

新型二糖连接子及其制备方法和用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2024 年 1 月 10 日向中国国家知识产权局提交的第 202410038405.8 号专利申请和 2025 年 01 月 03 日向中国国家知识产权局提交的第 202510013650.8 号专利申请的权益和优先权，在此将它们的全部内容以援引的方式整体并入本文中。

技术领域

本公开涉及药物化学和生物技术药物领域，具体涉及一类新型二糖连接子，利用该类二糖连接子及新型酶得到的非天然糖工程抗体及基于糖基改造的定点定量抗体药物偶联物以及它们的制备方法及其用途。

背景技术

基于抗体的偶联药物是一类利用抗体作为靶向载体，搭载效应载荷，从而实现效应载荷向靶向区域富集的生物技术药物。可搭载的效应载荷包括细胞毒素、放射性同位素、寡核苷酸、免疫调节剂、多肽或蛋白片段等，分别形成抗体-毒素偶联物（如 Trastuzumab deruxtecan）、抗体-放射性同位素偶联物（如 BAY 2315497）、抗体-核酸偶联物（如 AOC 1001）、抗体-免疫调节剂偶联物（如 XMT-2056）、抗体-多肽偶联物（如 AMG 133）。

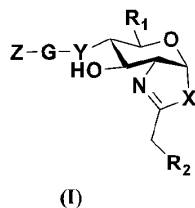
抗体药物偶联物(Antibody-Drug Conjugates, ADCs)是一类由抗体、细胞毒素以及连接子组成的生物技术药物。ADCs 结合了抗体的靶向能力以及细胞毒素的杀伤能力，通过连接子控制细胞毒素释放，实现靶向杀伤肿瘤细胞的目的。相比传统化疗药物，ADCs 具有更低的系统毒性以及更大的治疗窗口；相比传统抗体药物，ADCs 具有更直接且较不依赖免疫系统的肿瘤杀伤能力。目前已上市的 ADCs 主要是依赖抗体天然存在的赖氨酸（如 Trastuzumab emtansine）或半胱氨酸（如 Enfortumab vedotin）。这类使用天然氨基酸随机偶联方法产生的 ADCs 均一性不佳，偶联位点稳定性较差，导致药物安全性较差，治疗窗口较窄。目前，已有多种方法可用于制备定点 ADCs，包括外源半胱氨酸插入技术，非天然氨基酸插入技术，酶催化偶联技术，以及糖基定点偶联技术等。

天然抗体的 Fc 结构域存在一个保守的 N-糖基化位点。利用这一位点，已衍生出多种定点偶联技术。Kathrin Zuberbühler 等人利用高碘酸钠氧化岩藻糖，引入醛基，实现载荷的搭载。Qun Zhou 等人则利用糖基转移酶 beta-1,4-Gal-T1 以及 Sialyltransferase (Sia T) 将抗体处理成末端带有均一唾液酸的抗体，再利用高碘酸钠氧化，引入醛基，实现偶联。利用野生型糖苷内切酶，能够将抗体的 N-糖基化处理成截短且均一的形式，在此基础上，Laixi Wang 等人利用糖苷内切酶的突变体（例如 Endo S D233Q, Endo S2 D184M）能够将带有生物正交反应基团的噁唑啉底物转移至 N-糖末端，后续通过生物正交反应实现载荷偶联。基于糖基截短型抗体，Pradman K. Qasba 利用 beta-1,4-galactosyltransferase1-Y289L 突变体，实现了带有生物正交反应基团的半乳糖及 N-乙酰半乳糖胺的转移，从而实现载荷偶联。黄蔚团队与 Laixi Wang 团队分别报道了利用野生型糖苷内切酶 Endo S 及 Endo S2，以二糖连接子为底物实现糖工程抗体及 ADCs 的制备。目前，可作为二糖连接子进行糖基转移的二糖结构，以及不同酶对于这些二糖底物的转移特异性方面仍有待探索。

发明的详细说明

本公开的目的在于提供一种新的二糖连接子，其能够将小分子药物定点引入抗体中。

第一方面，本公开提供了式(I)所示的二糖连接子

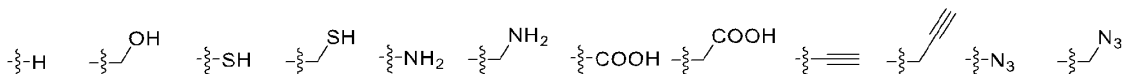


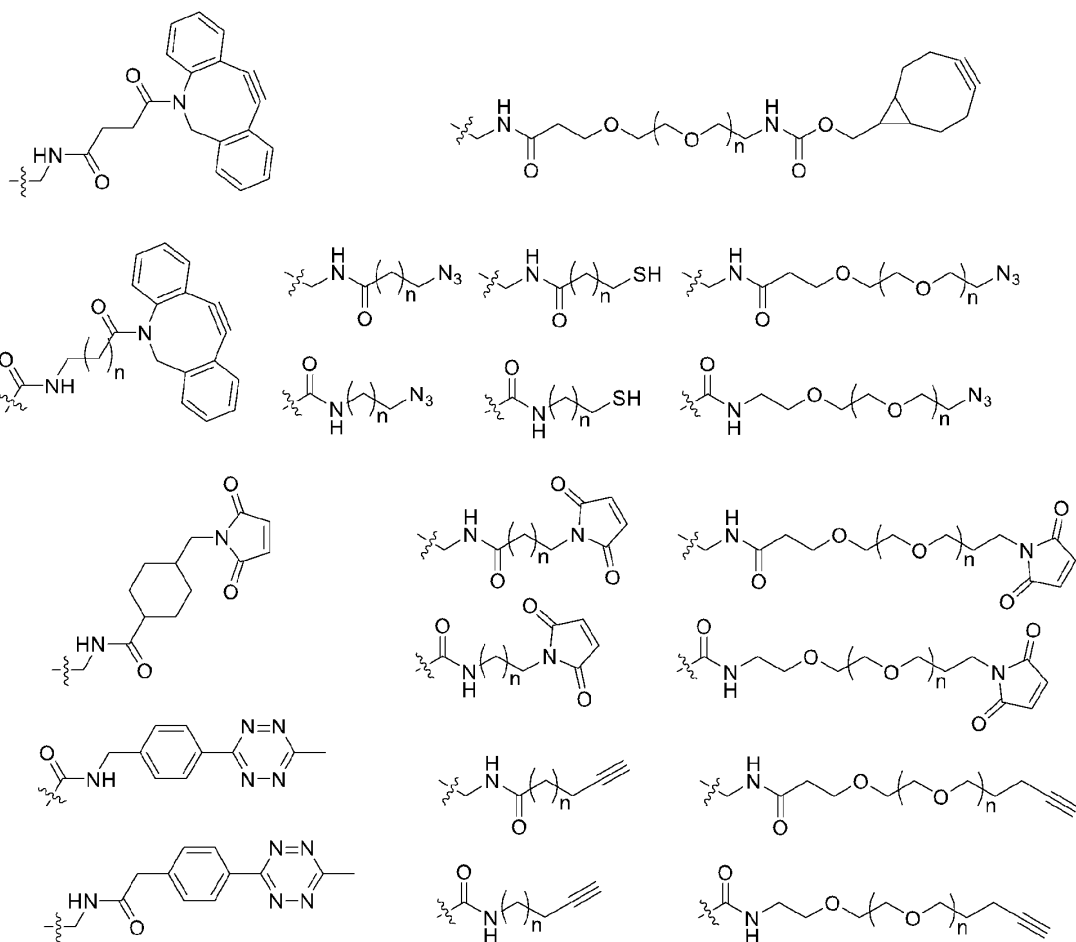
其中，

X 选自氧原子或硫原子；

Y 选自氧原子或硫原子；

R₁选自以下基团：





其中, n 选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数;

R_2 选自以下基团: 氢、 $-N_3$ 、 C_1-C_6 烷基- N_3 、 $-C\equiv CH$ 、 C_1-C_6 烷基- $C\equiv CH$ 、 $-SH$ 、 C_1-C_6 烷基- $-SH$ 、 C_1-C_6 烷基;

G环代表衍生自单糖分子的结构, 其通过硫醚键或糖苷键与单糖连接; 所述单糖分子选自半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖、N-乙酰甘露糖胺、岩藻糖、唾液酸糖; 当Y为硫原子时, G环通过硫

醚键与 R_2 连接, 所述硫醚键为 1,4-硫醚键, 2,4-硫醚键或 3,4-硫醚键; 当Y为氧原子时, G环通过糖苷键与 R_2 连接, 所述糖苷键为 1,4-糖苷键, 2,4-糖苷键或 3,4-糖苷键; 以及

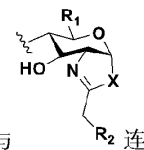
Z选自基团: 氢、含叠氮残基的反应性基团、含环炔残基的反应性基团、含四嗪残基的反应性基团、含链炔残基的反应性基团、含环烯残基的反应性基团、或者含马来酰亚胺残基的反应性基团。

在本公开的一些实施方案中, R_2 选自以下基团: 氢、 $-N_3$ 、 $-CH_2-N_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N_3$ 、 $-C\equiv CH$ 、 $-CH_2-C\equiv CH$ 、 $-CH_2-CH_2-C\equiv CH$ 、 $-SH$ 、 $-CH_2-SH$ 、 $-CH_2-CH_2-SH$ 、 C_1-C_6 烷基。

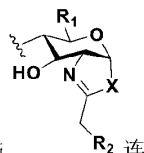
在本公开的一些实施方案中, 表述“G环代表衍生自单糖分子的结构, 其通过硫醚键或糖苷键与单糖连接”意指

G 环代表衍生自单糖分子的结构，其可以通过硫醚键或糖苷键与另外的单糖连接。

Z 选自含叠氮残基的反应性基团、含环炔残基的反应性基团、含四嗪残基的反应性基团、含链炔残基的反应性基团、或者含环烯残基的反应性基团。

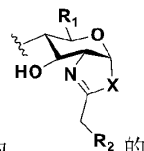


在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，Y 选自氧原子，所述 G 环通过糖苷键与连接，所述糖苷键为 1,4-糖苷键，2,4-糖苷键或 3,4-糖苷键，优选 1,4-糖苷键。



在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，Y 选自硫原子，所述 G 环通过硫醚键与连接，所述硫醚键为 1,4-硫醚键，2,4-硫醚键或 3,4-硫醚键，优选 1,4-硫醚键。

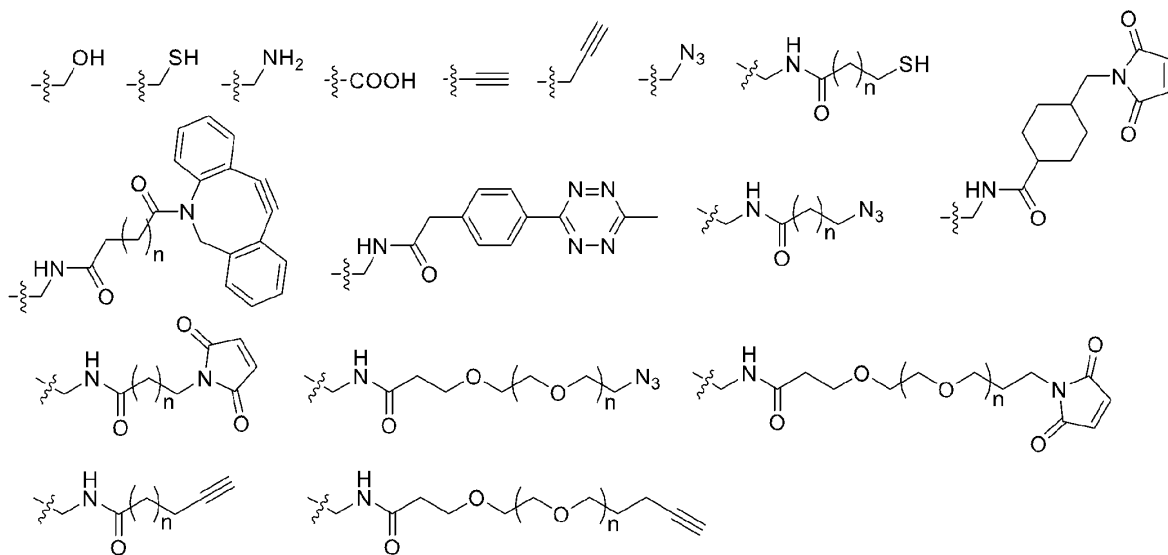
在本公开的一些实施方案中，“G 环代表衍生自单糖分子的结构”意指 G 环可以选自半乳糖基、N-乙酰半乳糖胺基、葡萄糖基、N-乙酰葡萄糖胺基、甘露糖基、N-乙酰甘露糖胺基、岩藻糖基或唾液酸糖基。在本公开的一些实施



方案中，“G 环可以通过硫醚键或糖苷键与另外的单糖连接”意指 G 环可以通过硫醚键或糖苷键与不为另外的单糖连接。

在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，G 环衍生自的单糖分子为半乳糖、葡萄糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰甘露糖胺。

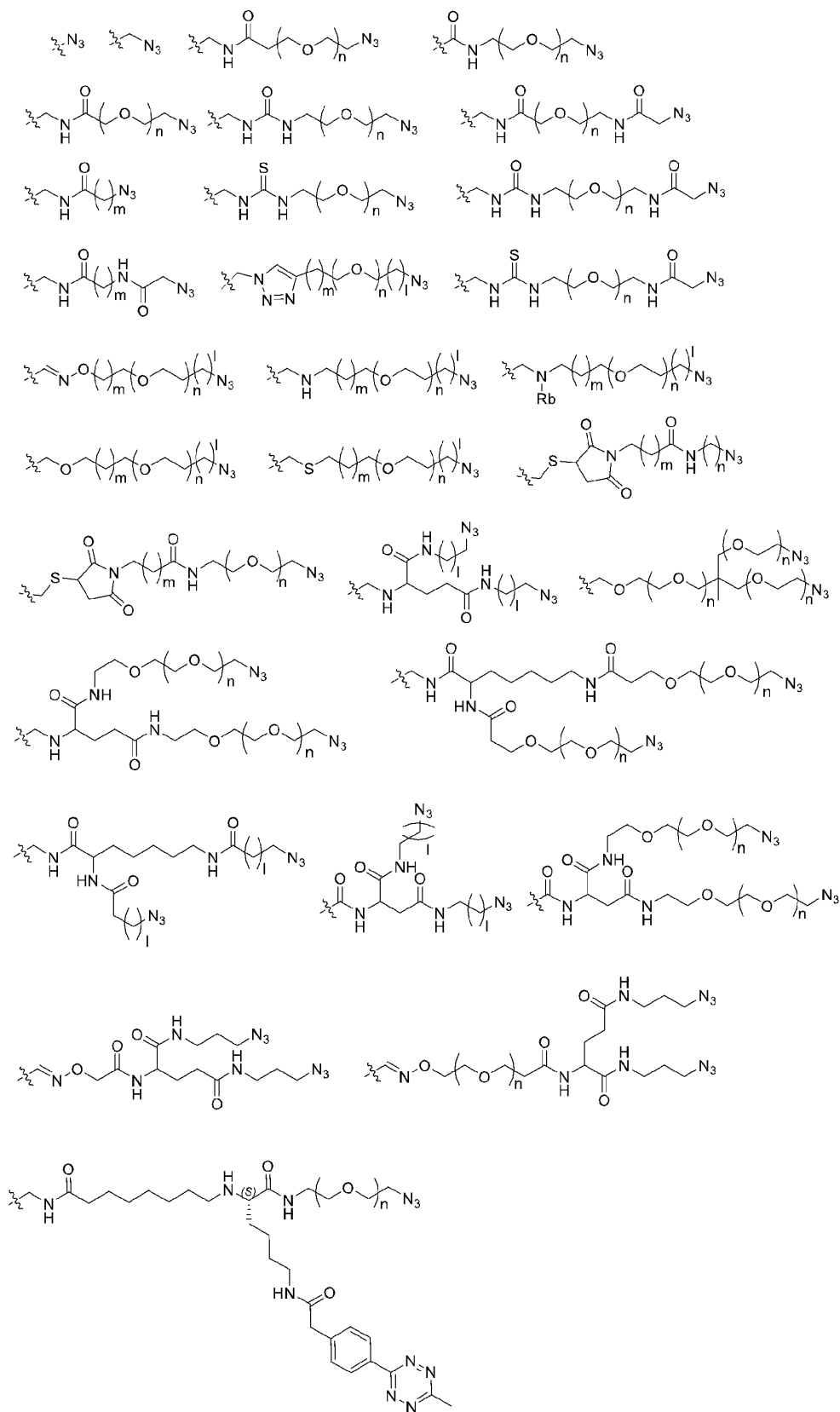
在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，R₁ 选自如下结构：



其中 n 选自 0-30 的整数；或者 0-20 的整数，或者 0-10 的整数。

在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，R₂ 选自氢、-N₃、-CH₂-N₃、-CH₂-CH₂-N₃、-C≡CH、-SH、-CH₃、-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-CH₃。

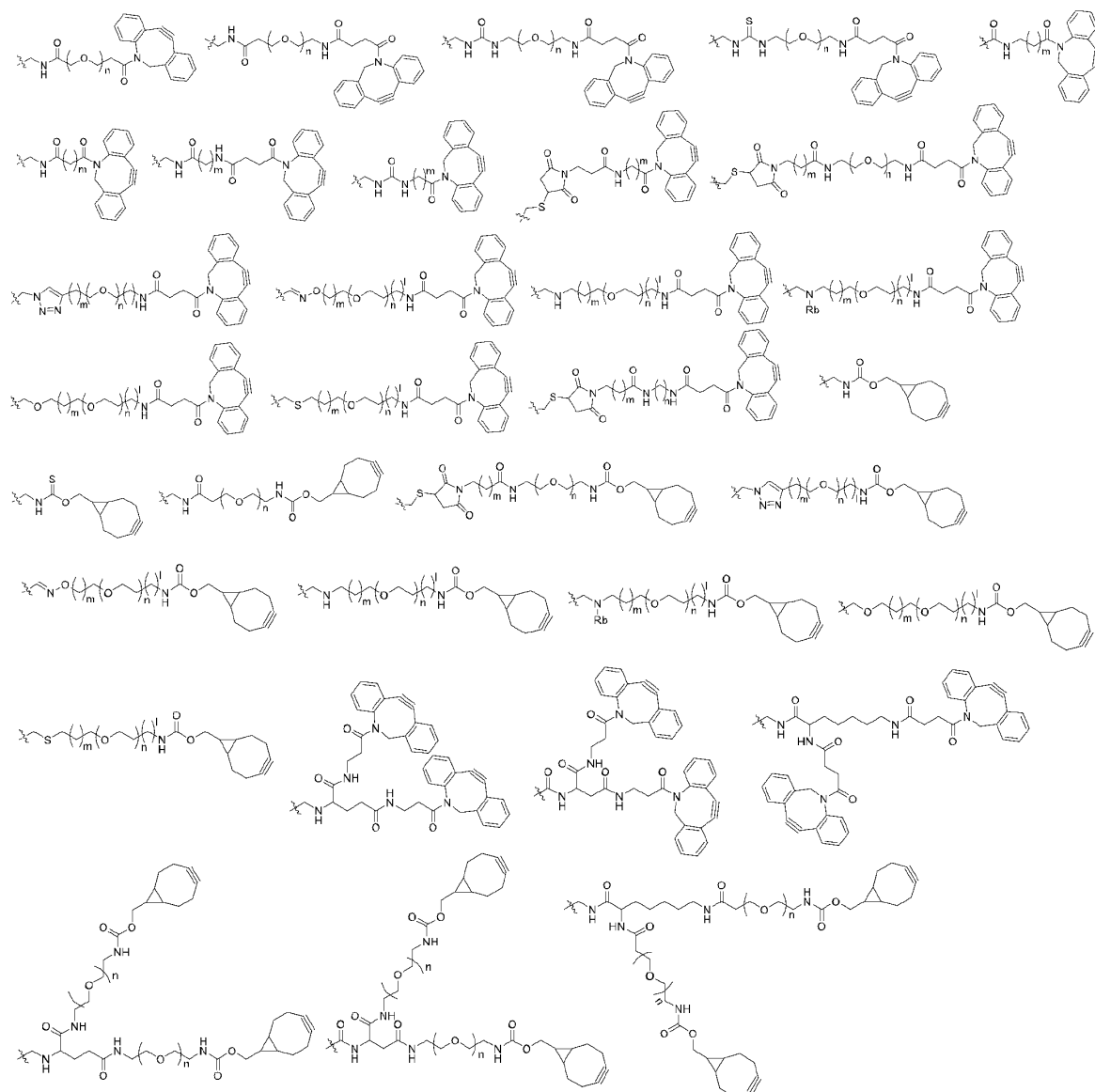
在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，Z 为含叠氮残基的反应性基团时，其选自以下基团：



