH₂,

wc1、wc2 各自独立地选自 0-10 的整数, 优选 0-6 的整数, G_{c1} 选自 -NR₆(C=O)-、-

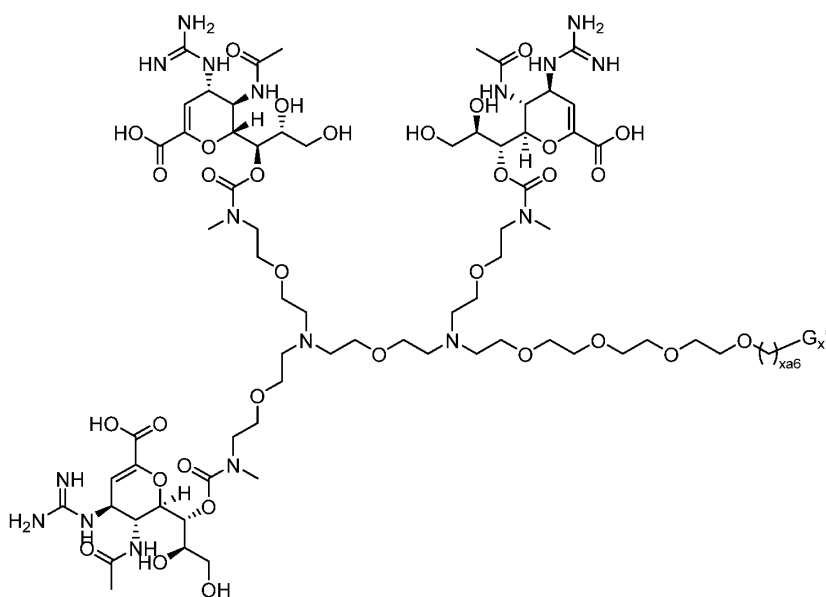
10 NR₆(C=S)-、-O(C=O)-、-(C=O)-、-NR₆(C=O)CH₂-或化学键, 其中 R₆ 选自氢和 C₁-C₆ 烷基;

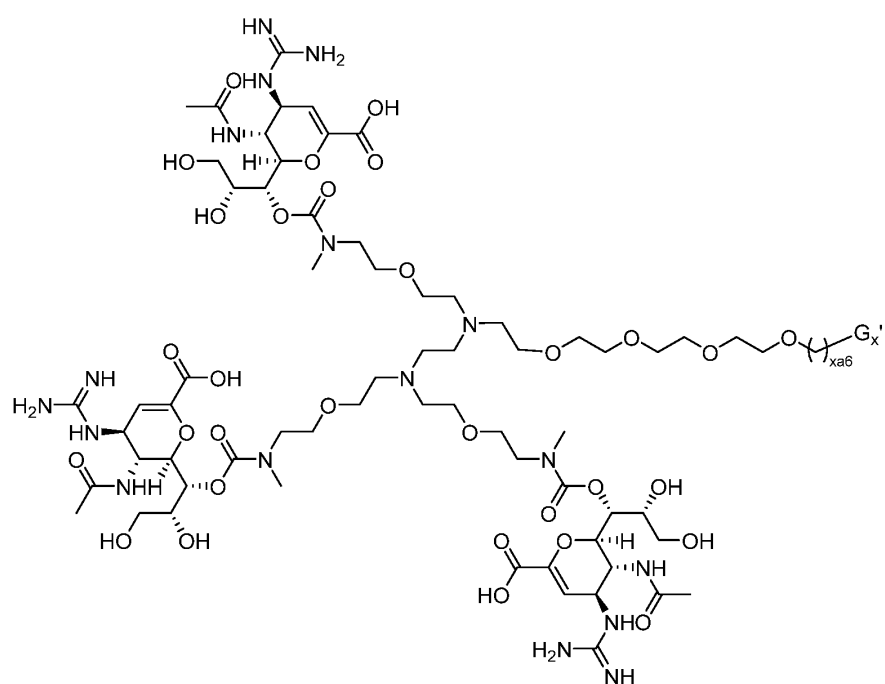


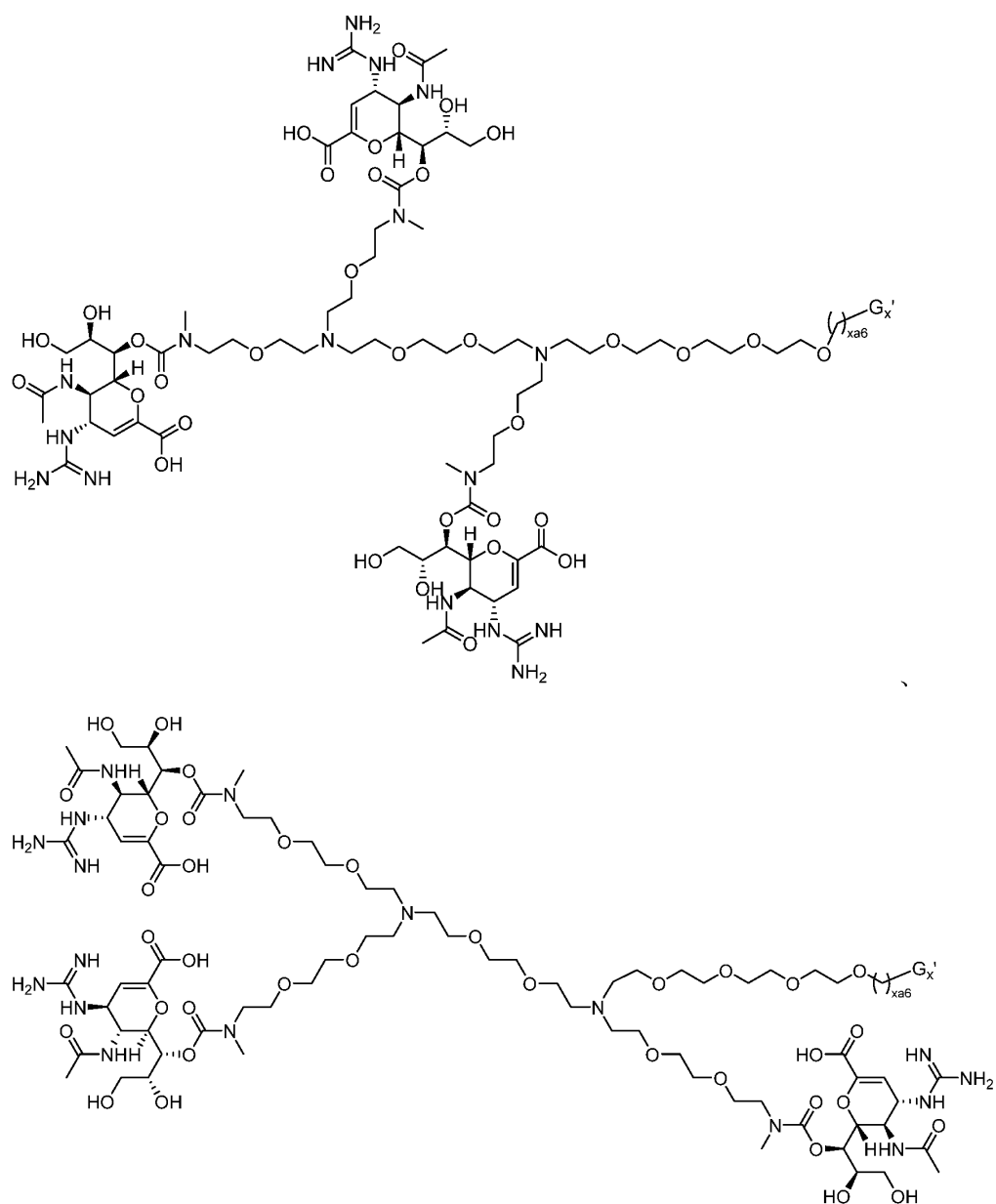
D 为

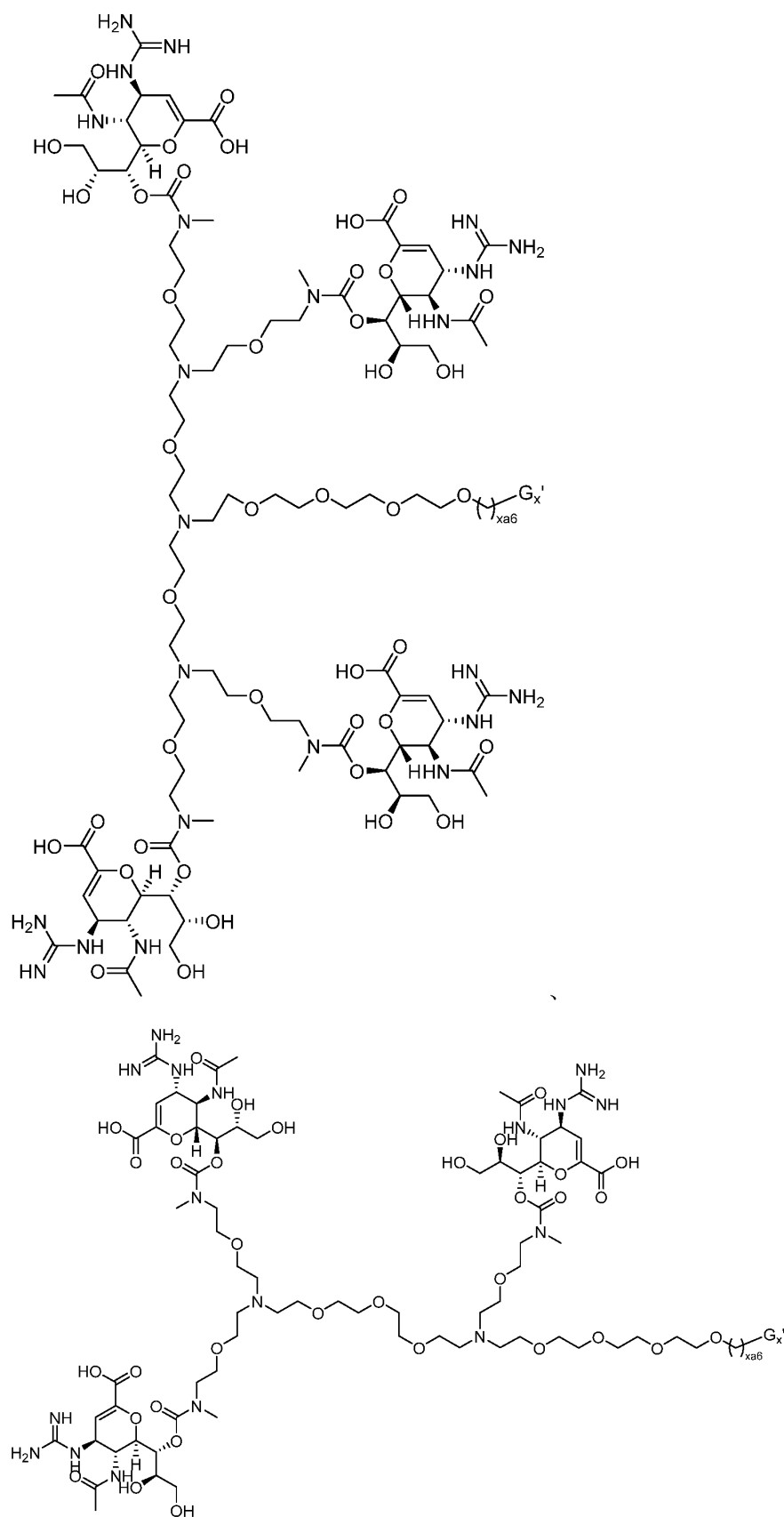
m 为 3 或 4。

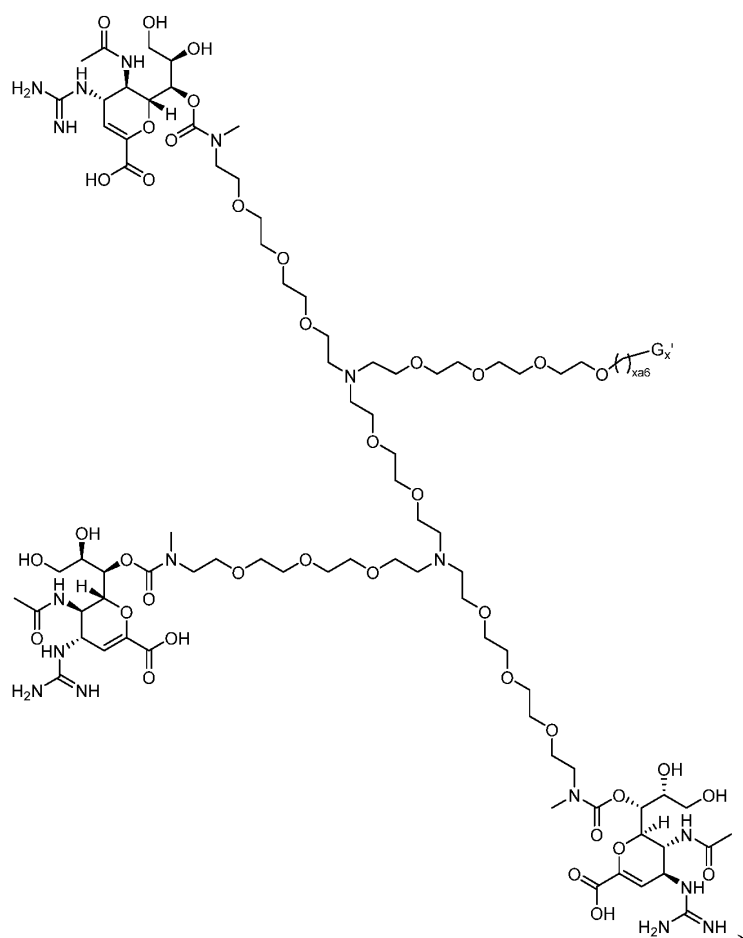
15 20. 根据权利要求 19 所述的化合物, 其选自:



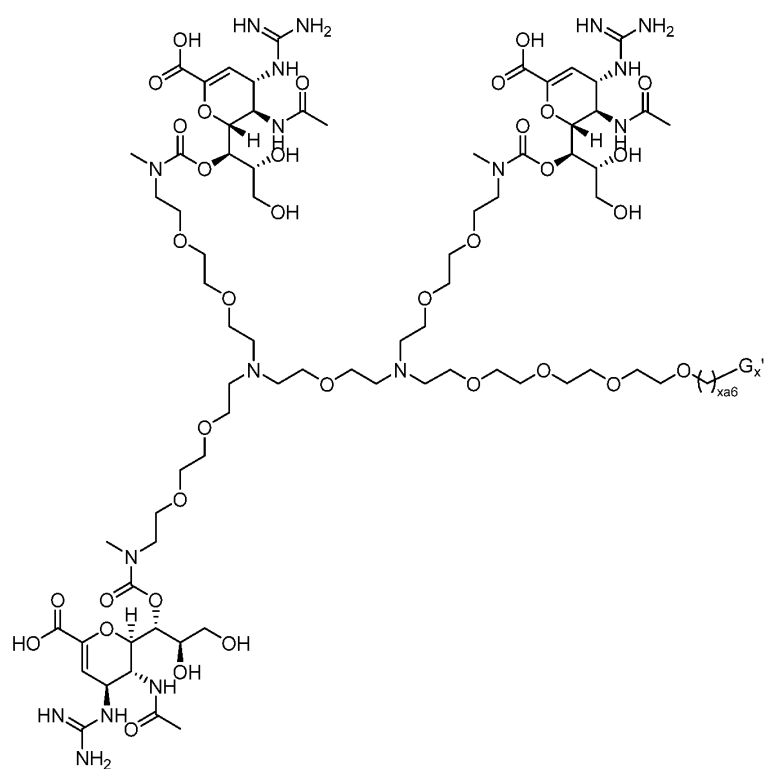




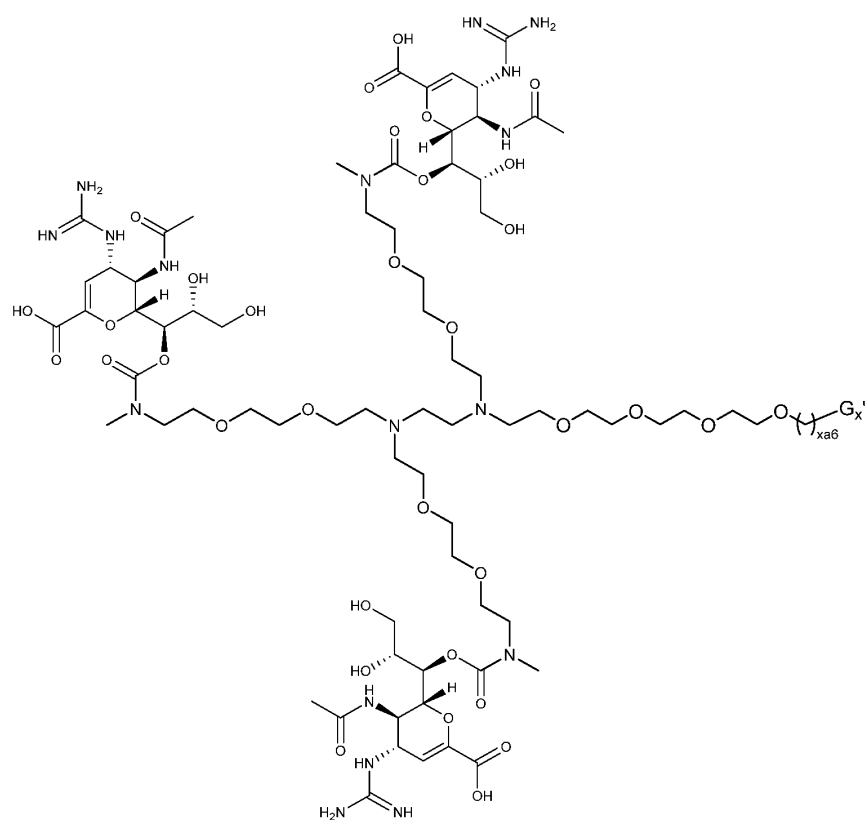




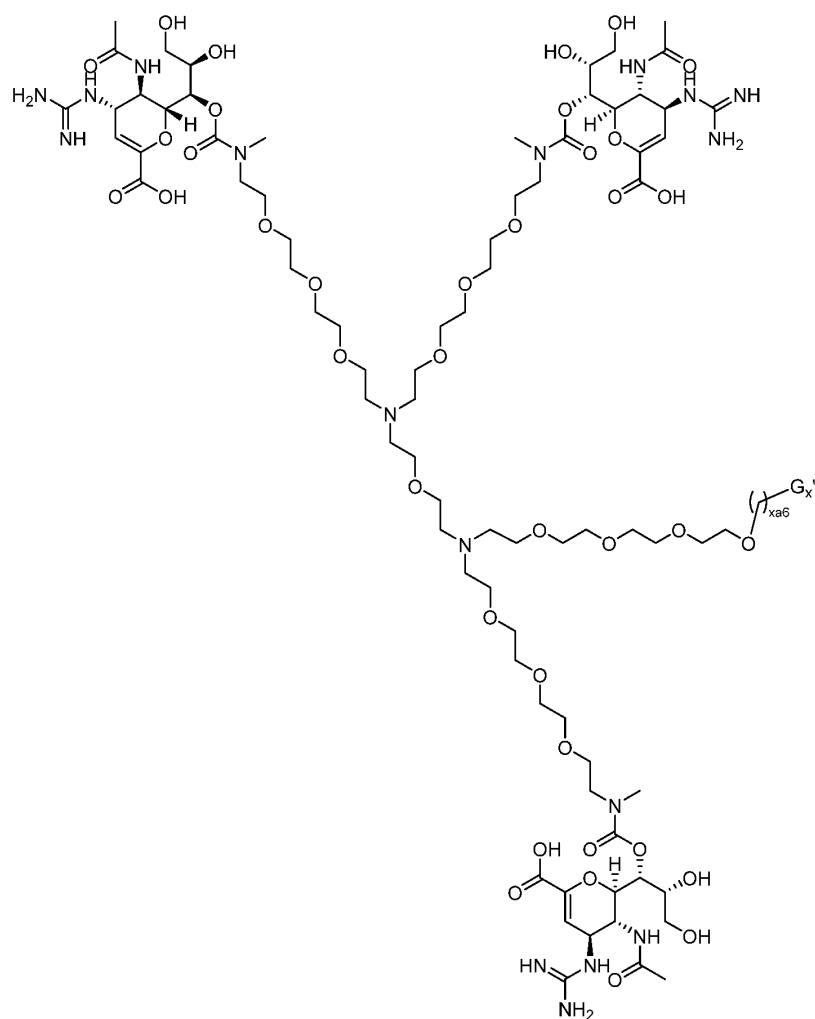
169

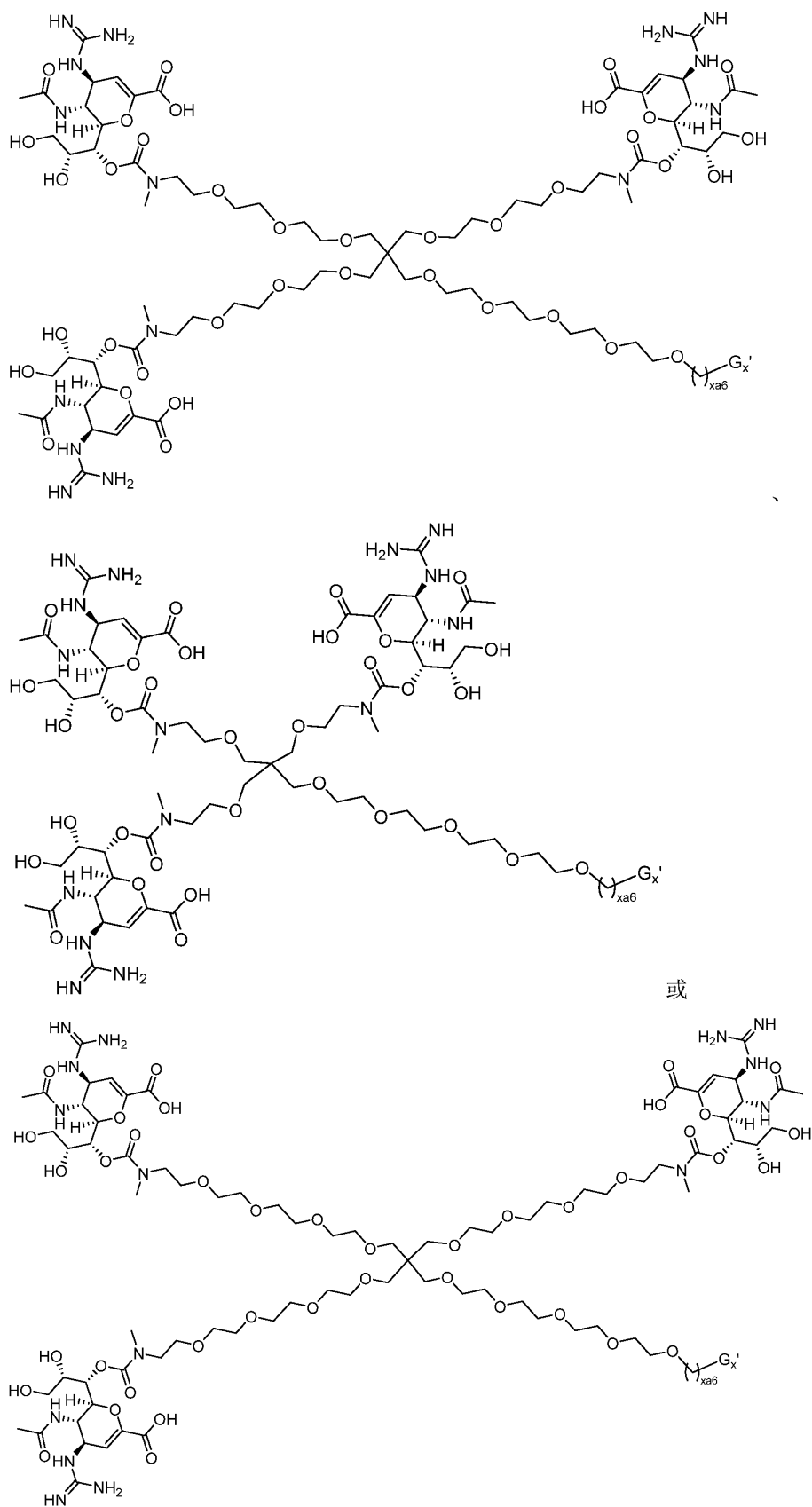


170



171

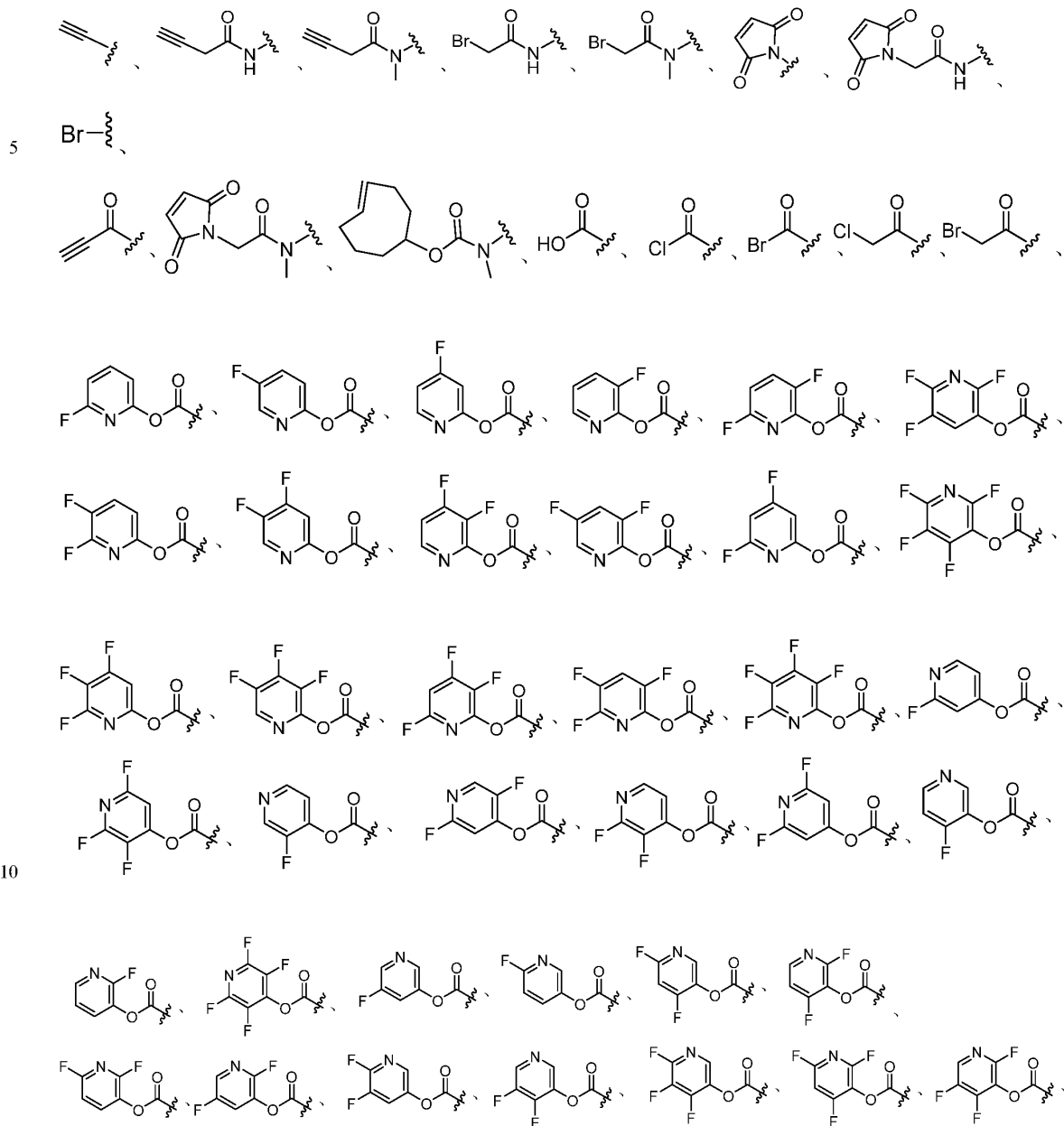