Rb为氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基。

[illegible]

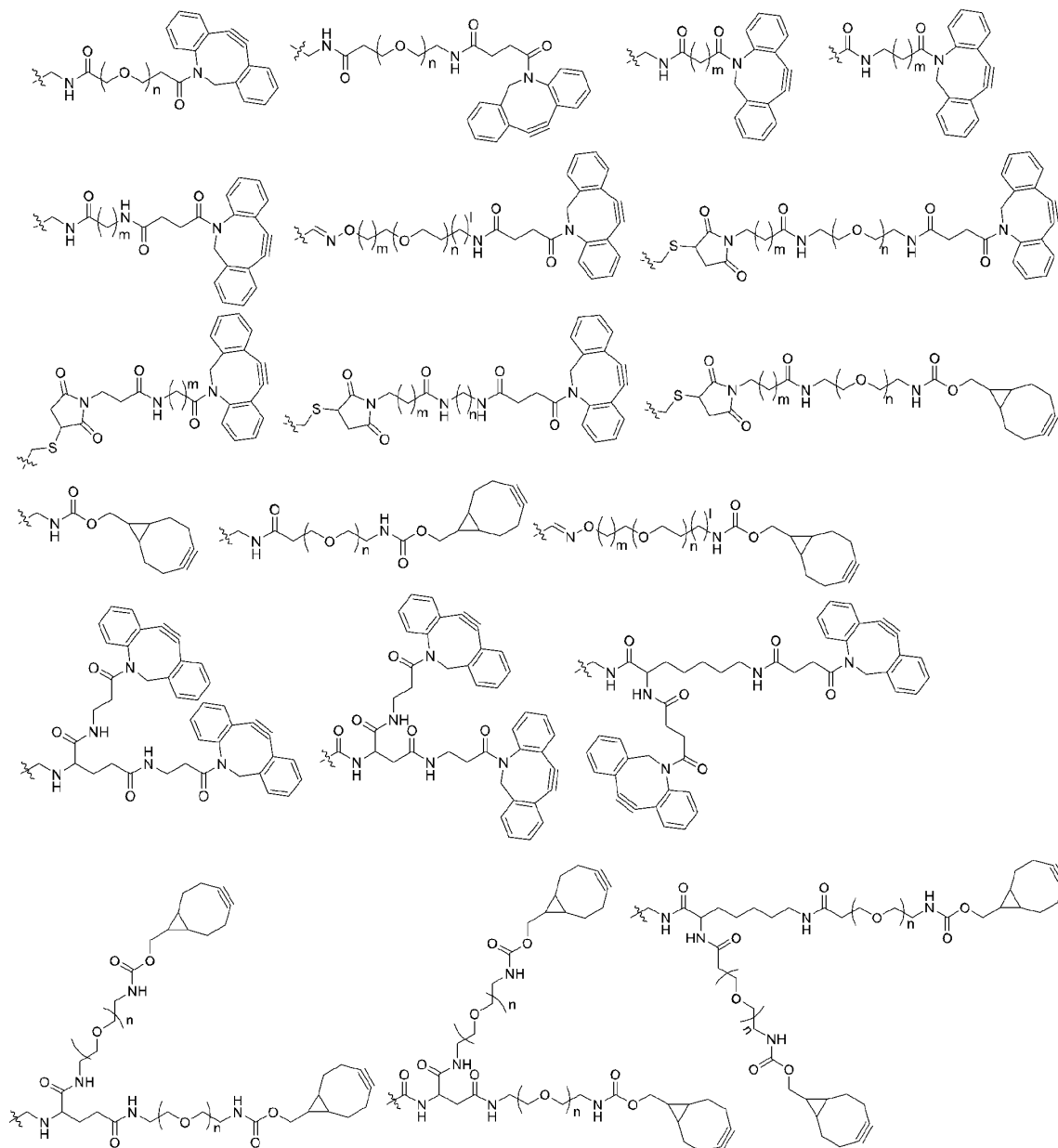
在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，Z为含环炔残基的反应性基团时，其选自以下基团：



其中，n、m、l分别独立选自0-30的整数；或者0-20的整数，或者0-10的整数；

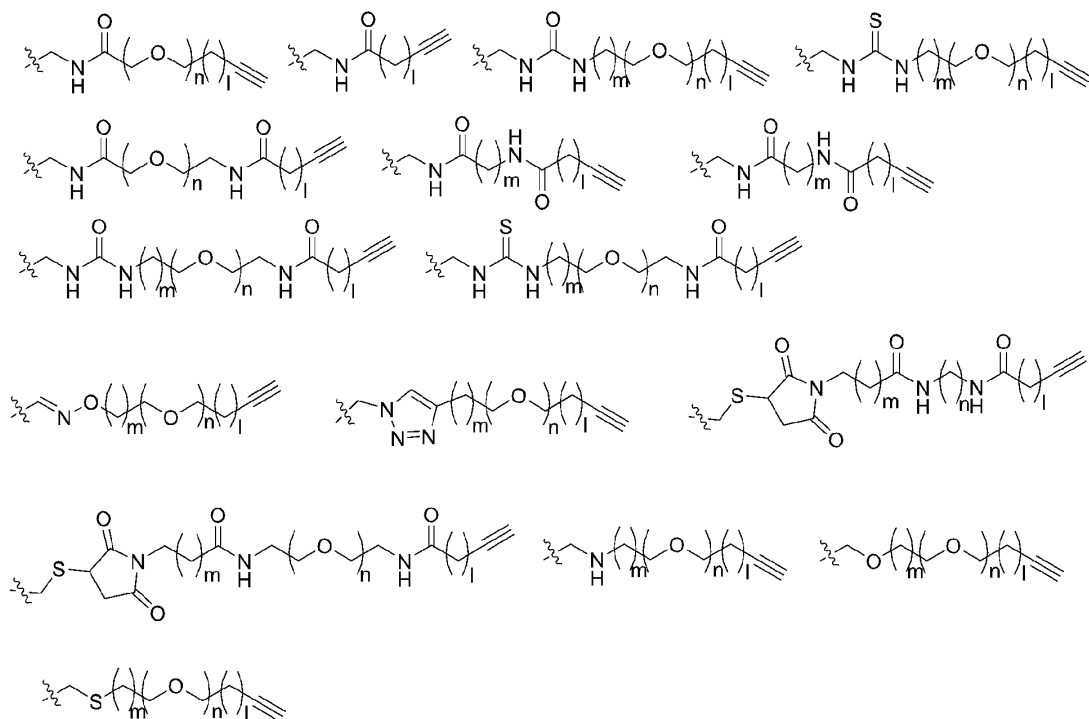
Rb为氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基。

在本公开的一些实施方案中，式(I)所示的二糖连接子中，Z为含环炔残基的反应性基团时，其选自以下基团：



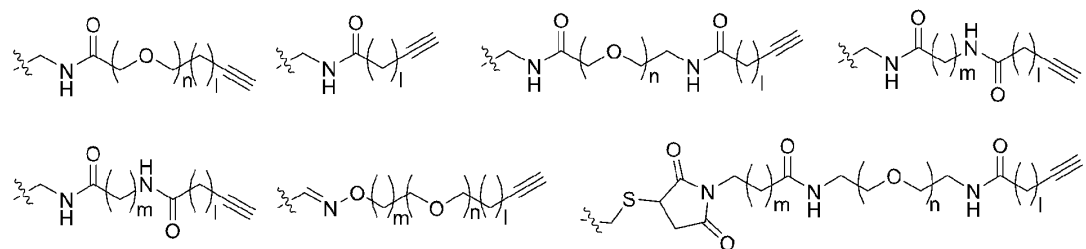
其中, n 、 m 、 l 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数。

在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接子中, Z 为含链炔残基的反应性基团时, 其选自以下基团:



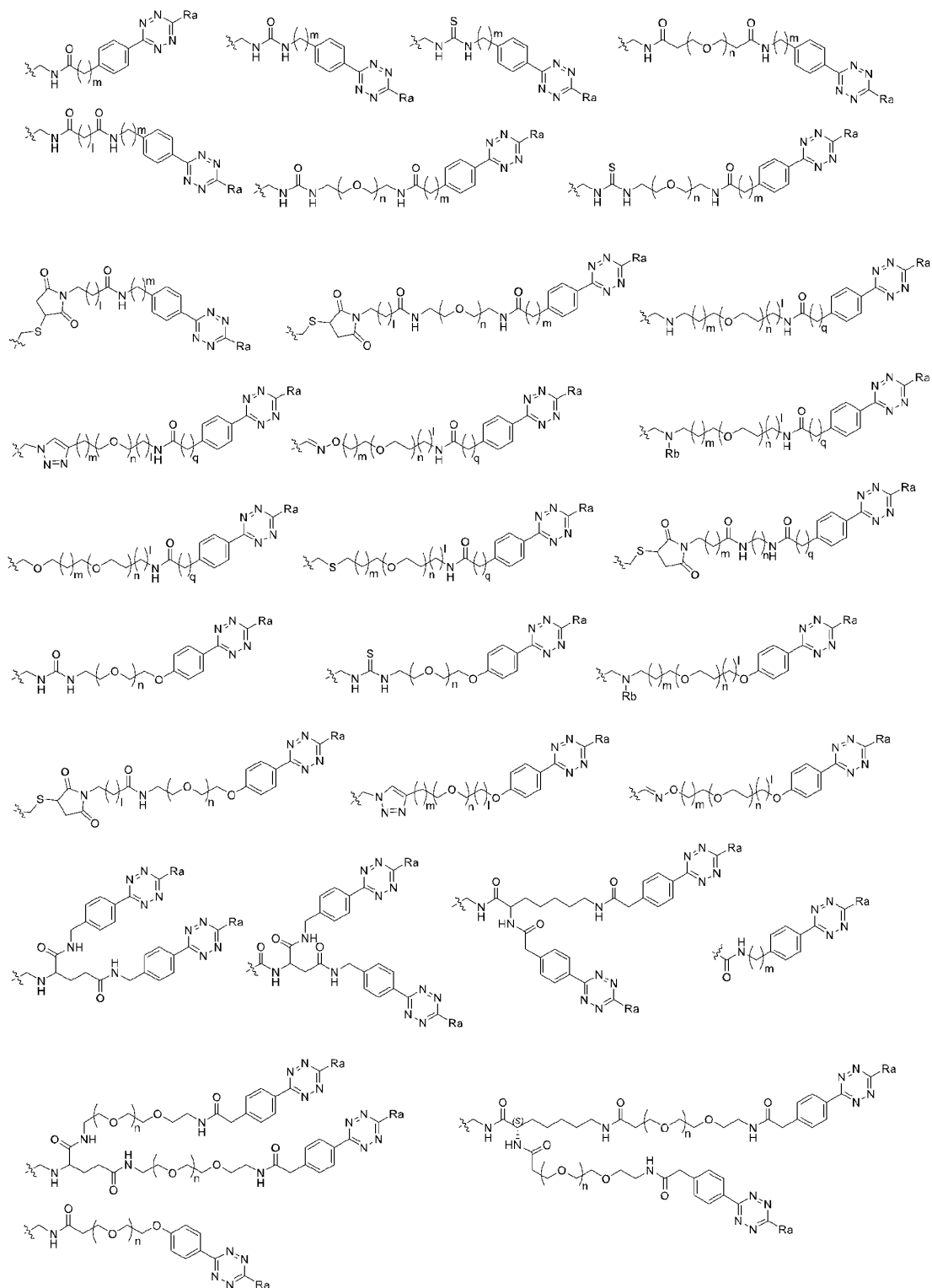
其中, n 、 m 、 l 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数。

在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接器中, Z 为含链炔残基的反应性基团时, 其选自以下基团:



其中, n 、 m 、 l 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数。

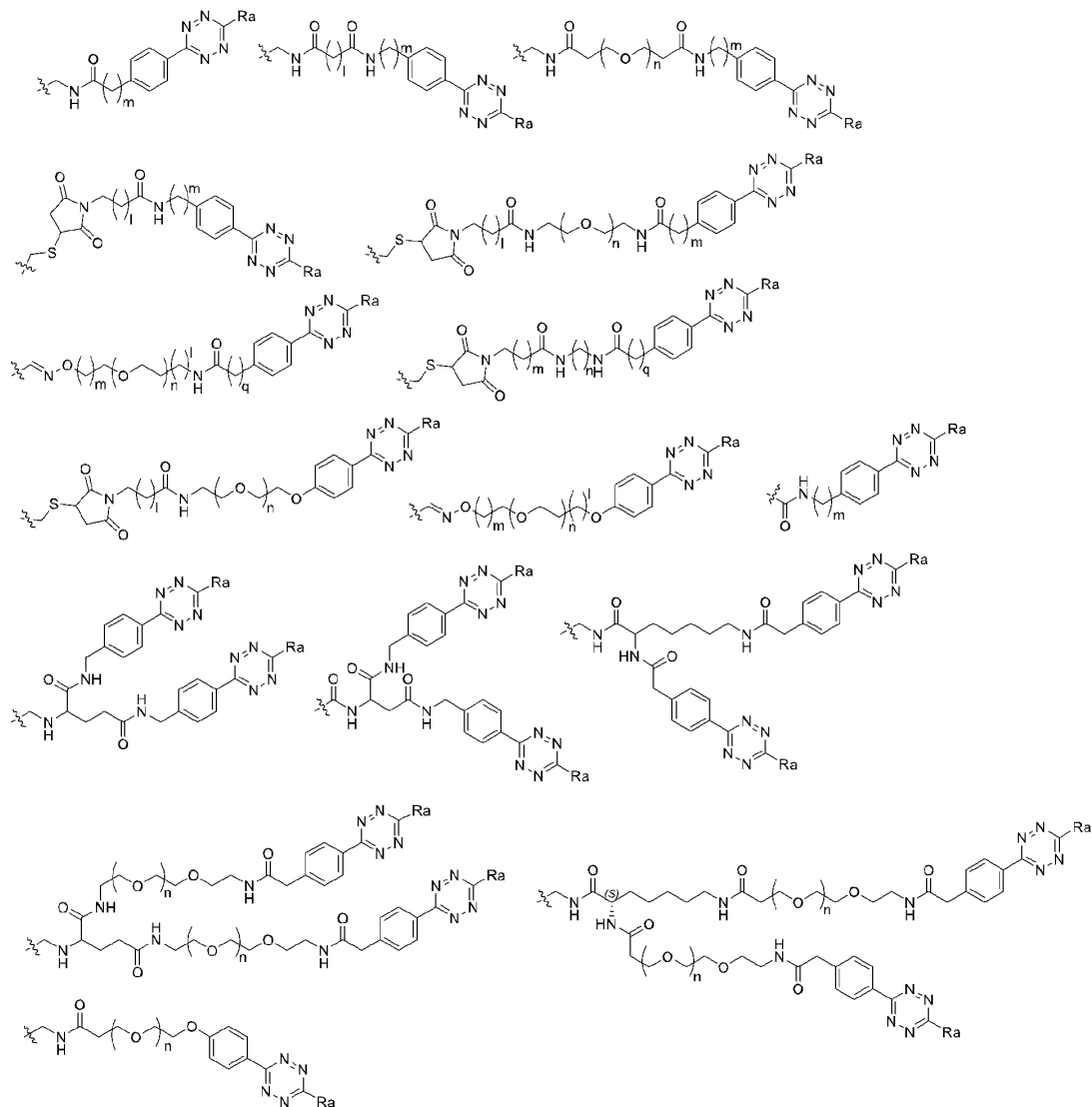
在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接器中, Z 为含四嗪残基的反应性基团时, 其选自以下基团:



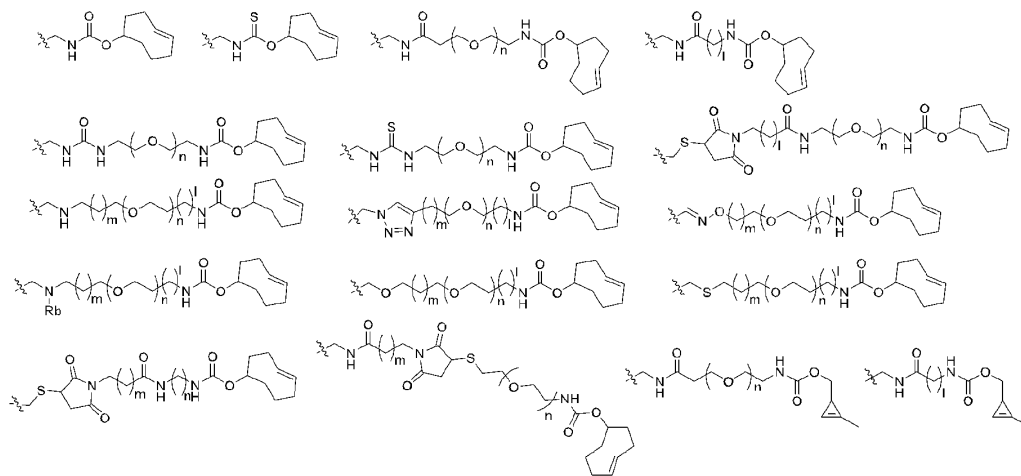
其中, n、m、l、q分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数;

R_a为氢或C₁-C₆烷基; R_b为氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基。

在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接器中, Z为含四嗪残基的反应性基团时, 其选自以下基团:



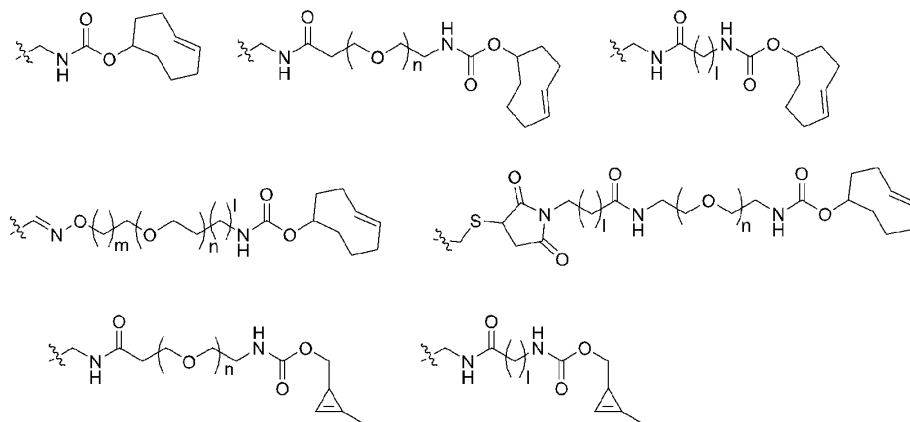
其中, n 、 m 、 l 、 q 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数; R_a 为氢或 C_1 - C_6 烷基。
 在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接器中, Z 为含环烯残基的反应性基团时, 其选自以下基团:



其中, n 、 m 、 l 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数;

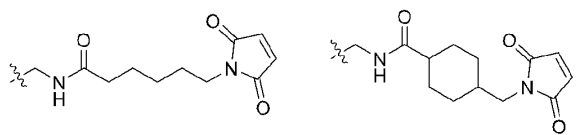
Rb为氢、 C_1 - C_6 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 C_5 - C_{10} 杂芳基。

在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接子中, Z为含环烯残基的反应性基团时, 其选自如下结构:

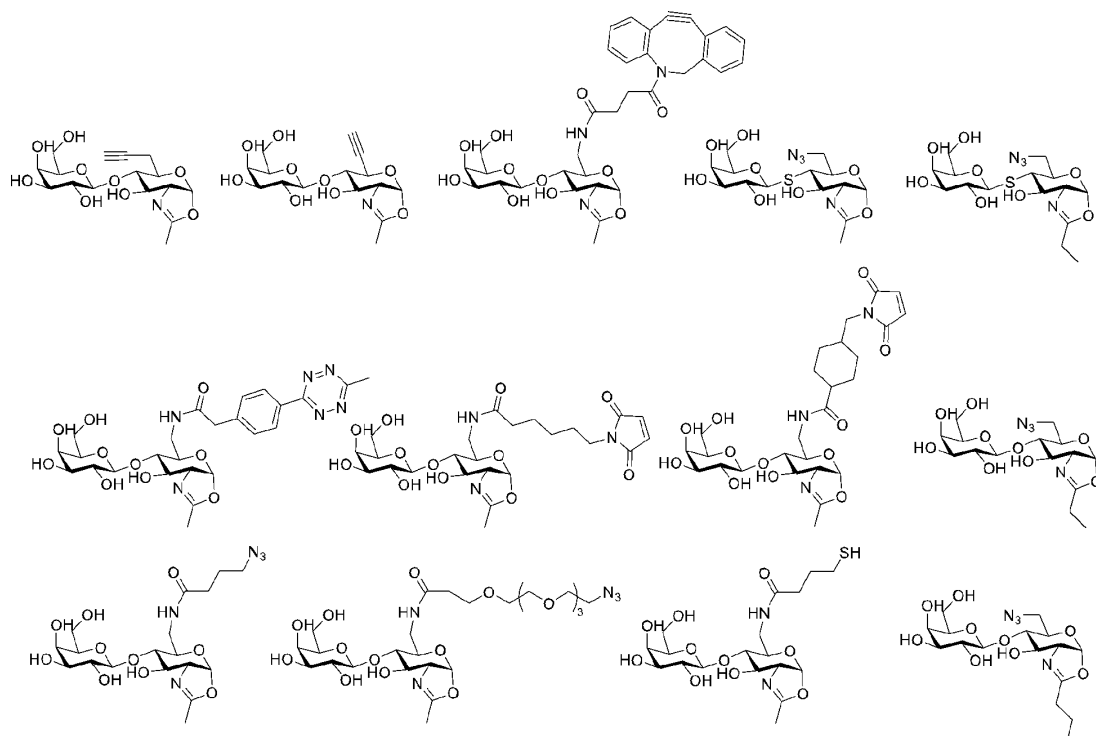


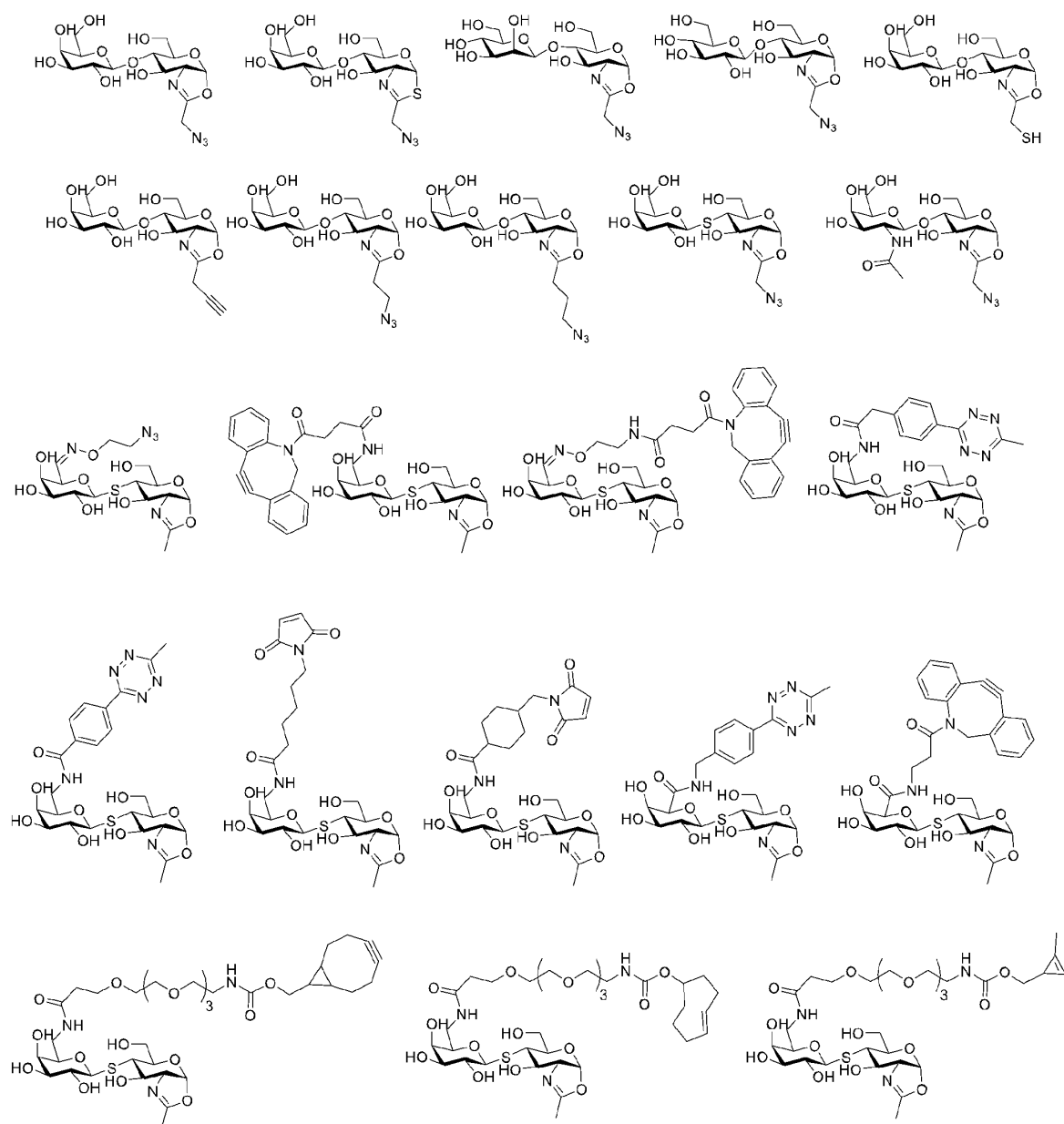
其中, n 、 m 、 l 分别独立选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数。

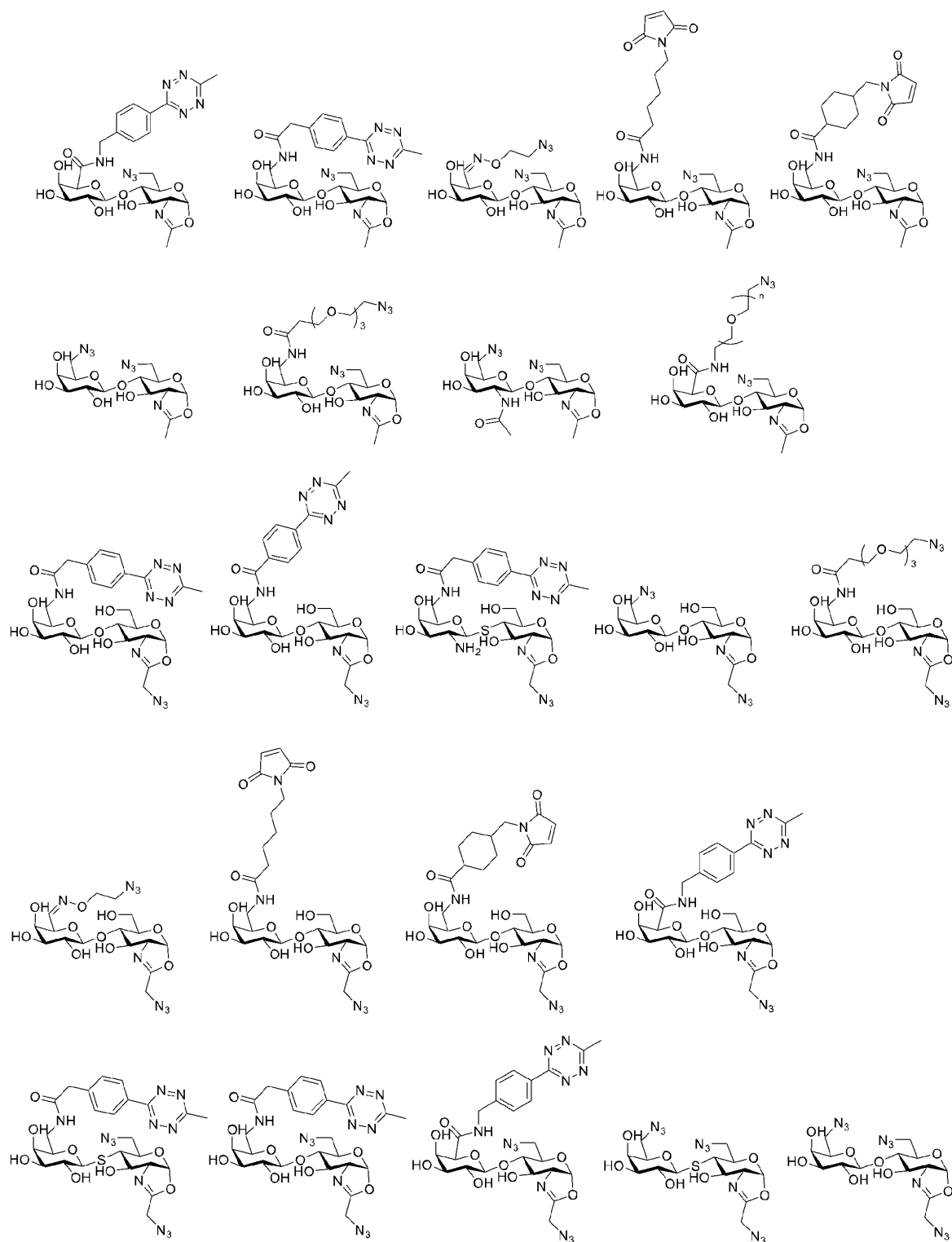
在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接子中, Z为含马来酰亚胺残基的反应性基团时, 其选自以下基团:

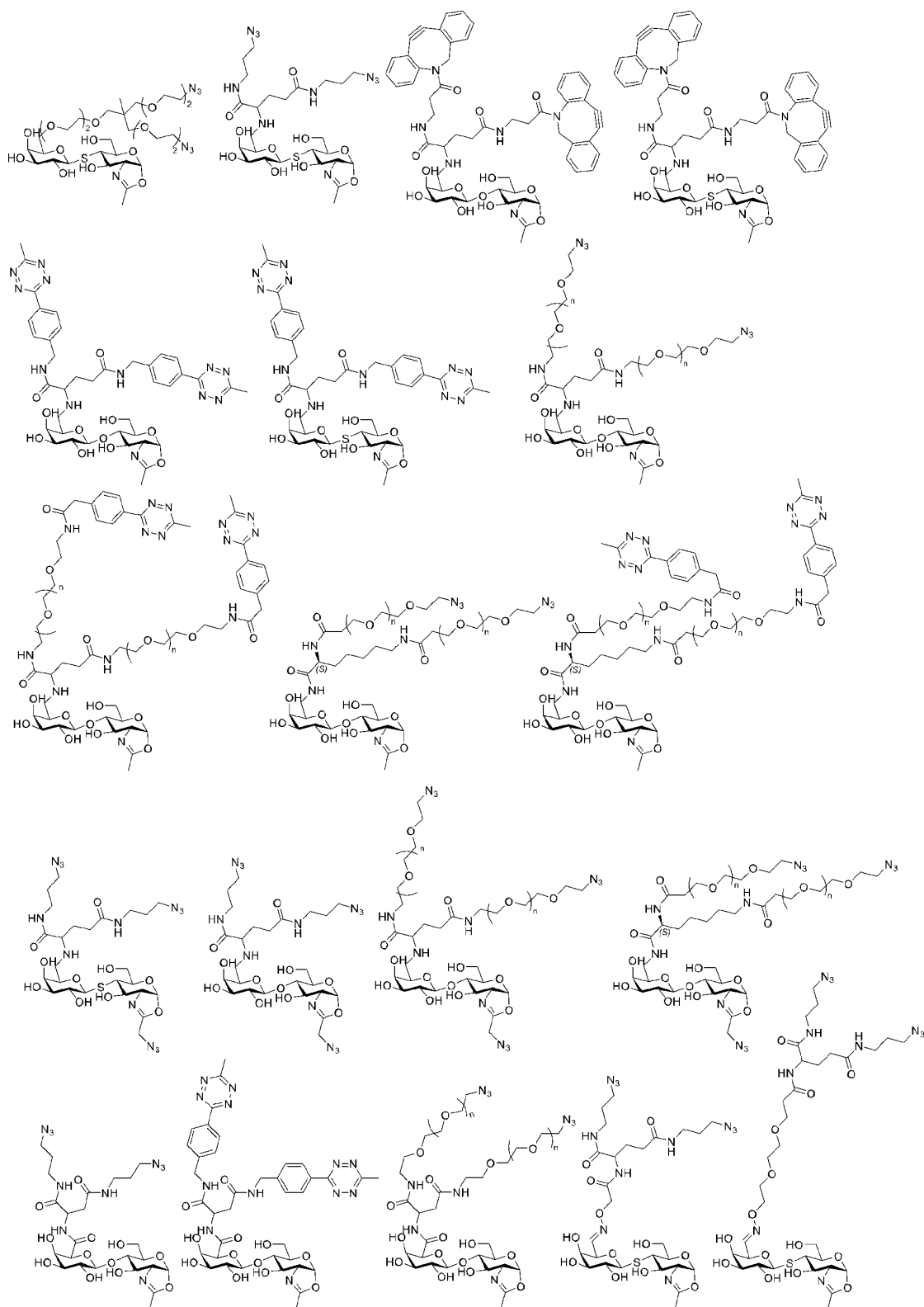


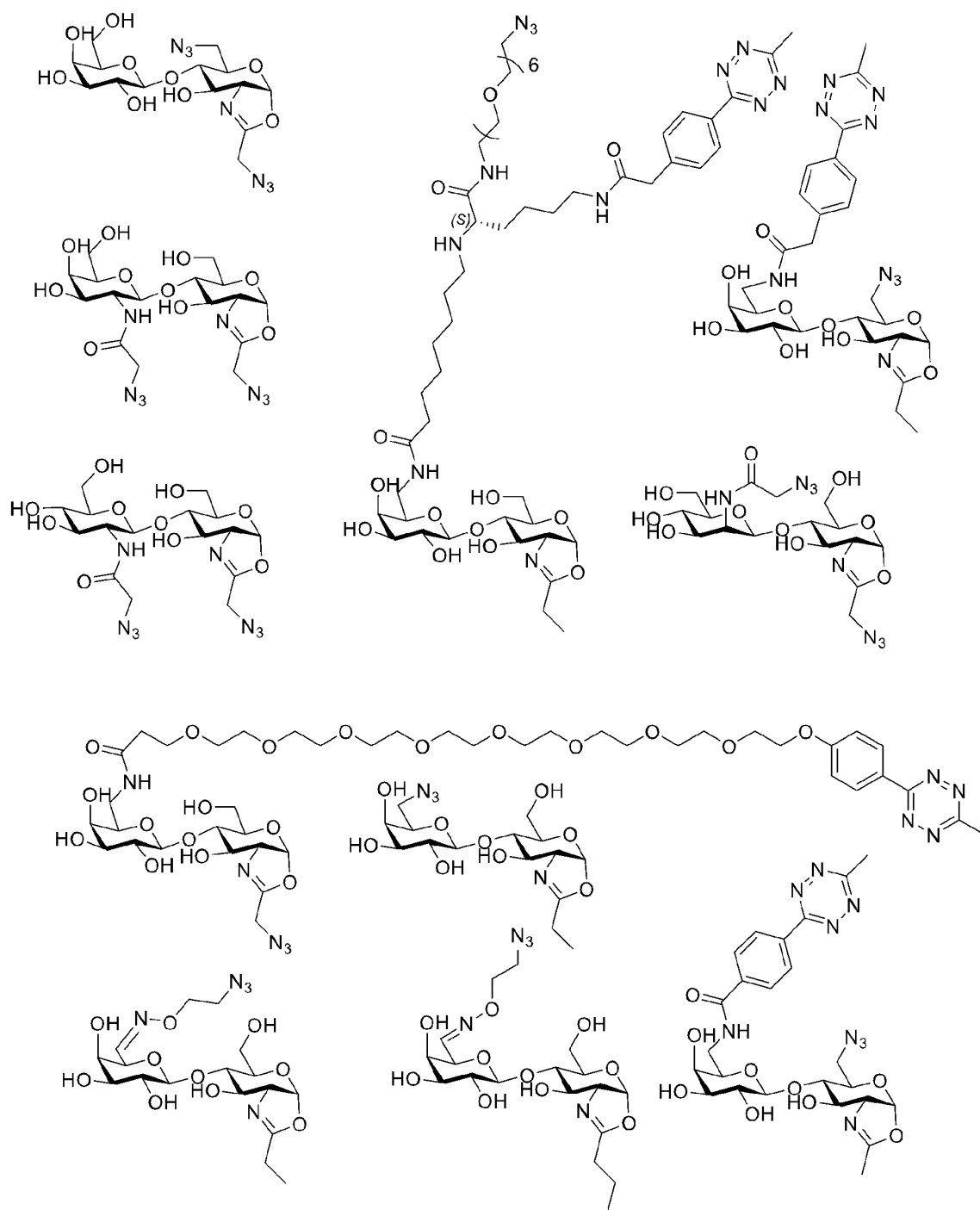
在本公开的一些实施方案中, 式(I)所示的二糖连接子选自以下具体化合物:





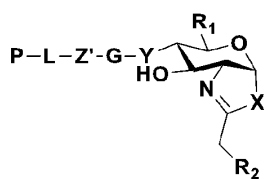






其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

第二方面, 本公开提供一种二糖偶联物, 结构如式(II)表示:



(II)

其中,

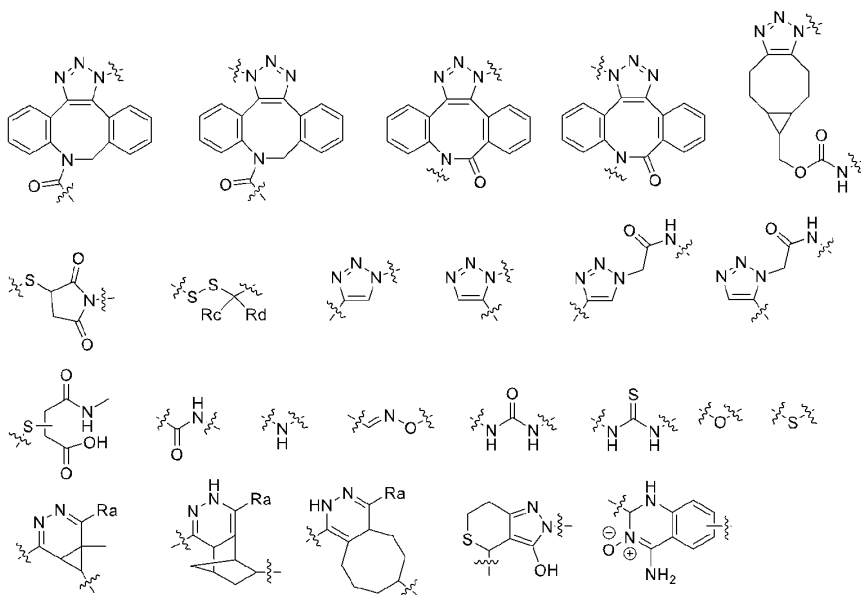
X、Y、R₁、R₂、G 环如上文所定义;

P-L-Z'-表示 G 环上的取代基, P-L-Z'-的取代位置是除了衍生自单糖分子的 G 环的一号位以外的任何位置;

L 为连接 Z' 与 P 的二价连接子或多价连接子, 其包含可裂解连接子、不可裂解连接子或它们的组合;

P 选自细胞毒素、小分子药物、近红外或荧光探针、多肽、RNA 及相关药物、放射性同位素标记、造影剂及核磁共振成像剂; 所述小分子药物优选自美登素、DM-1、DM-4、MMAE、MMAF、Auristatin 0101、SN-38、Dxd、依喜替康、多卡霉素、鹅膏蕈碱、PBD 类、VP-16、喜树碱、紫杉醇、多烯紫杉醇、蒽环类, 以及上述化合物的衍生物, 或者所述小分子药物为放射性治疗剂;

Z' 为连接 L 和 G 环的连接片段, 其独立地为不存在, 或选自由 $-(CH_2)_p-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_p-$ 、 $-(\text{苯基})_p-$ 和以下基团组成的群组中的一种或者两种或更多种的任意组合:



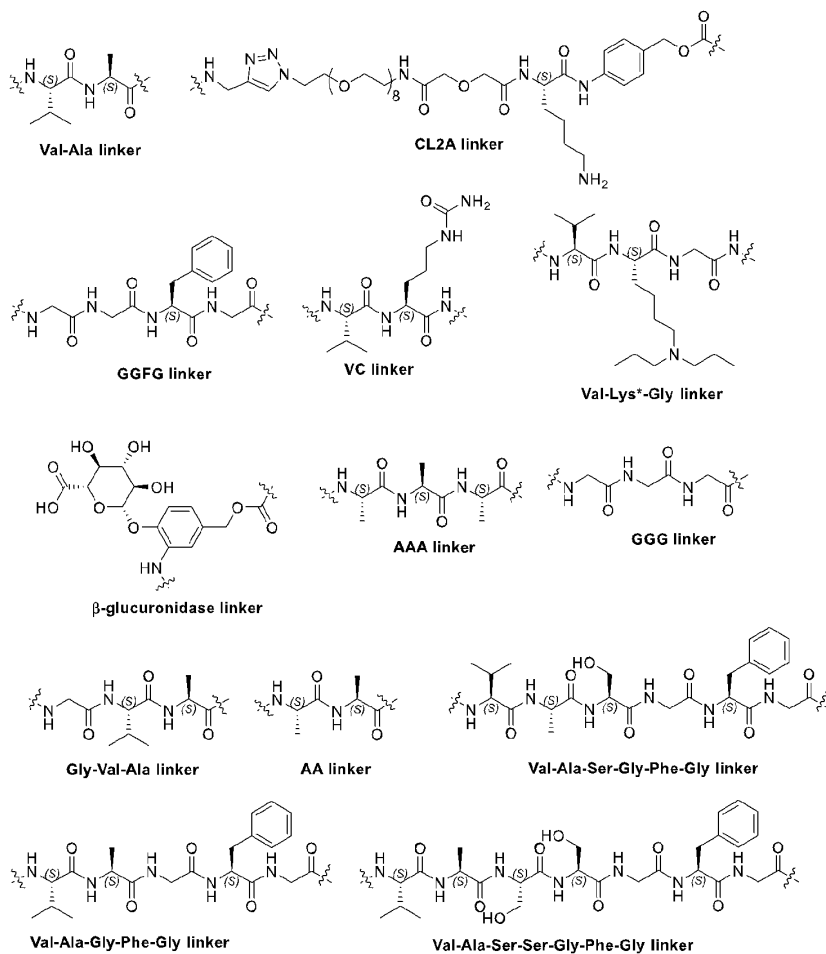
其中, Ra、Rc、Rd 分别选自氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基; 以及各个 p 为 1 至 5 的整数, 例如, 1、2、3、4 和 5。

在本公开的一些实施方案中, 式(II)所示的二糖偶联物中, Z' 为连接 L 和 G 环的连接片段, 其独立地为不存在或 $-(CH_2)_p-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_p-$, 其中 p 为 1 至 5 的整数, 或包含上文列举的具体基团。

在本公开的一些实施方案中, 式(II)所示的二糖偶联物中, L 选自或包含以下一个或多个的组合: Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala、Val-Lys-Ala、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly。

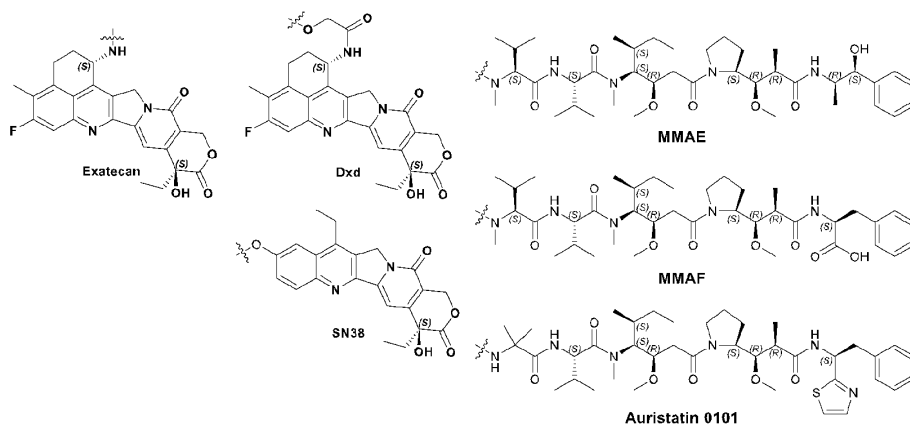
在本公开的一些实施方案中, 式(II)所示的二糖偶联物中, L 选自或包含以下一个或多个的组合: Val-Cit、Val-Ala、Ala-Ala 和 Gly-Gly-Phe-Gly。

在本公开的一些实施方案中, 式(II)所示的二糖偶联物中, L 选自或包含如下可裂解连接子中的一个或多个的组合:

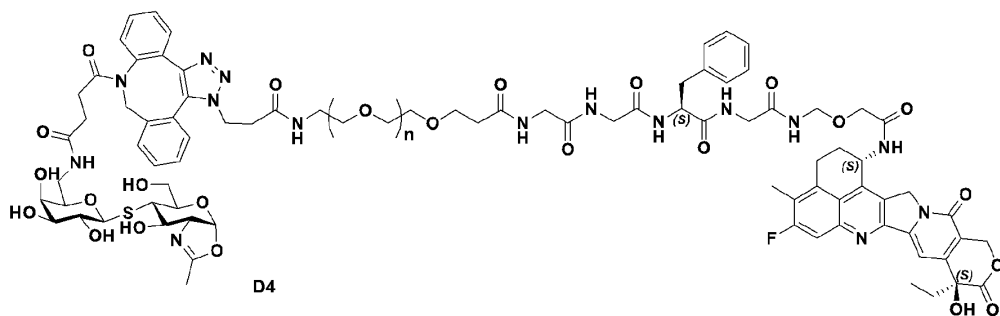
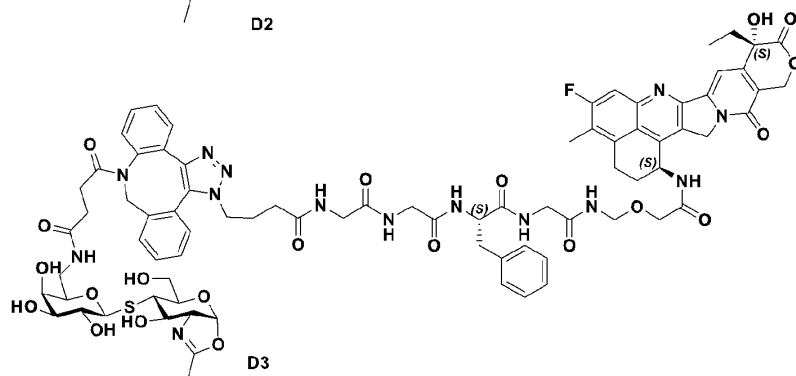
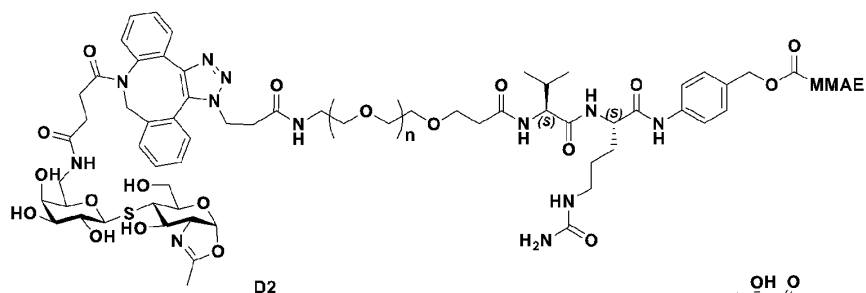
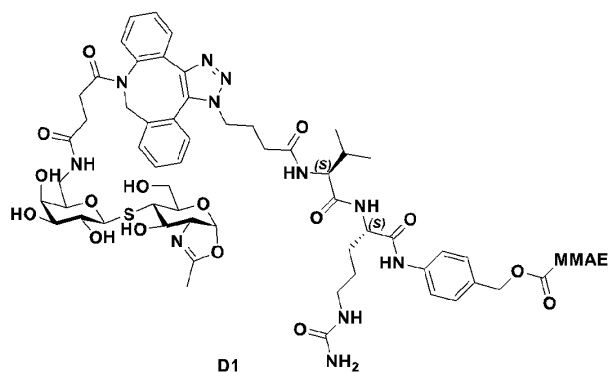


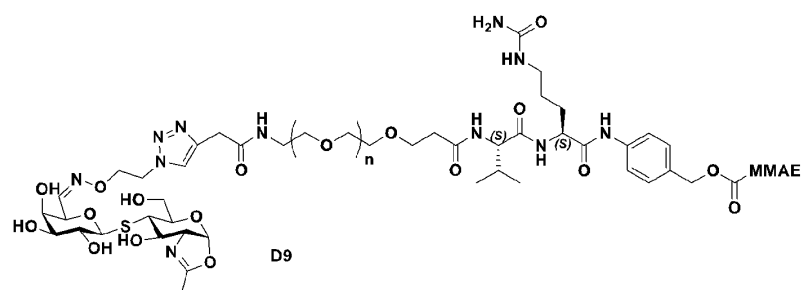
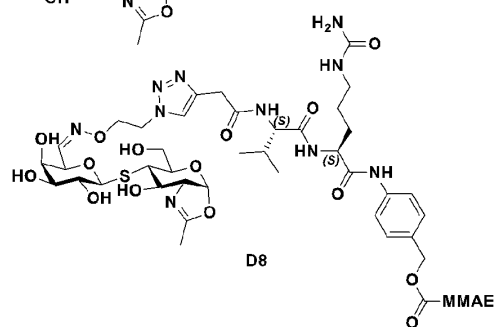
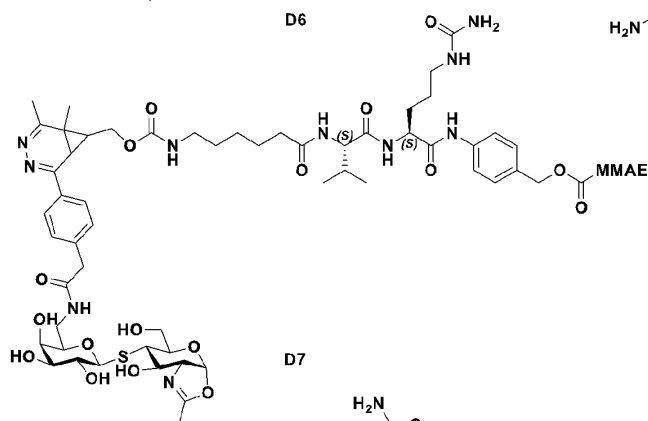
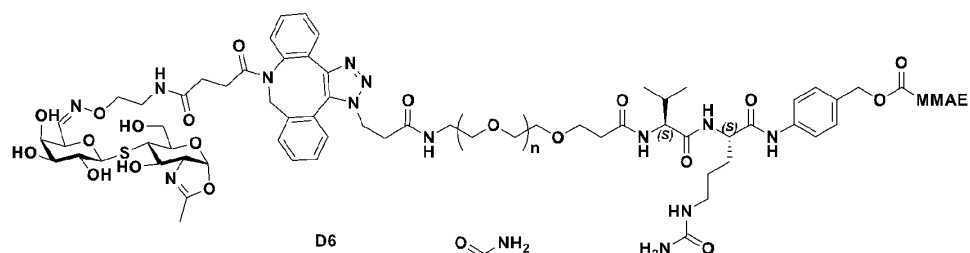
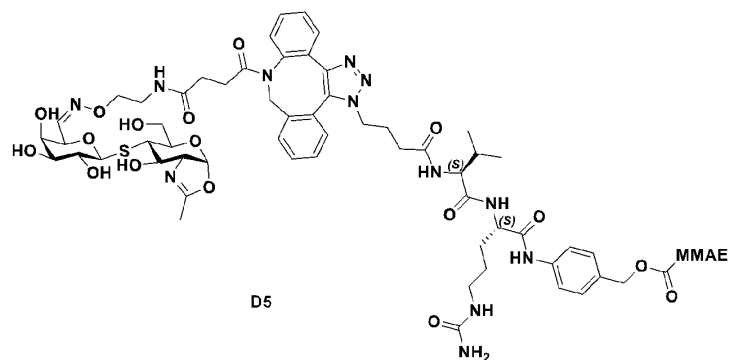
在本公开的一些实施方案中，式(II)所示的二糖偶联物中，L 选自或包含以下一个或多个不可裂解连接子的组合： $-(CH_2)_m-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_m-$ 、 $-(PO_4)_n-$ ，其中 m 和 n 分别独立地选自 0-30 的整数，或者 0-20 的整数，或者 0-10 的整数。

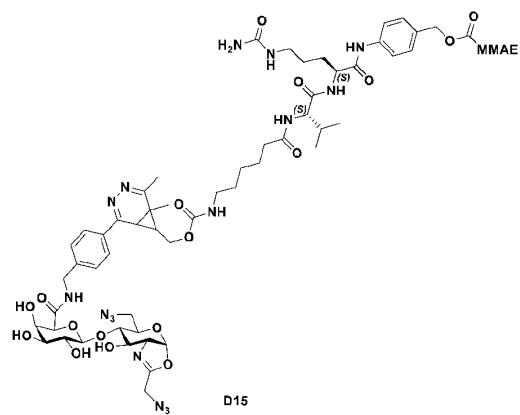
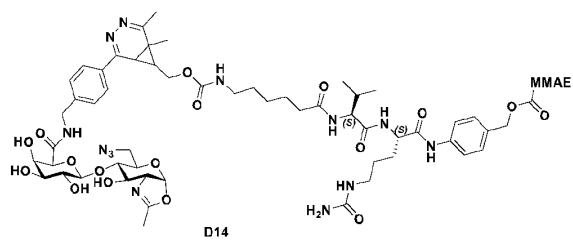
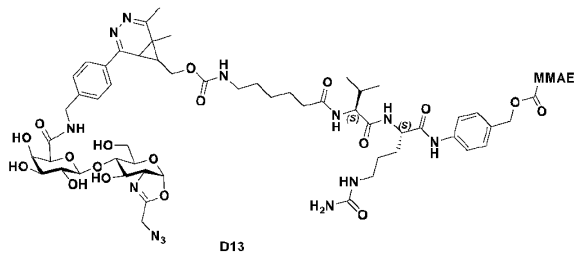
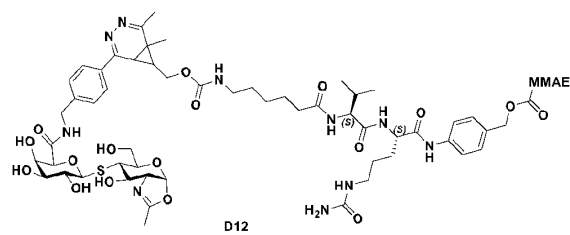
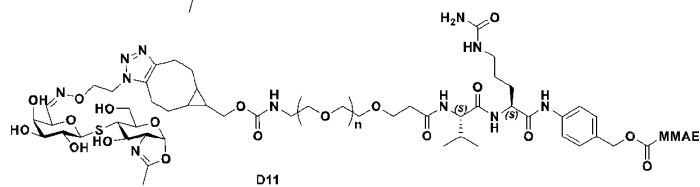
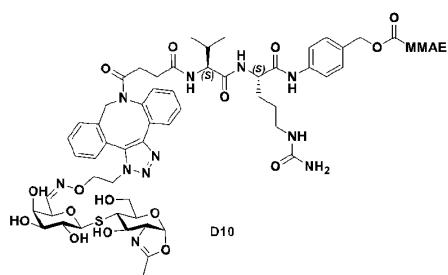
在本公开的一些实施方案中，式(II)所示的二糖偶联物中，P 为毒素时，其选自以下基团：