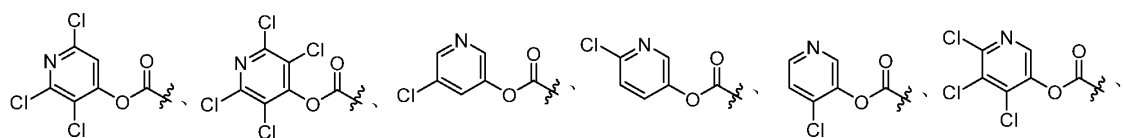
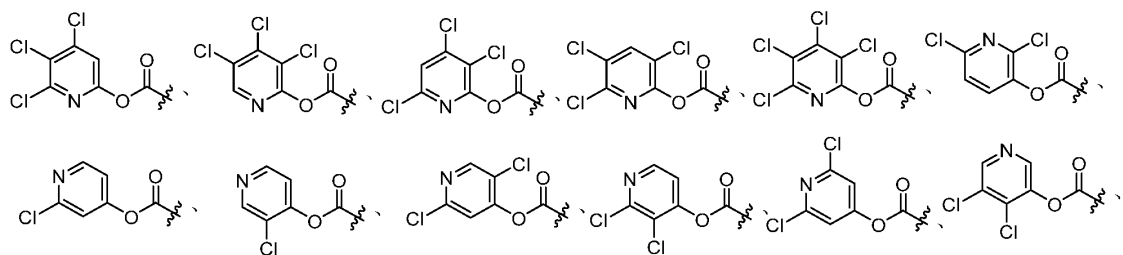


其中,

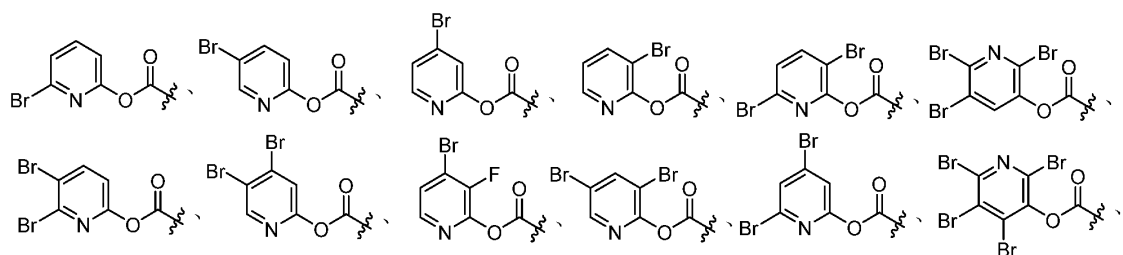
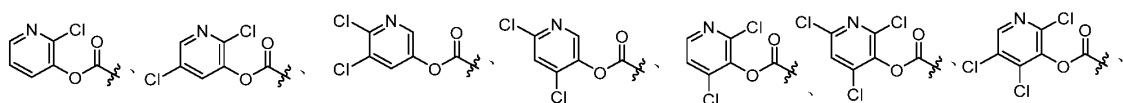
xa6 各自独立地选自 0-8 之间的整数,

G_x' 各自独立地选自

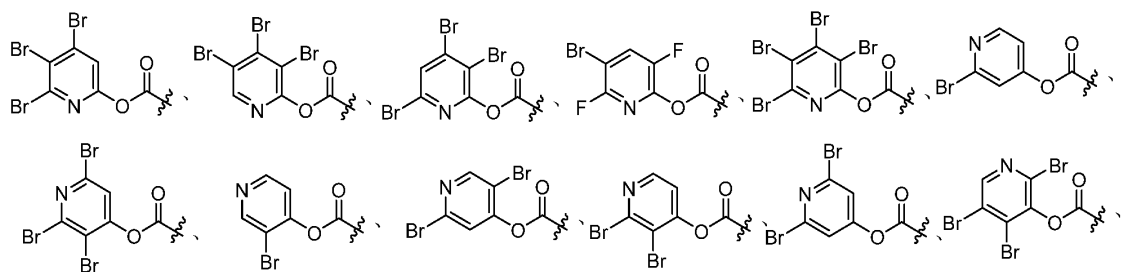


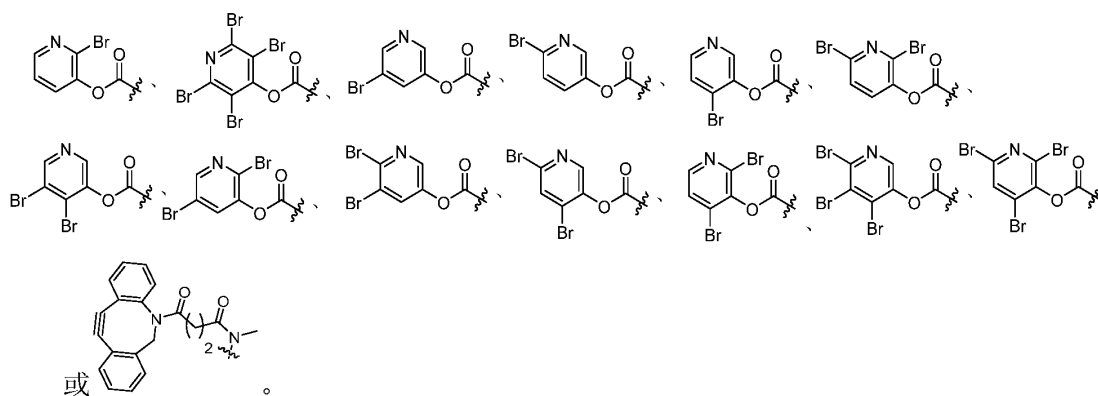


5

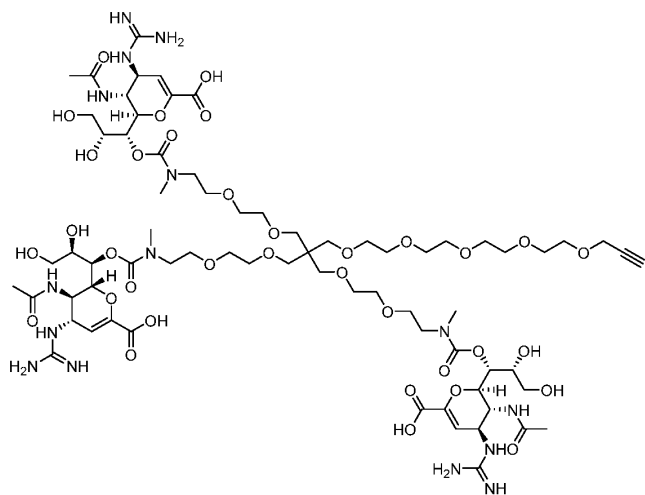


10

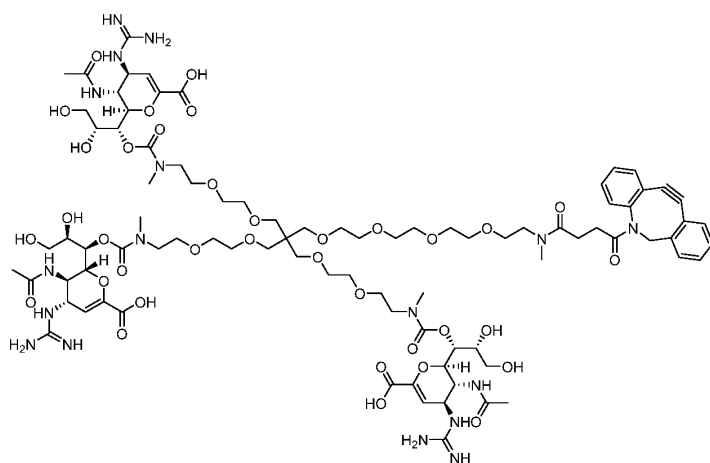


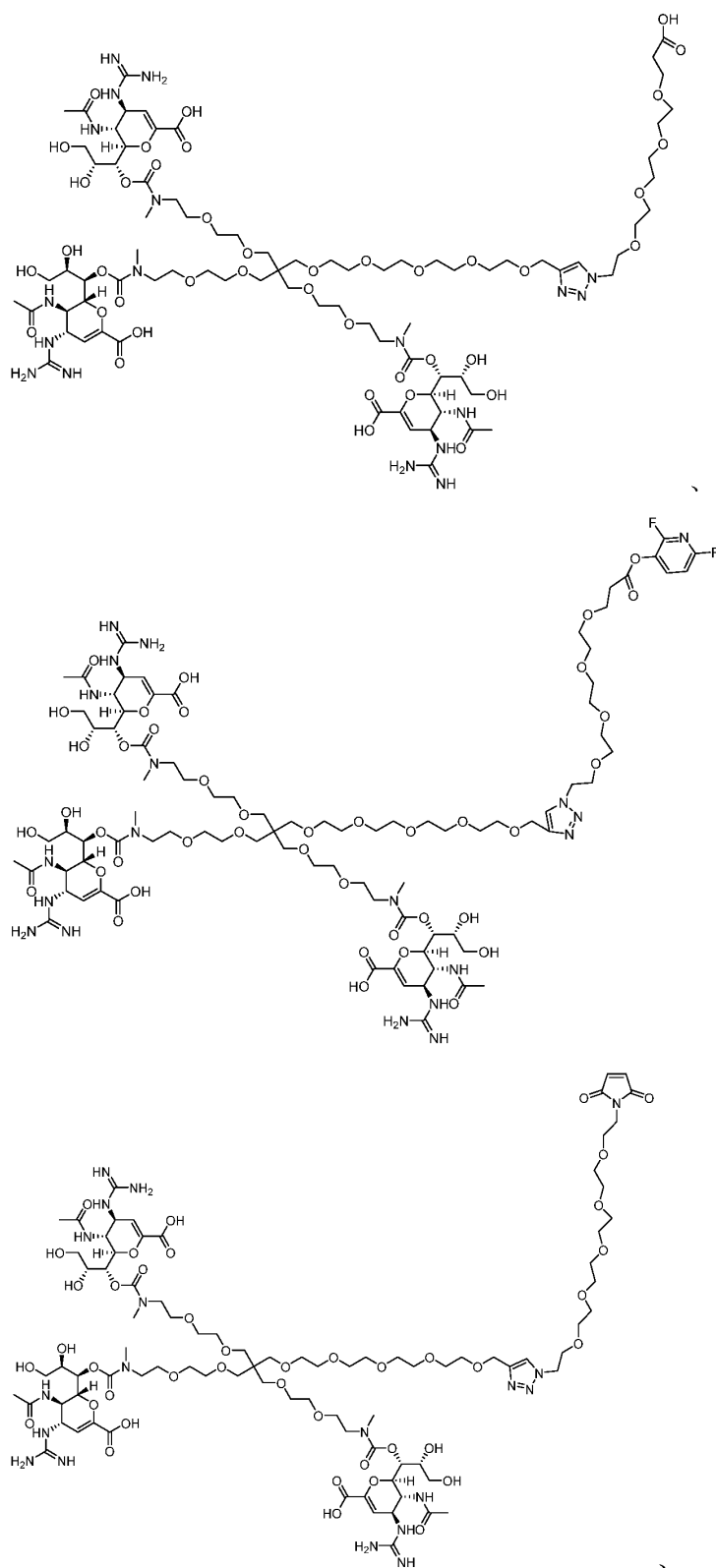


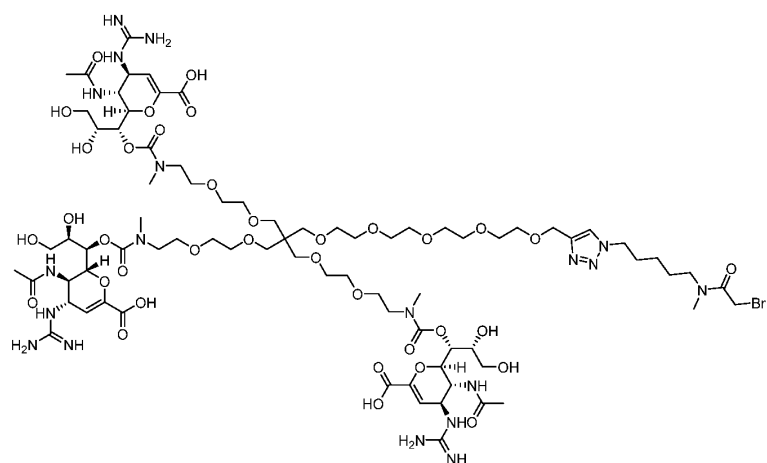
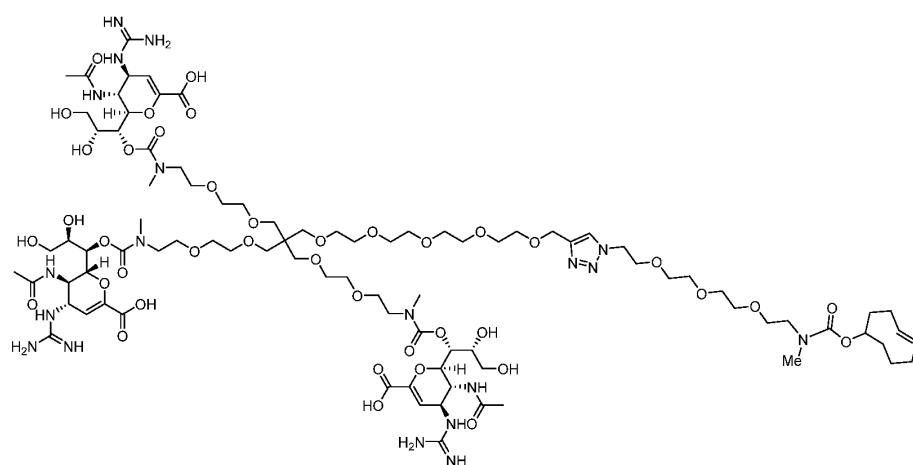
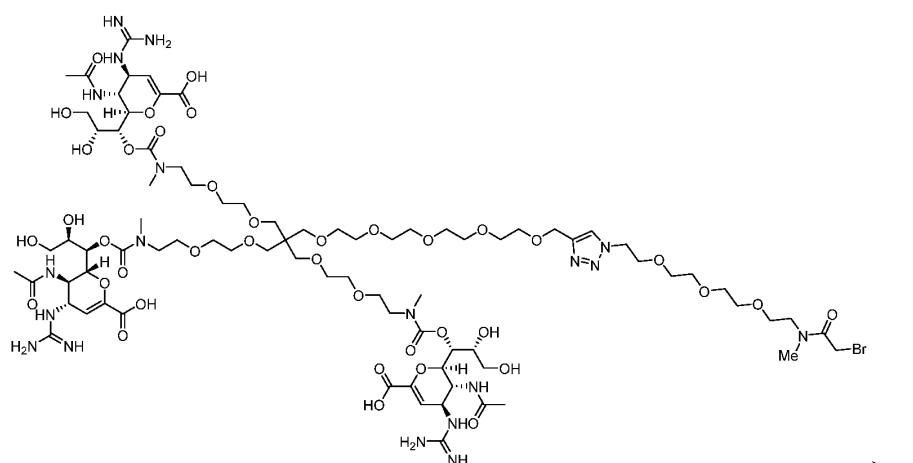
21. 根据权利要求 19 或 20 所述的化合物，其选自：