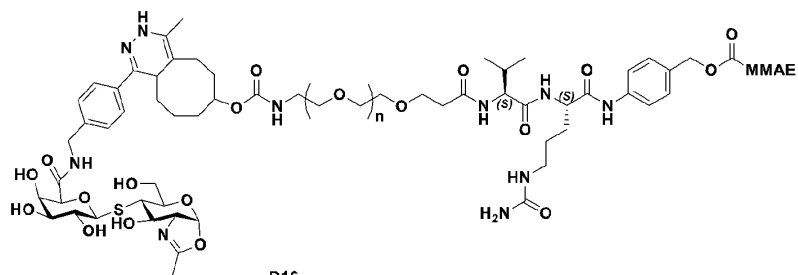


在本公开的一些实施方案中，式(II)所示的二糖偶联物选自以下具体化合物：

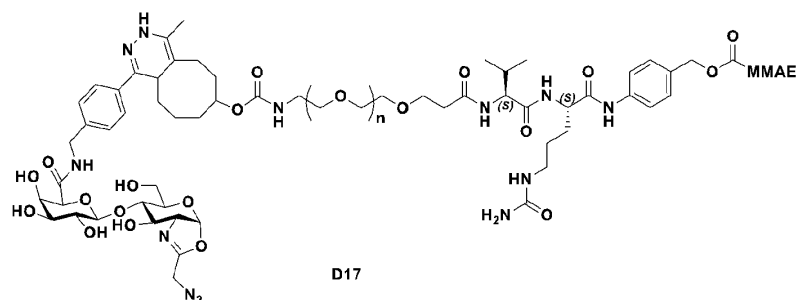




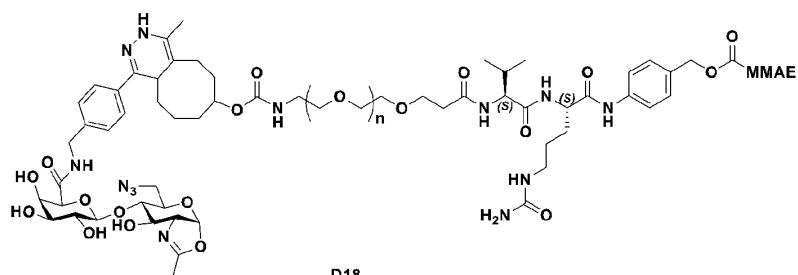




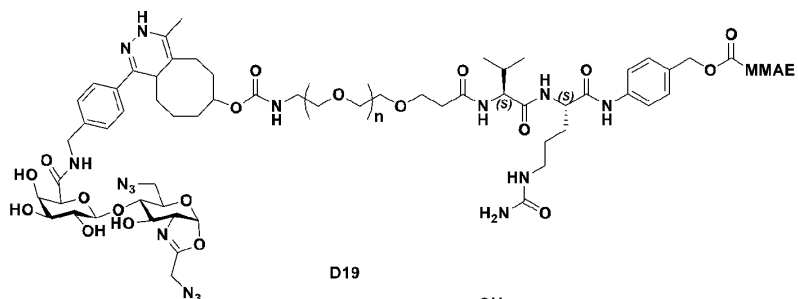
D16



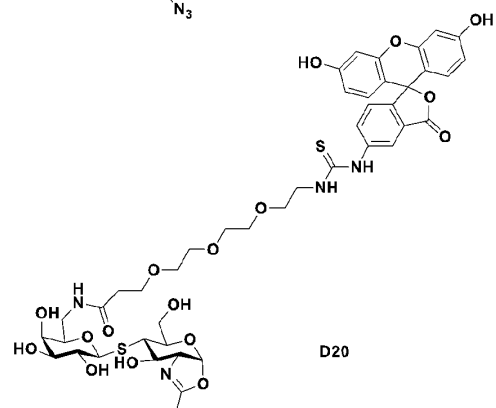
D17



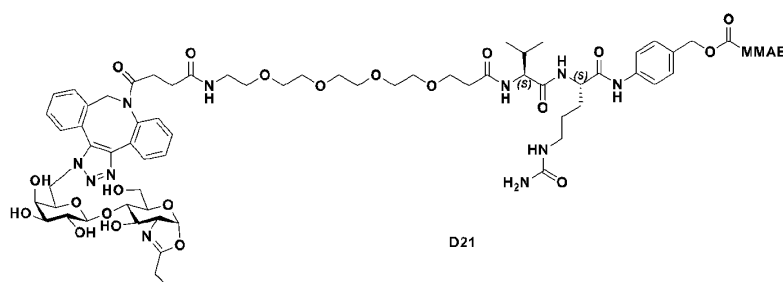
D18



D19

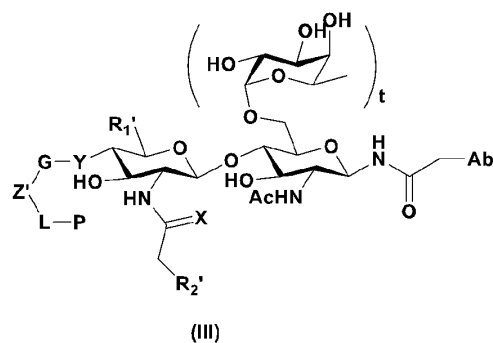


D20



其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

第三方面, 本公开提供一种基于抗体的偶联药物, 如下式(III)所示:

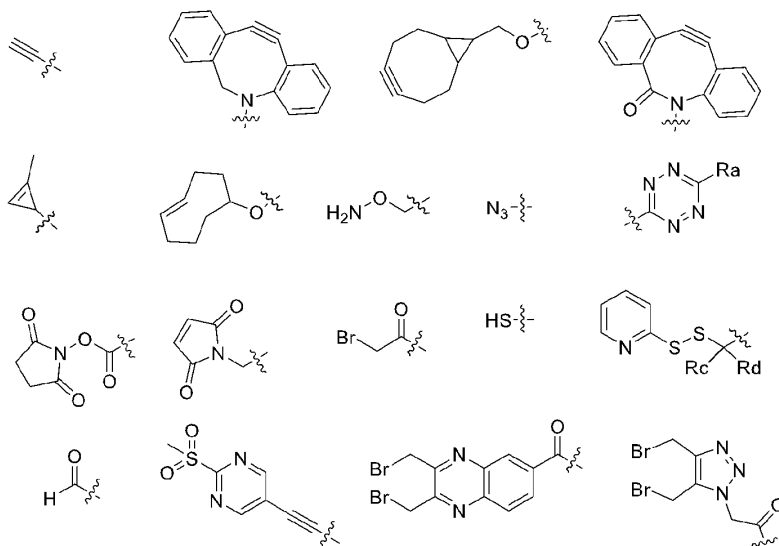


其中, X、Y、G 环如上文所定义:

Z'、L、P 如上文所定义, 或者 P-L-Z'-为氢;

t 选自 0 或 1;

R_1' 选自 R_1 或 R_1 与药物连接器 E-L-P 反应后产生的基团, R_2' 选自 R_2 或 R_2 与药物连接器 E-L-P 反应后产生的基团; 其中, 所述 R_1 、 R_2 如上文所定义; 所述药物连接器 E-L-P 中, L 和 P 如上文所定义以及 E 包含以下基团:



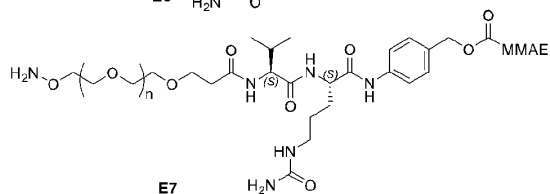
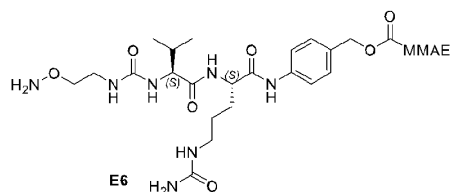
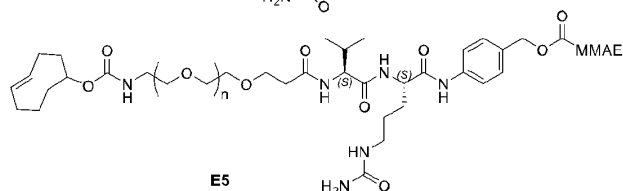
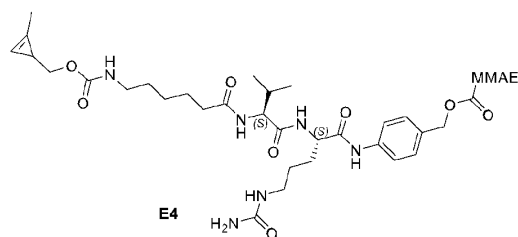
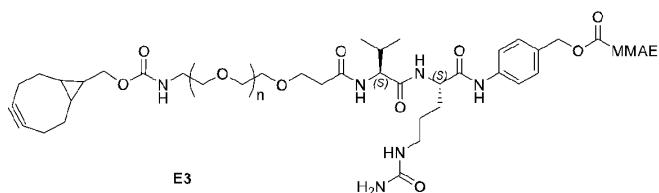
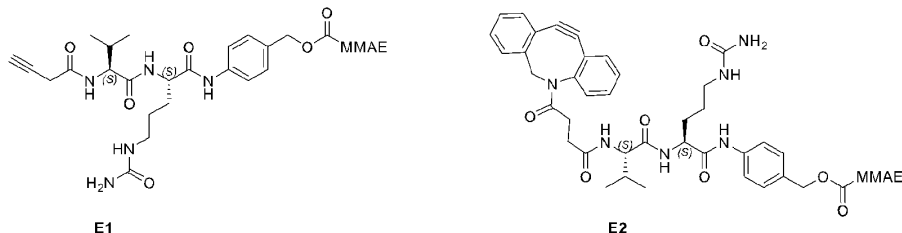
其中, Ra、Rc、Rd 分别独立选自氢、 C_1 - C_6 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 C_5 - C_{10} 杂芳基;

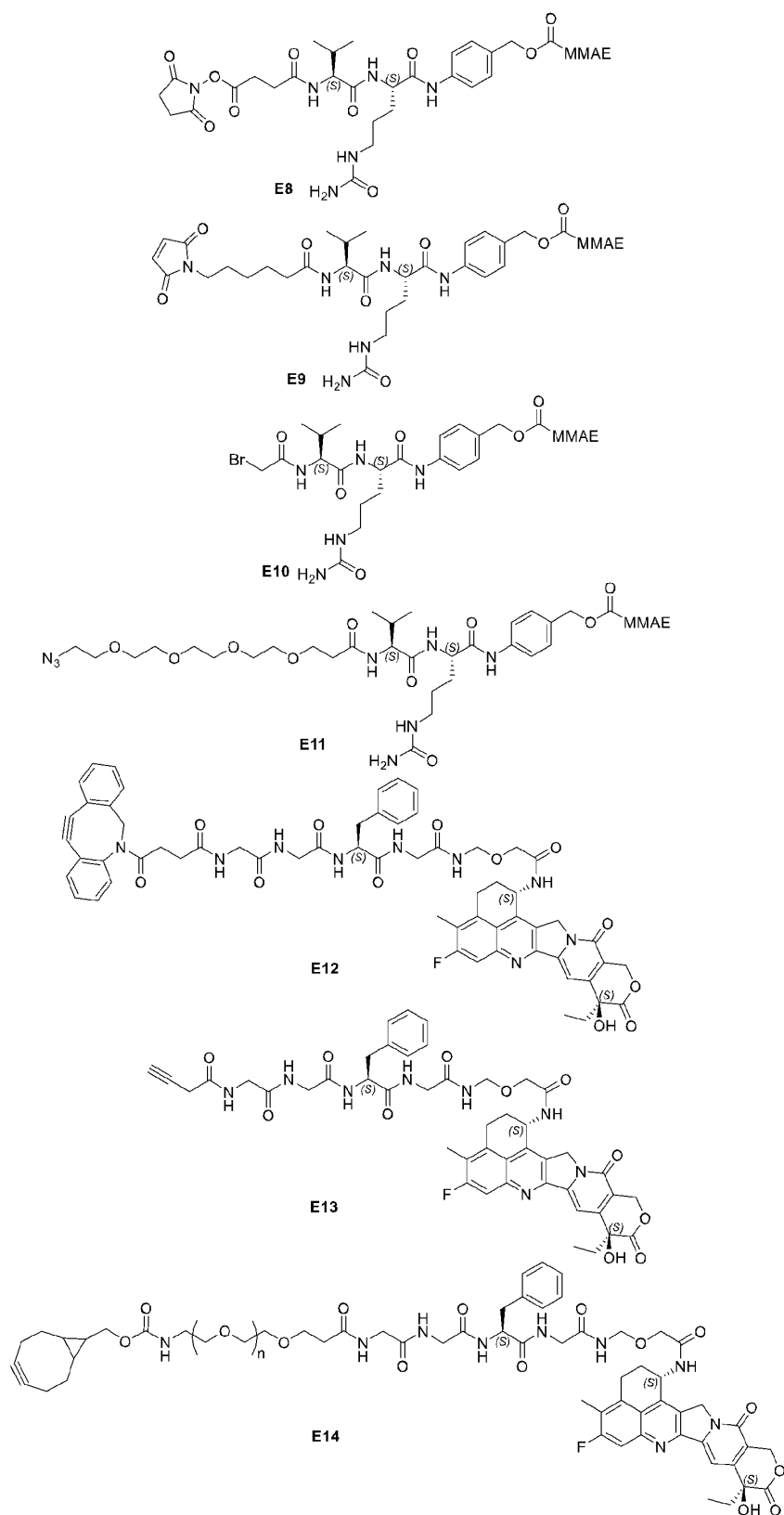
Ab 为抗体或抗原结合片段, 选自单抗、双抗或多抗。

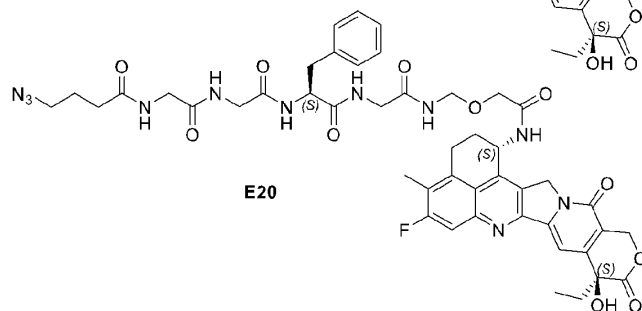
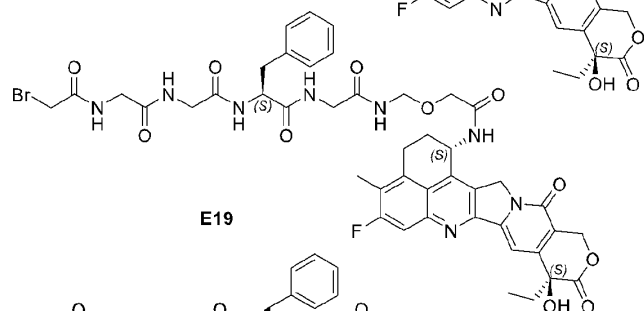
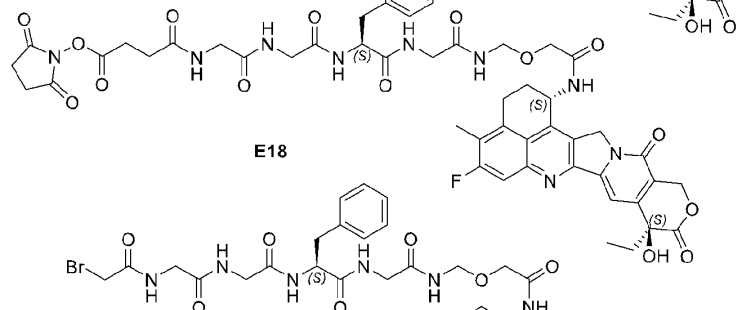
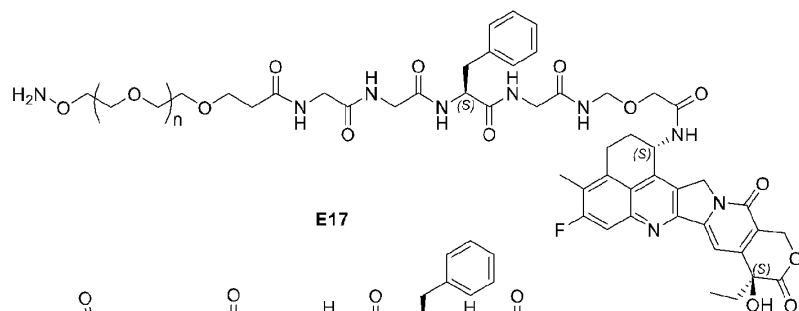
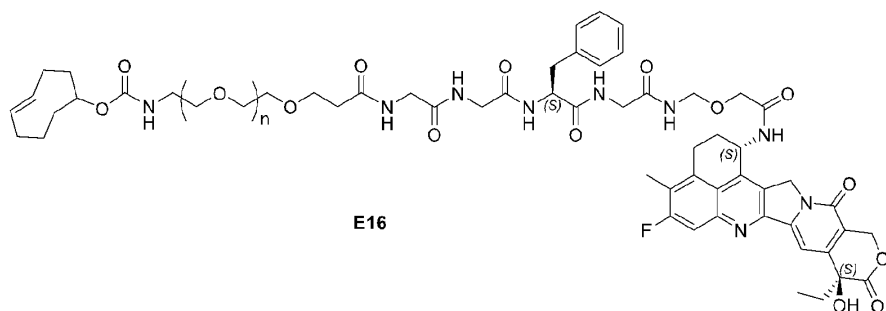
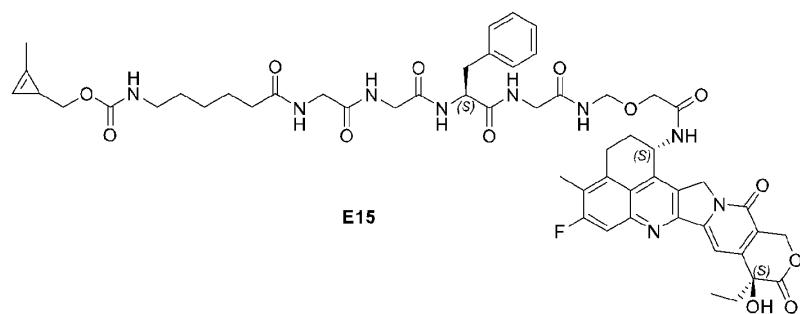
在本公开的一些实施方案中, 式(III)所示的基于抗体的偶联药物中, 所述抗体选自: 帕妥珠单抗 (Pertuzumab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、西妥昔单抗 (Cetuximab)、马吉妥昔单抗 (Margetuximab)、阿昔单抗 (Abciximab)、达利珠单抗 (Daclizumab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、帕利韦单抗 (Palivizumab)、巴