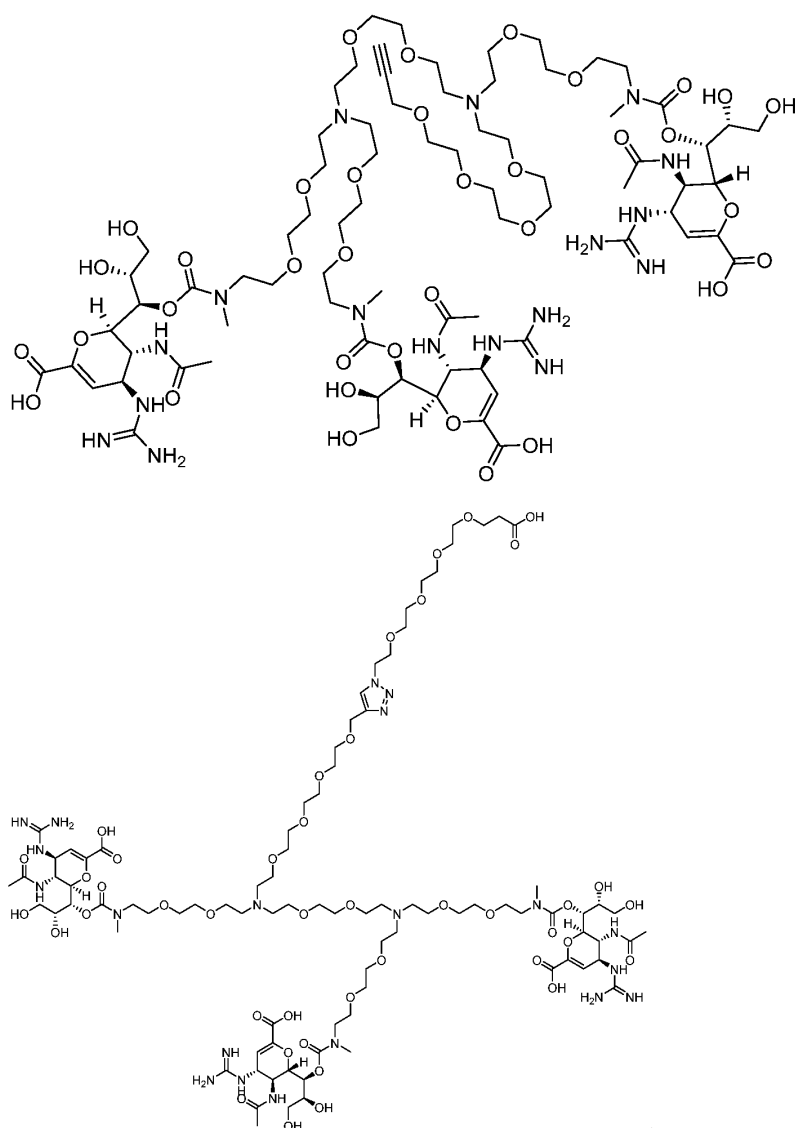
5



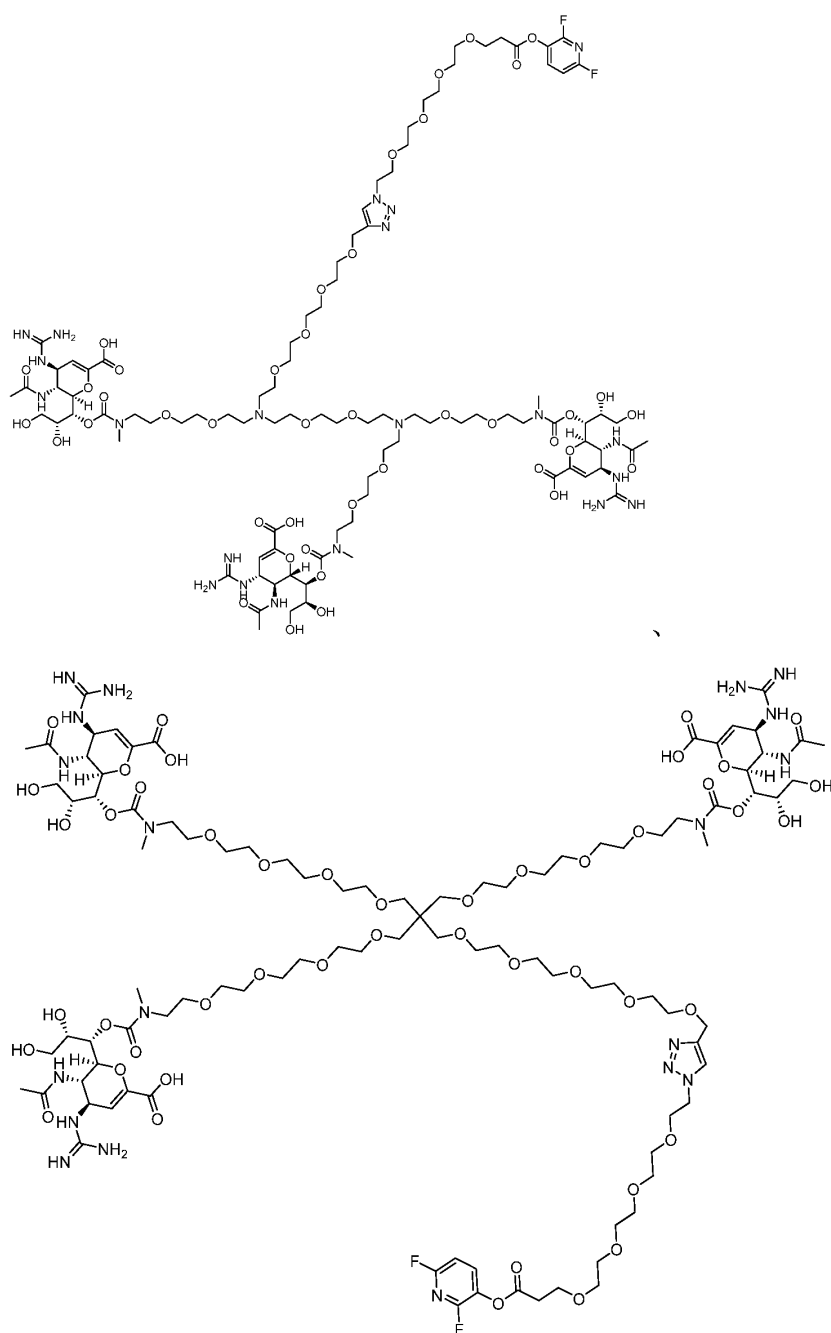


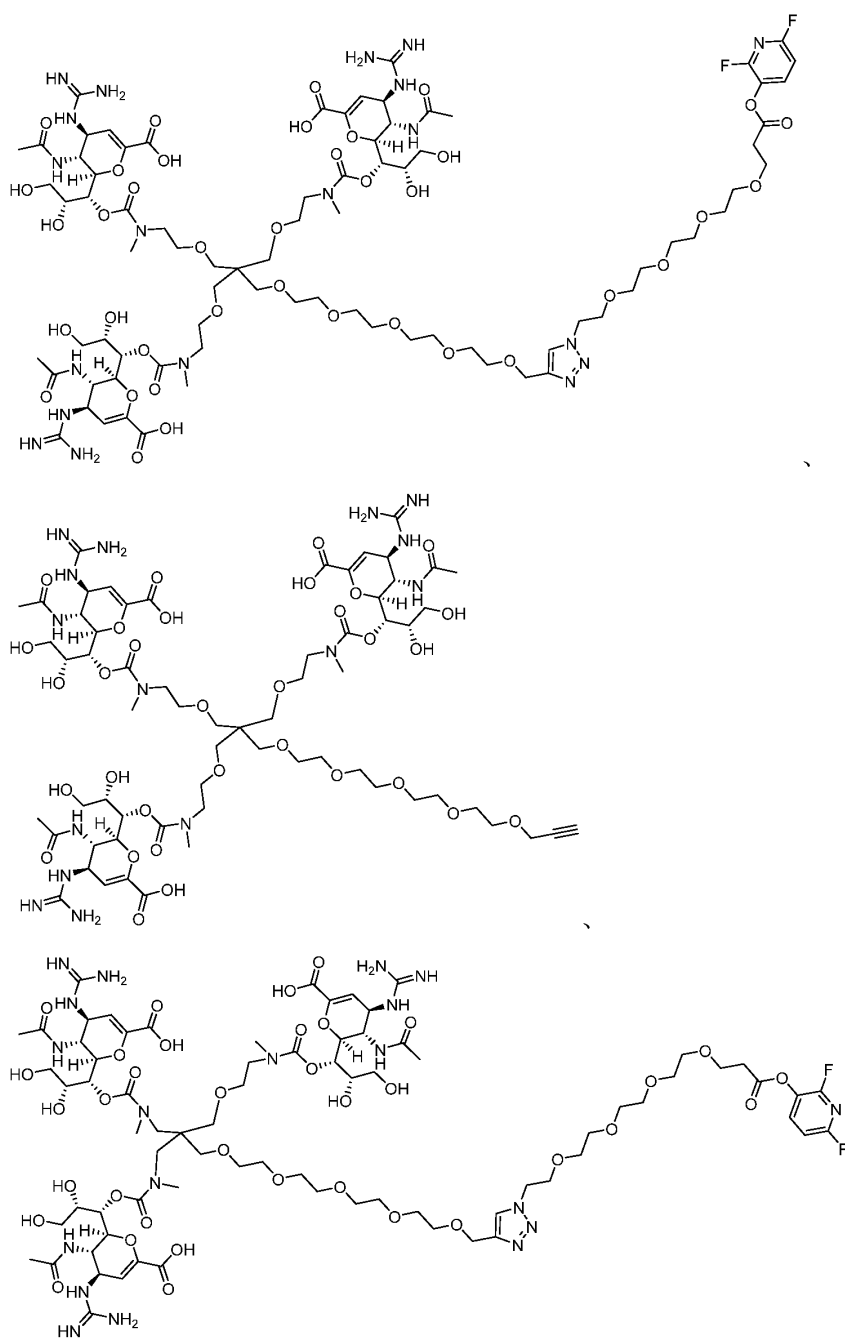


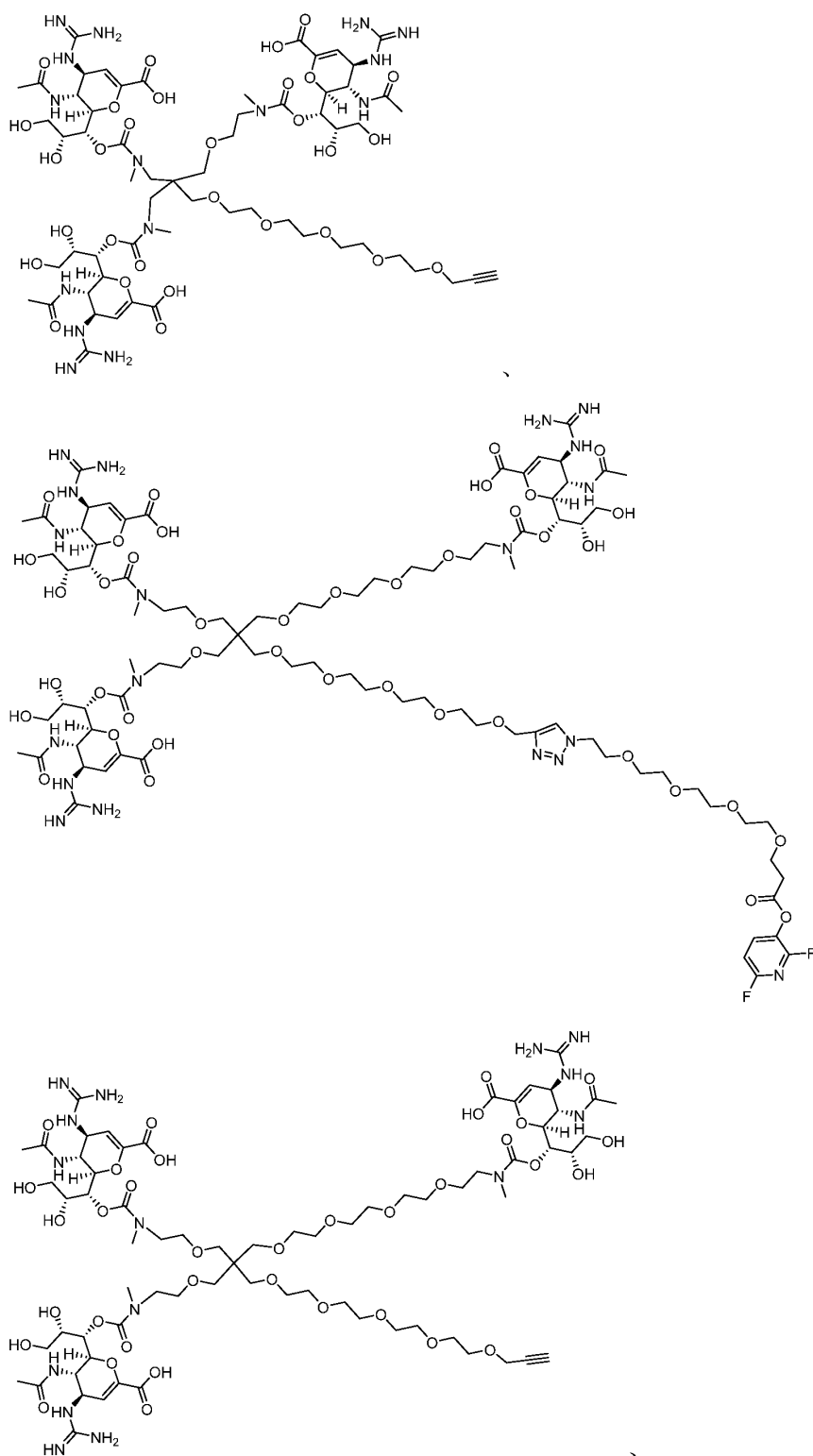
179



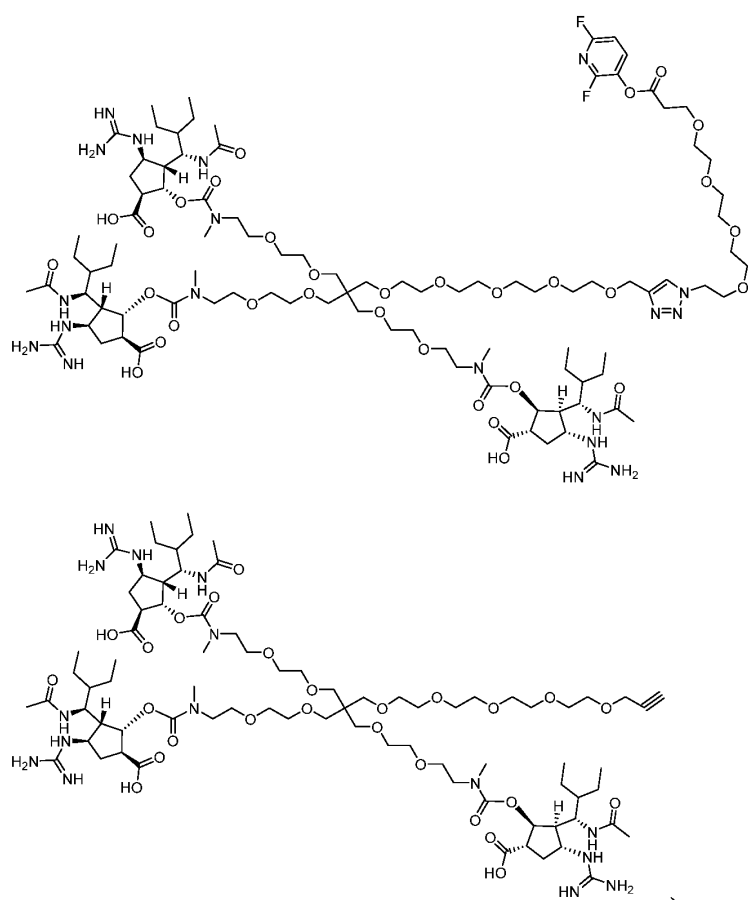
180



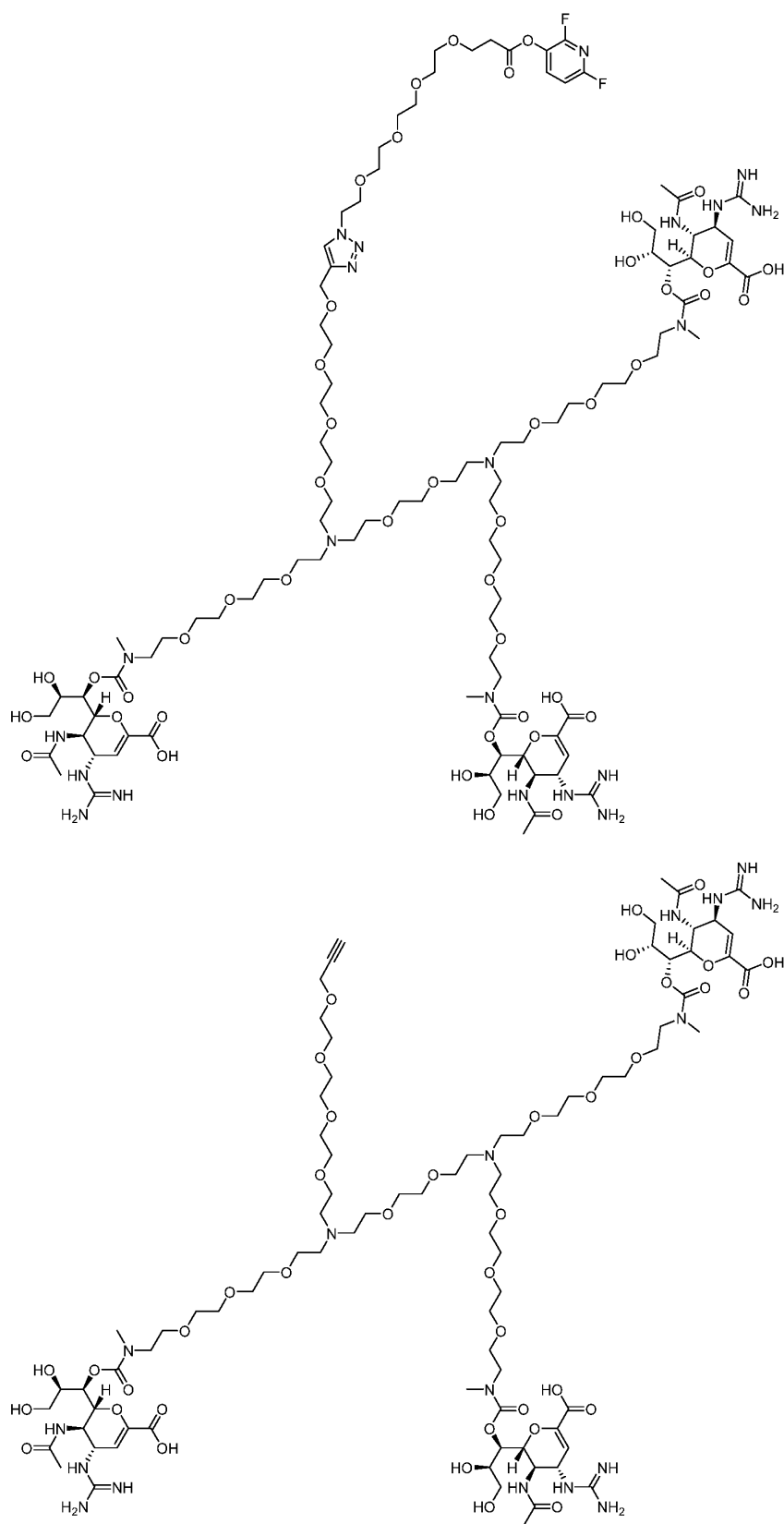