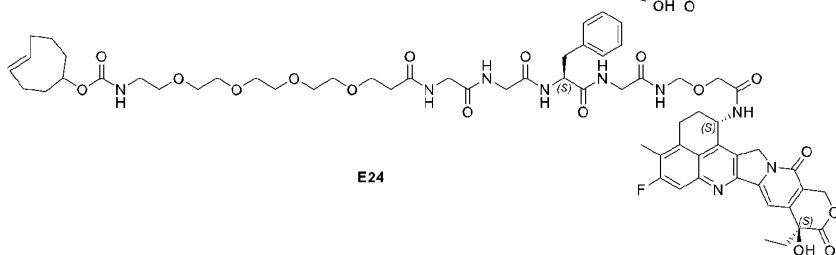
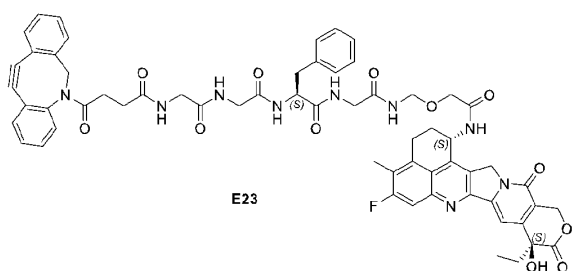
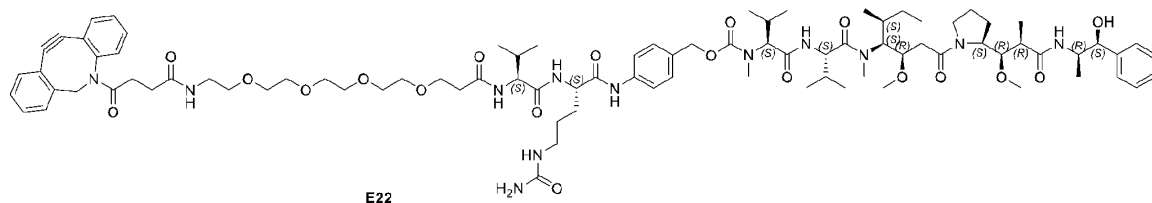
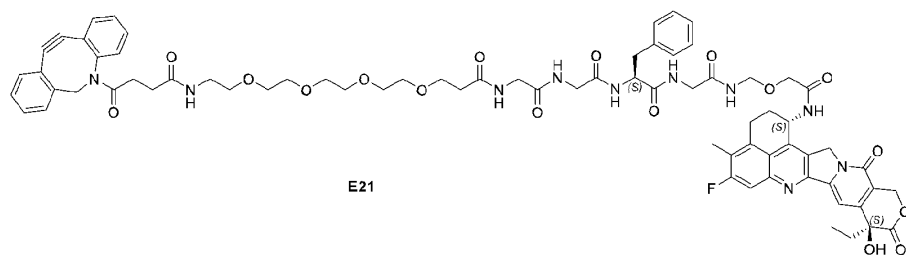
利替单抗 (Basiliximab)、贝伐珠单抗 (Bevacizumab)、帕妥尤单抗 (Panitumumab)、尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)、地舒单抗 (Denosumab)、佐妥昔单抗 (Zolbetuximab)、雷莫西尤单抗 (Ramucirumab)、奈妥尤单抗 (Necitumumab)、伊匹木单抗 (Ipilimumab)、达雷妥尤单抗 (Daratumumab)、阿仑妥珠单抗 (Alemtuzumab)、依洛珠单抗 (Elotuzumab)、贝林妥欧单抗 (Blinatumomab)、纳武利尤单抗 (Nivolumab)、帕博利珠单抗 (Pembrolizumab)、阿替利珠单抗 (Atezolizumab)、阿维利尤单抗 (Avelumab)、度伐利尤单抗 (Durvalumab)、特瑞普利单抗 (Toripalimab)、卡妥欧单抗 (Catumaxomab)、艾美赛珠单抗 (Emicizumab)、埃万妥单抗 (Amivantamab)。

在本公开的一些实施方案中，式(III)所示的基于抗体的偶联药物中，所述药物连接子 E-L-P 选自以下具体化合物：



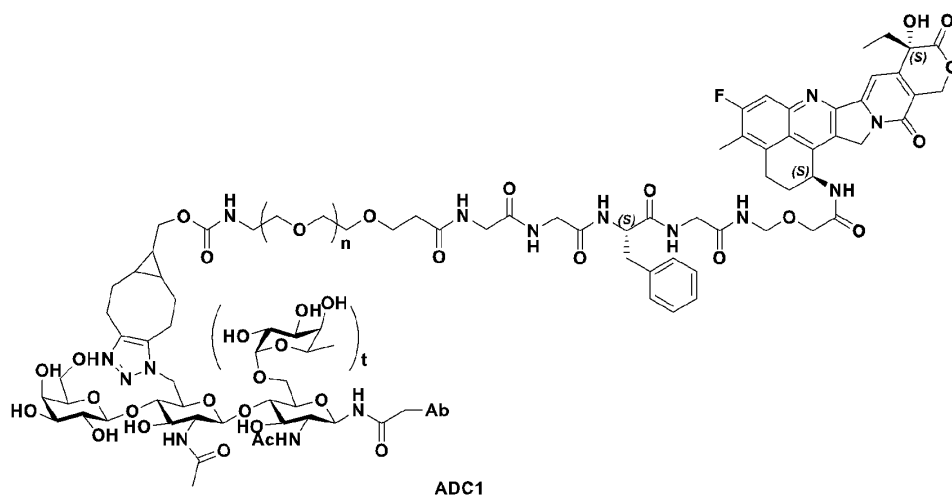


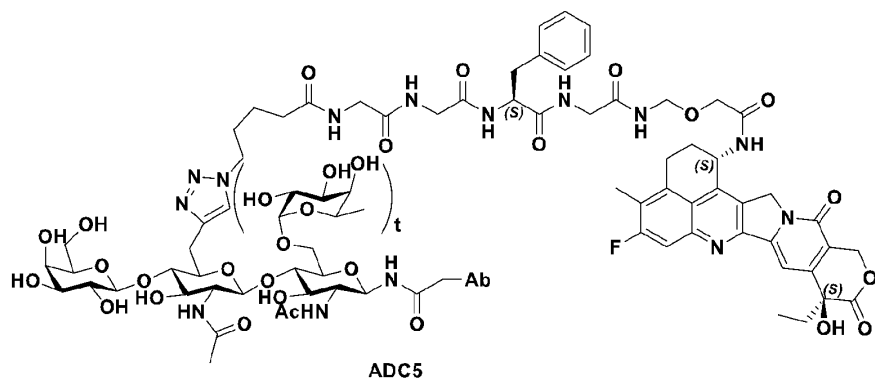
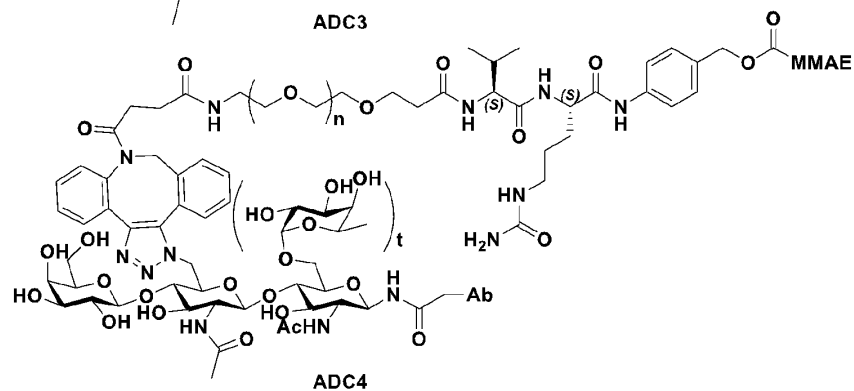
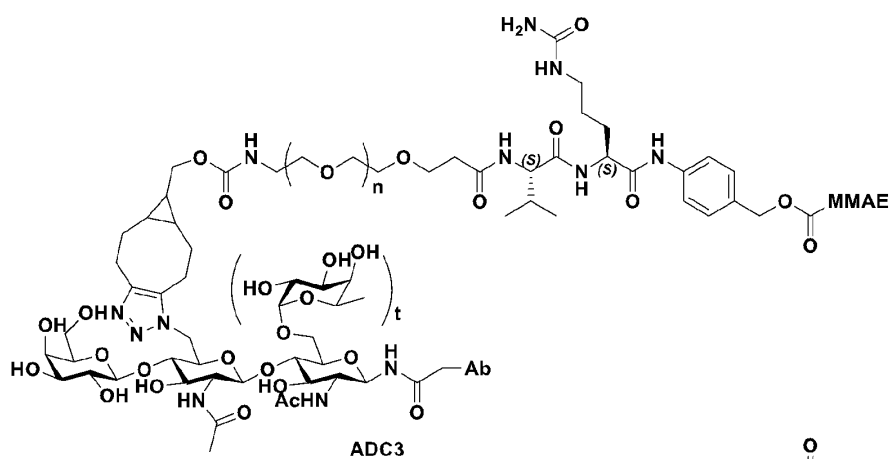
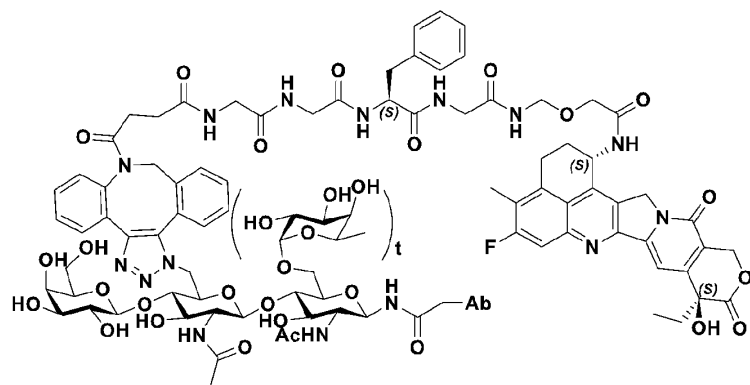


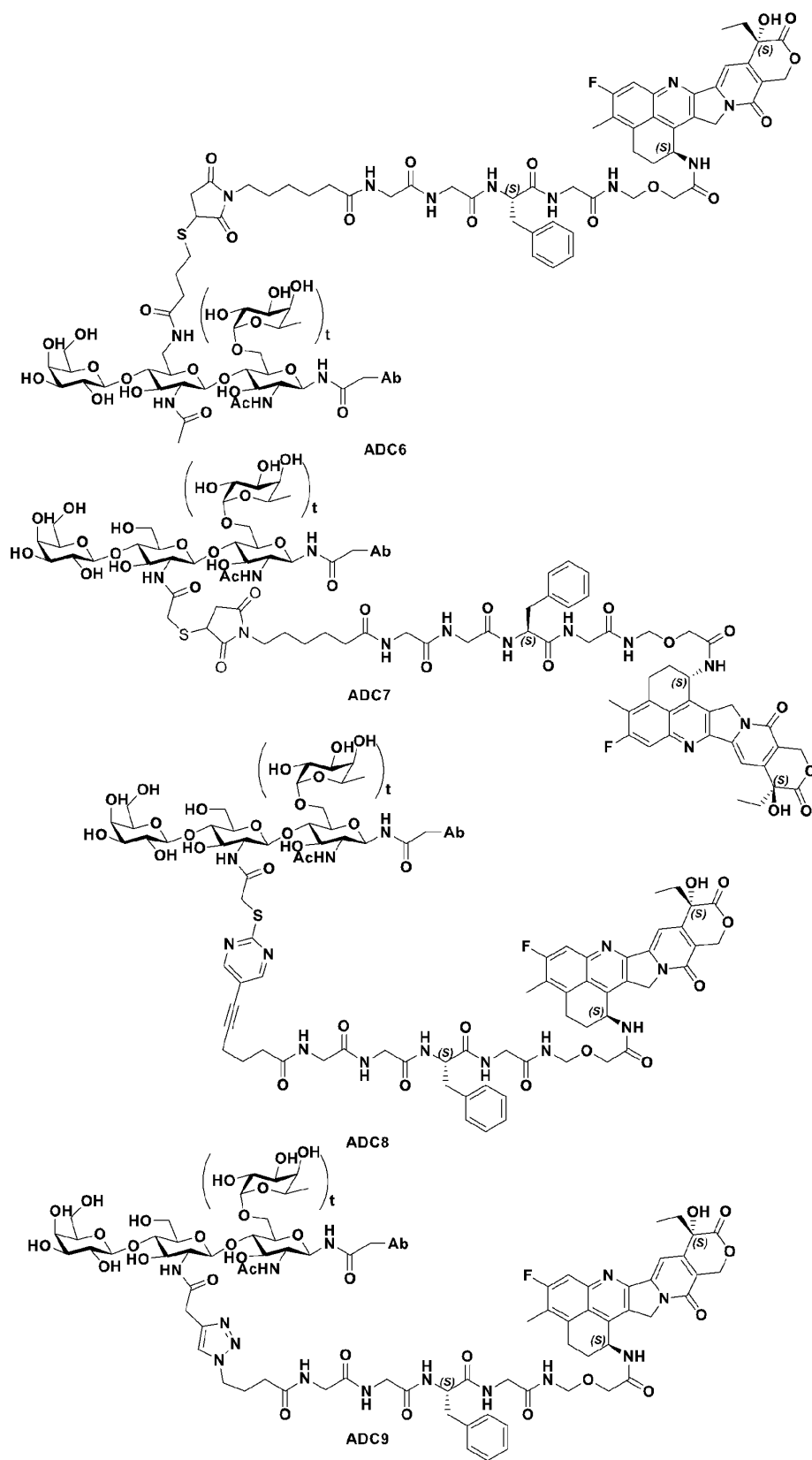


其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

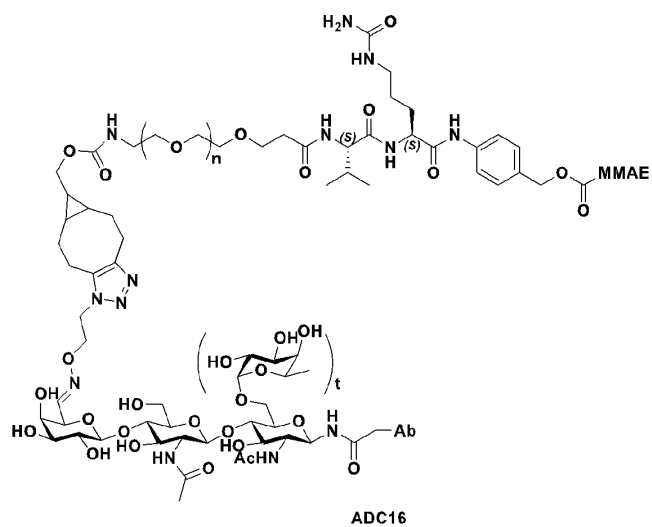
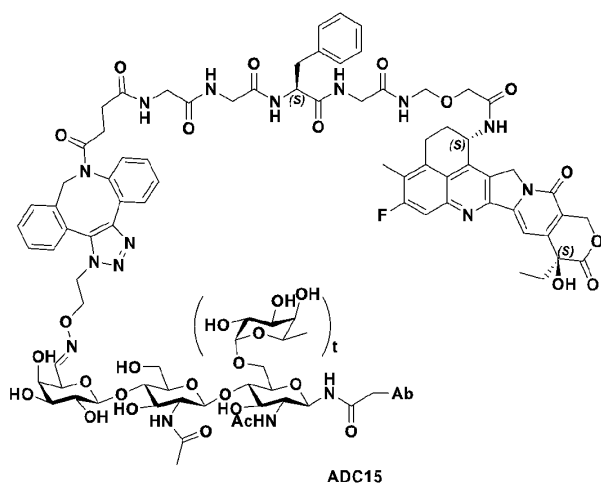
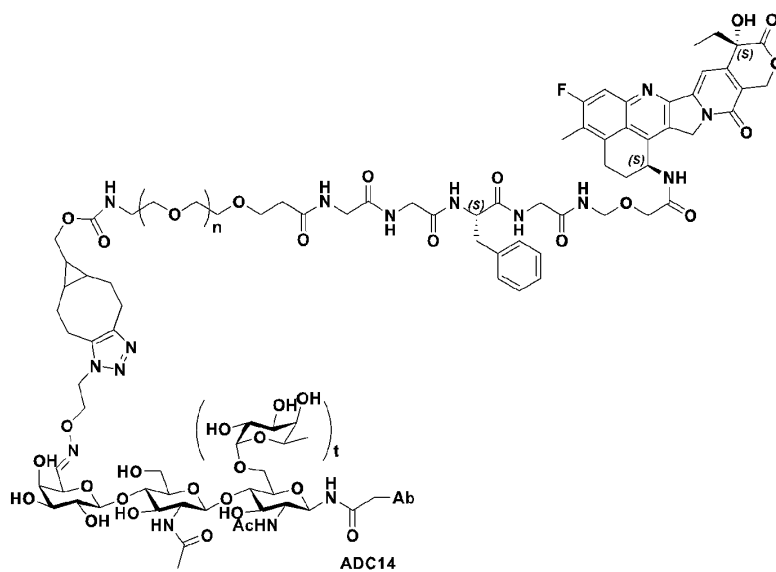
在本公开的一些实施方案中, 当式(III)所示的基于抗体的偶联药物具有单一载荷时, 其选自以下具体结构:

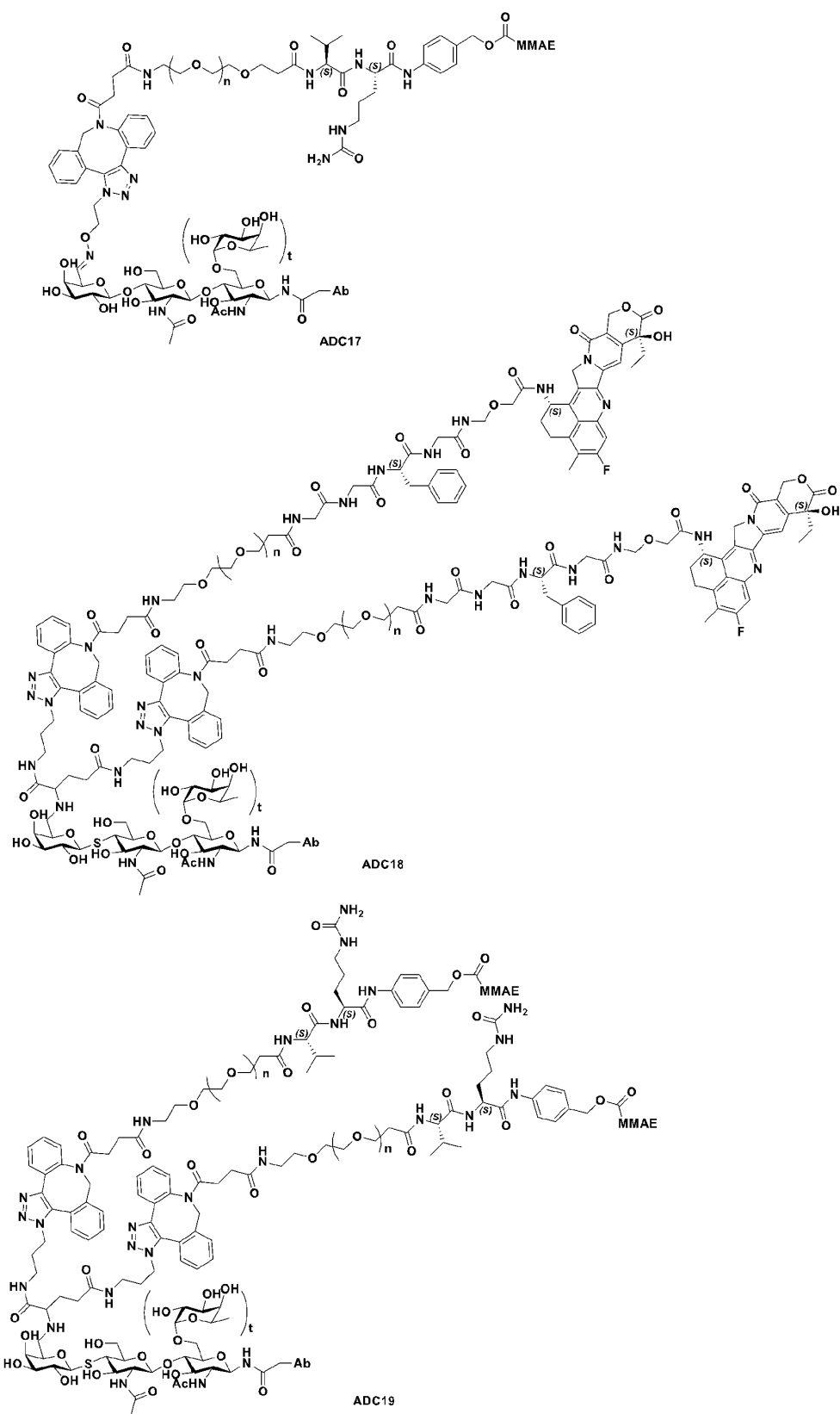


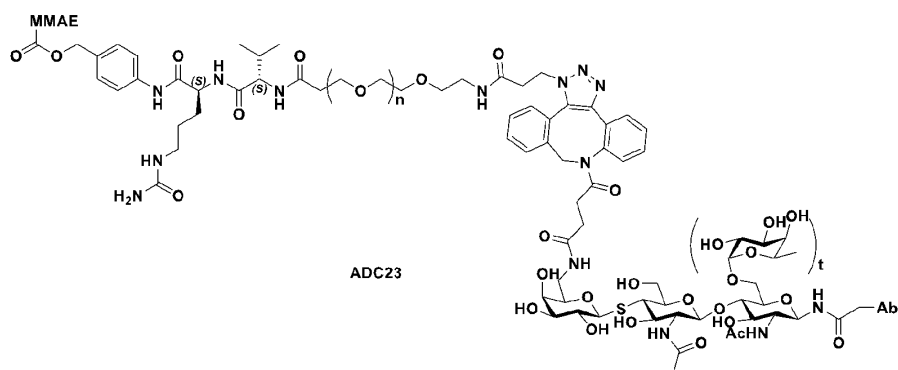
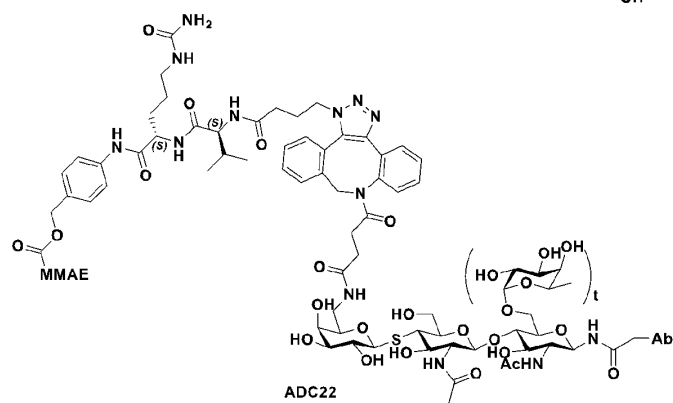
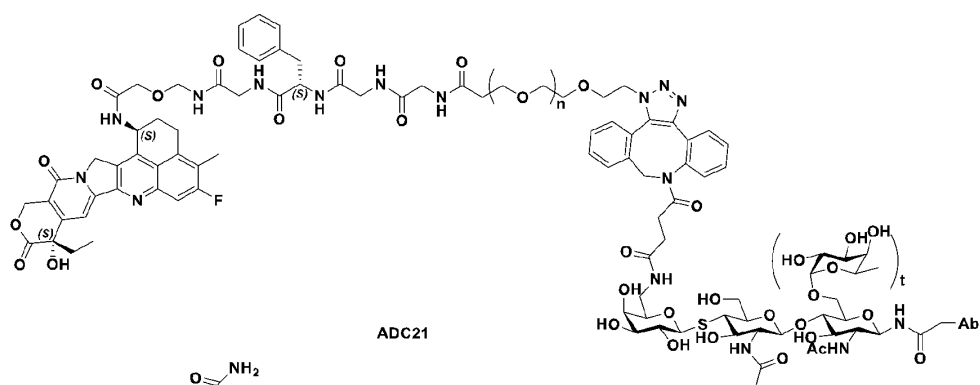
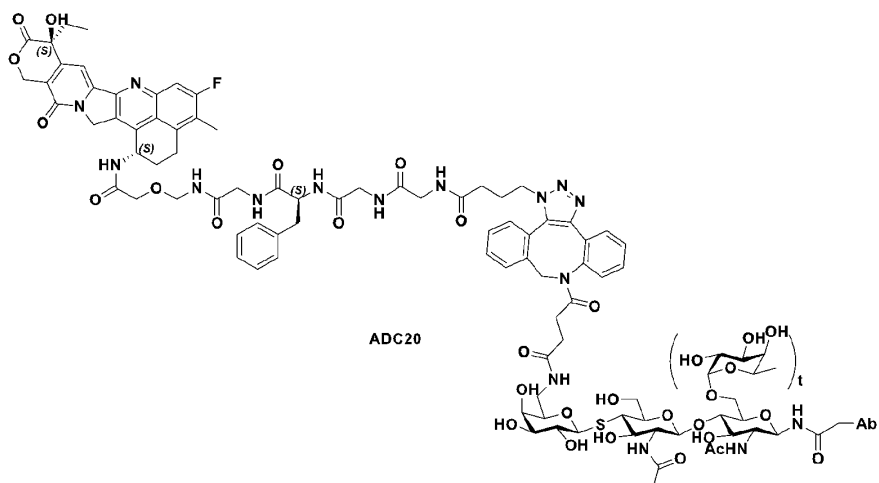


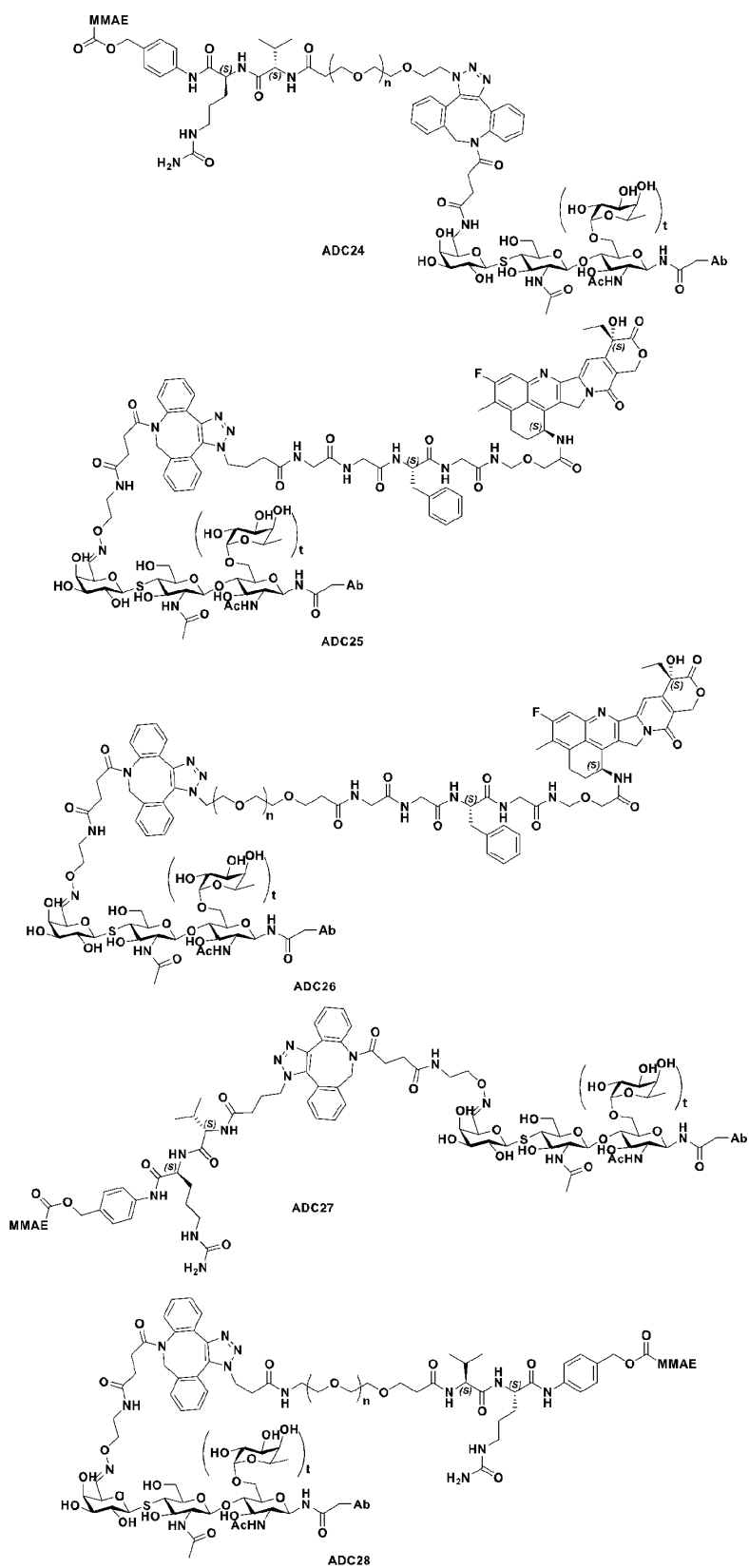


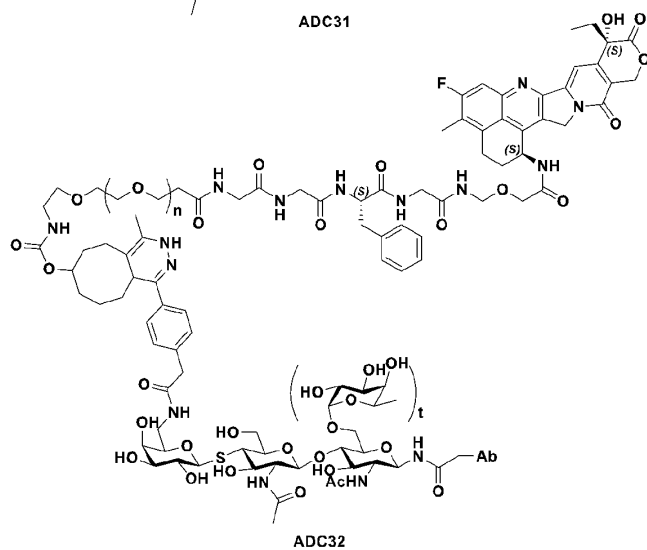
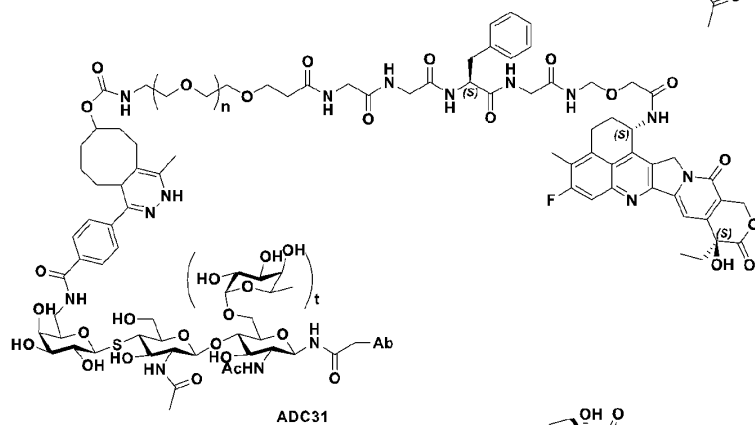
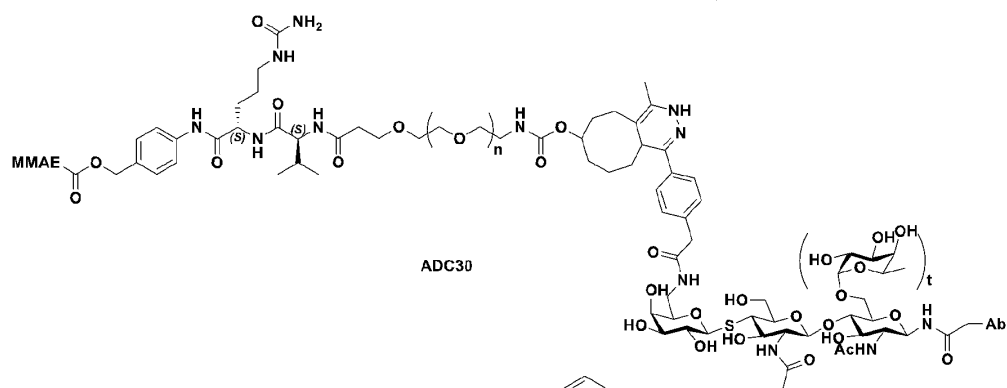
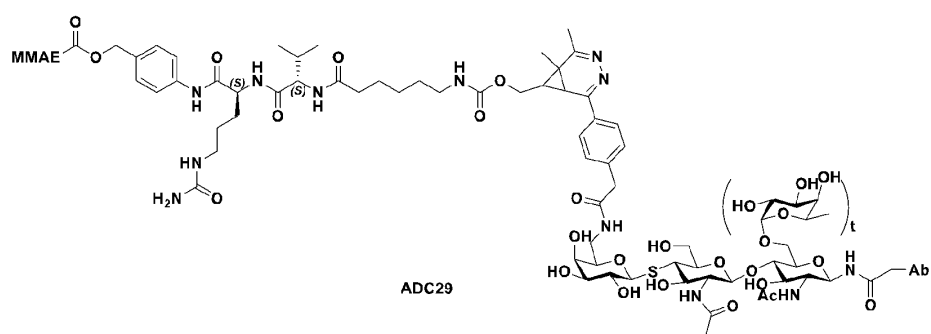


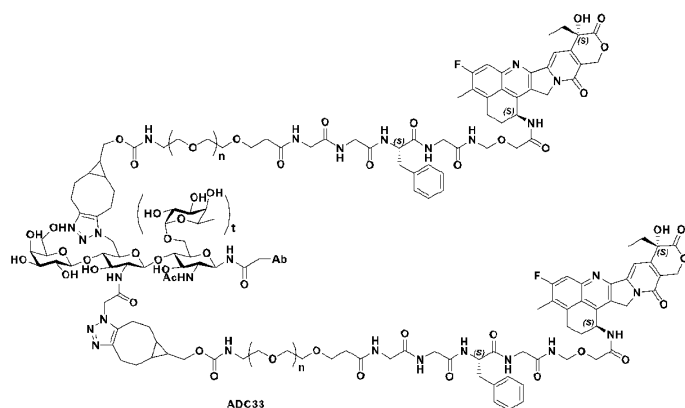




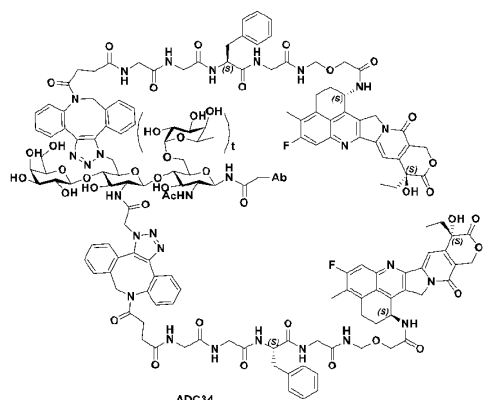




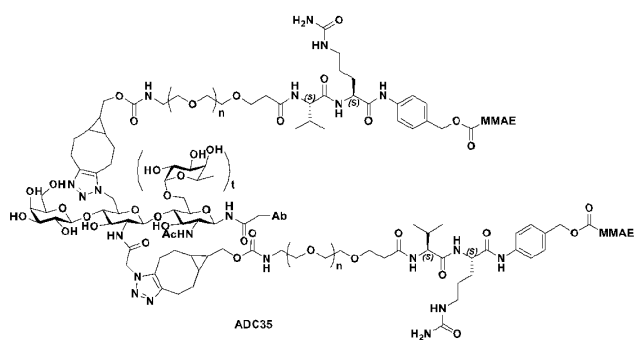




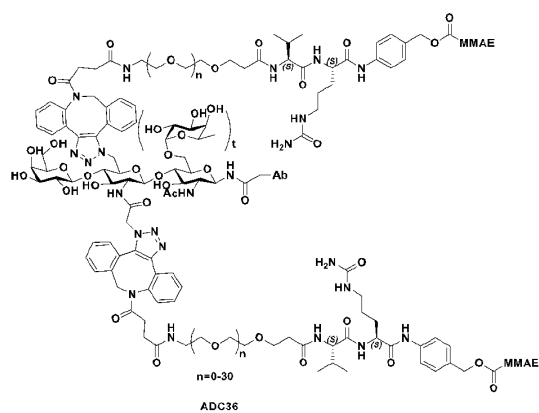
ADC33



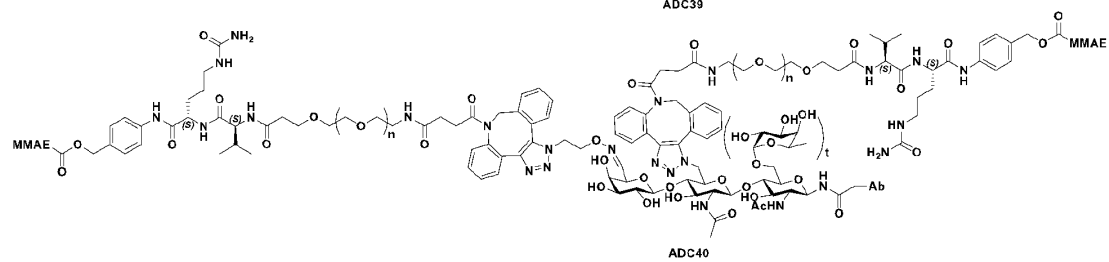
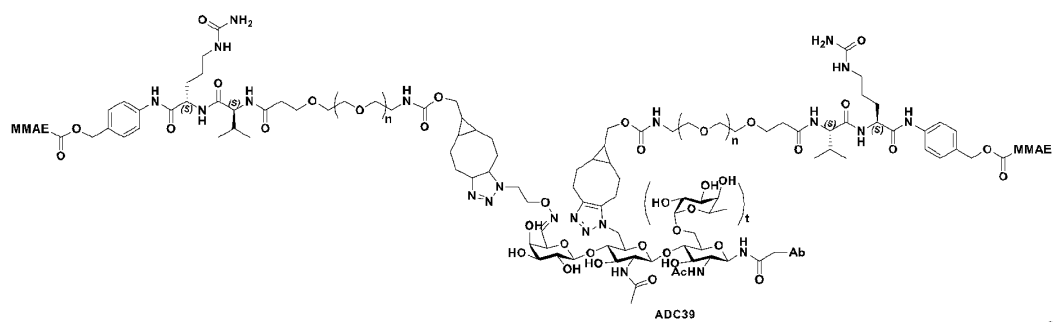
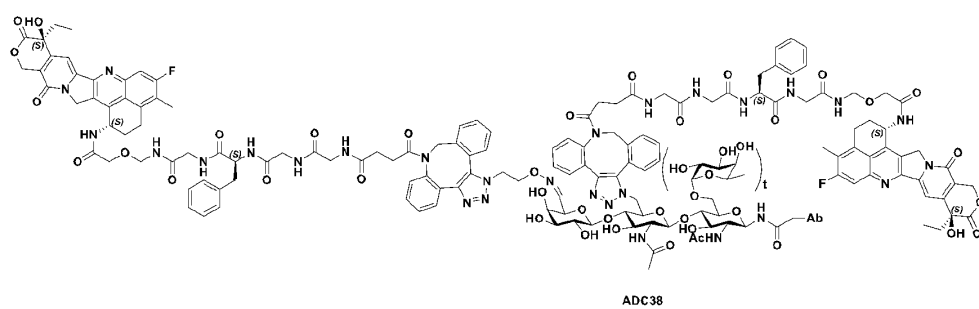
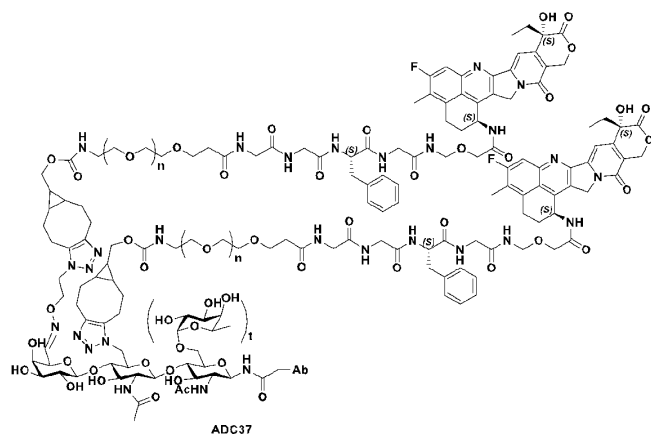
ADC34