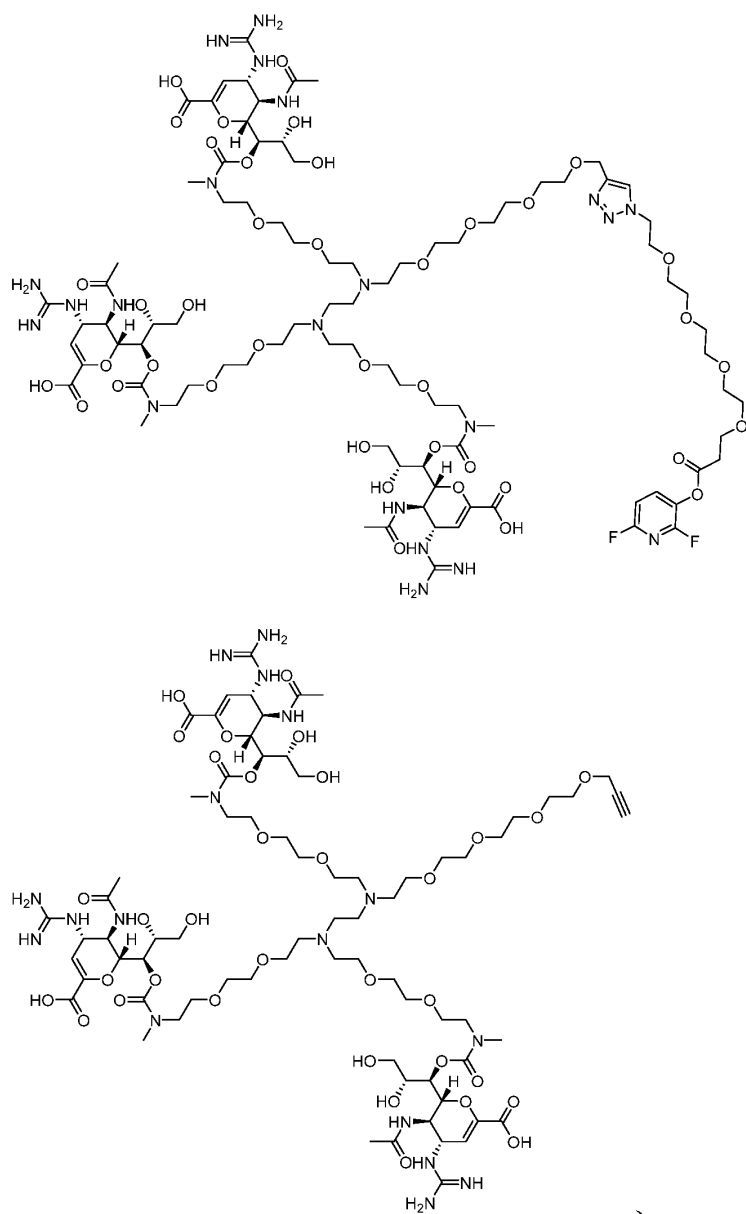


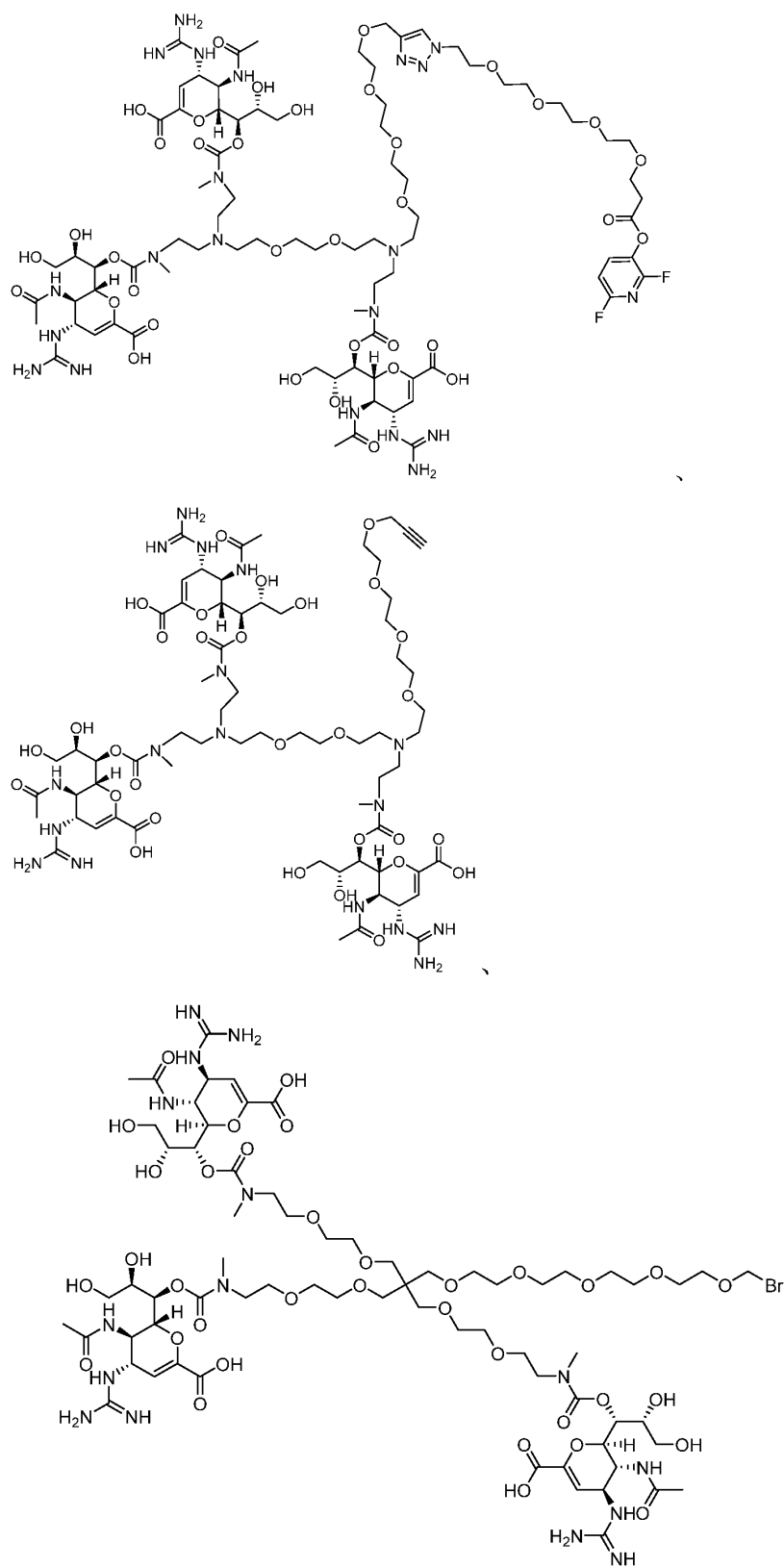
184



185







188