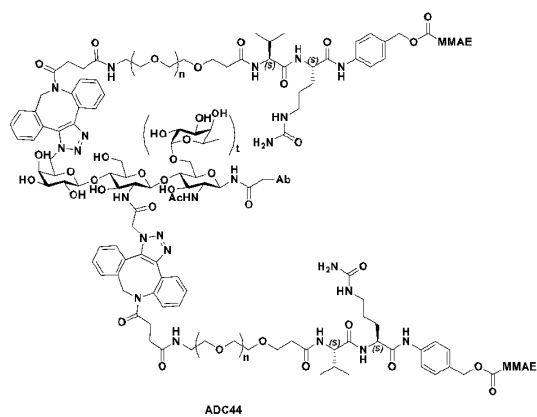
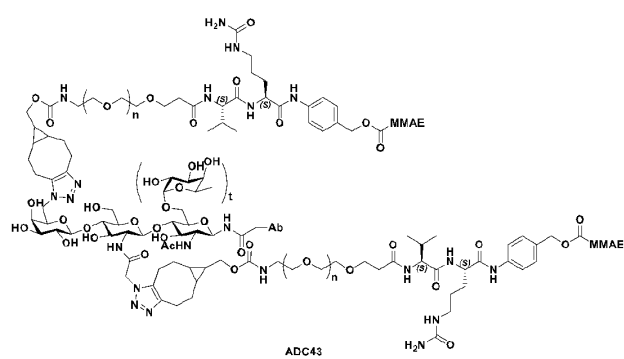
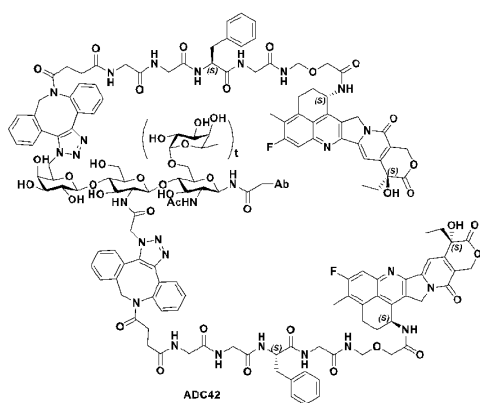
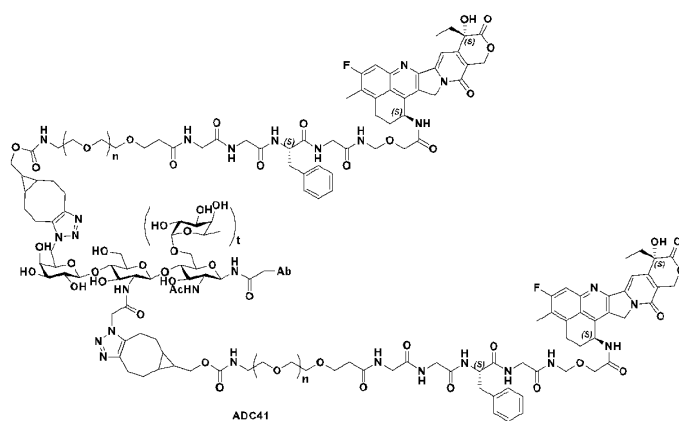


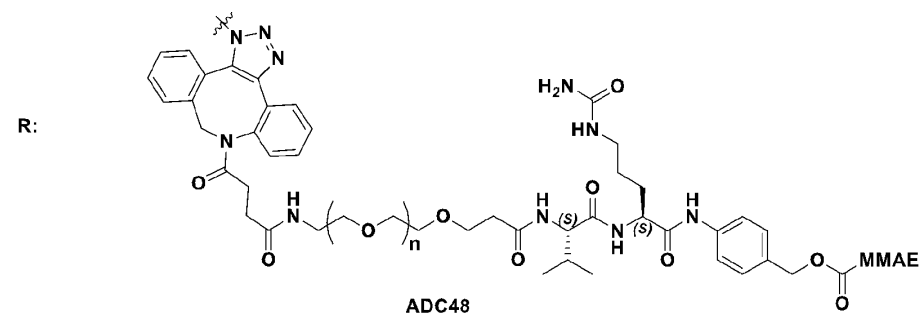
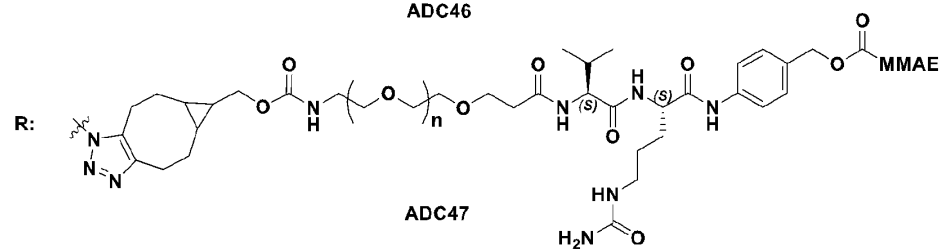
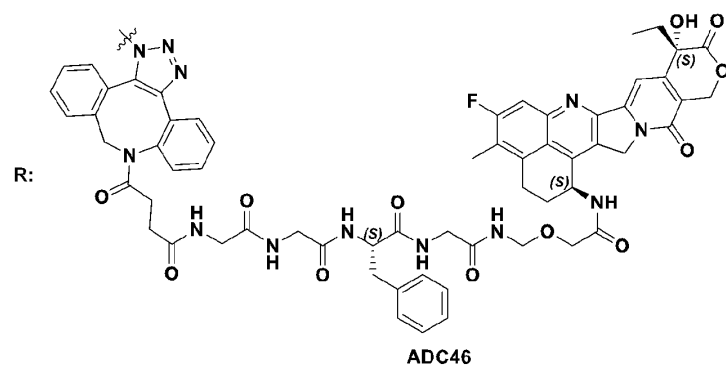
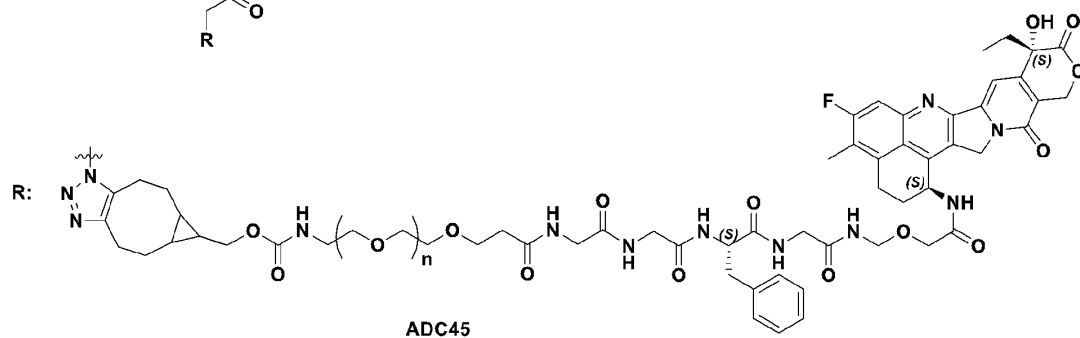
ADC35

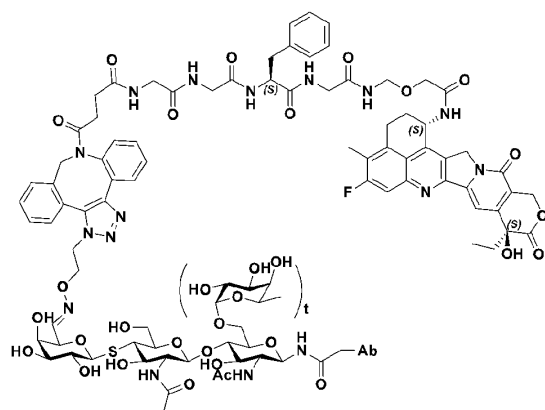


ADC36

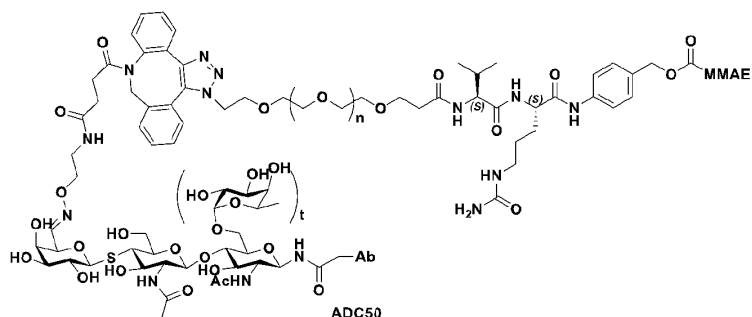




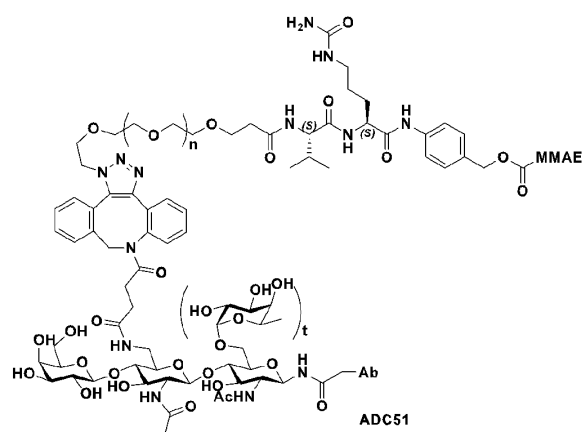




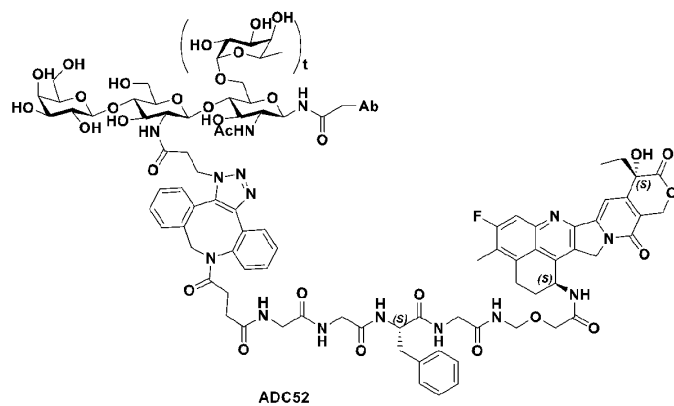
ADC49



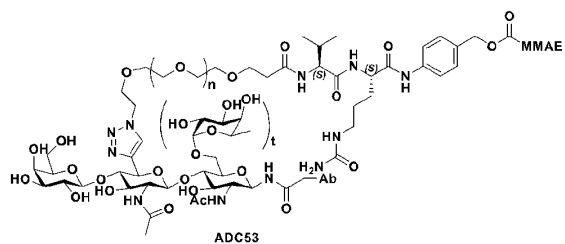
ADC50



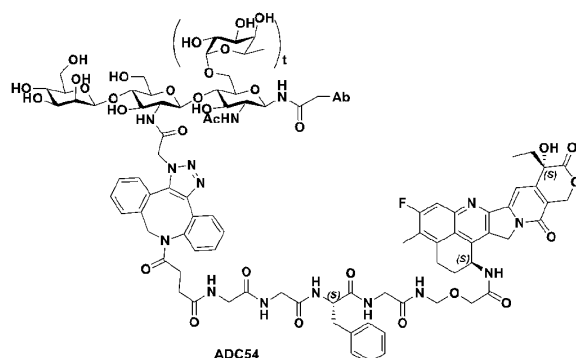
ADC51



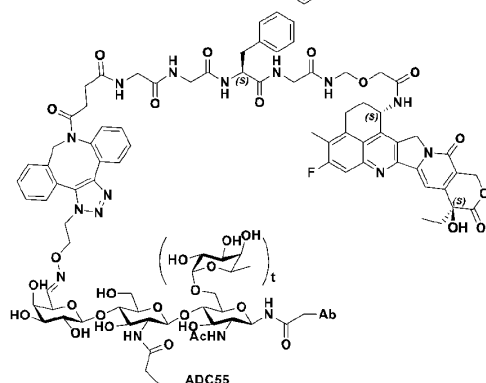
ADC52



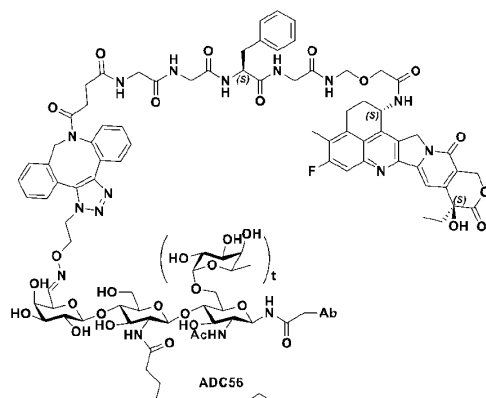
ADC53



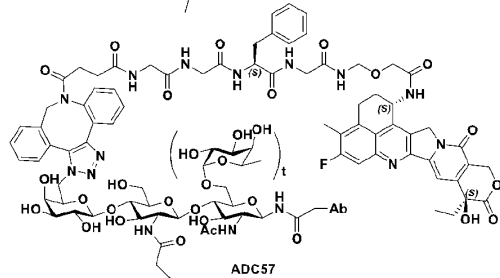
ADC54



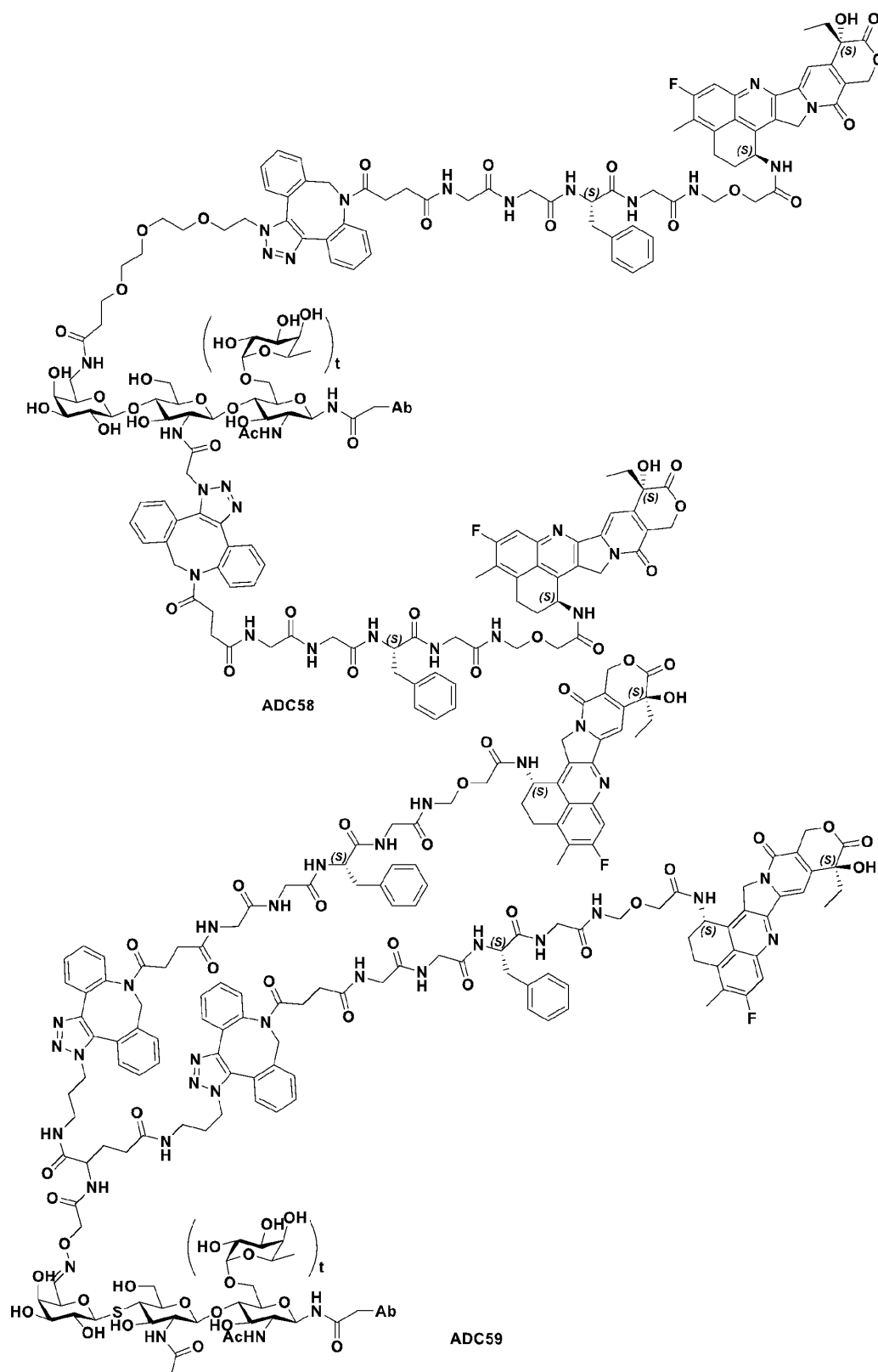
ADC55



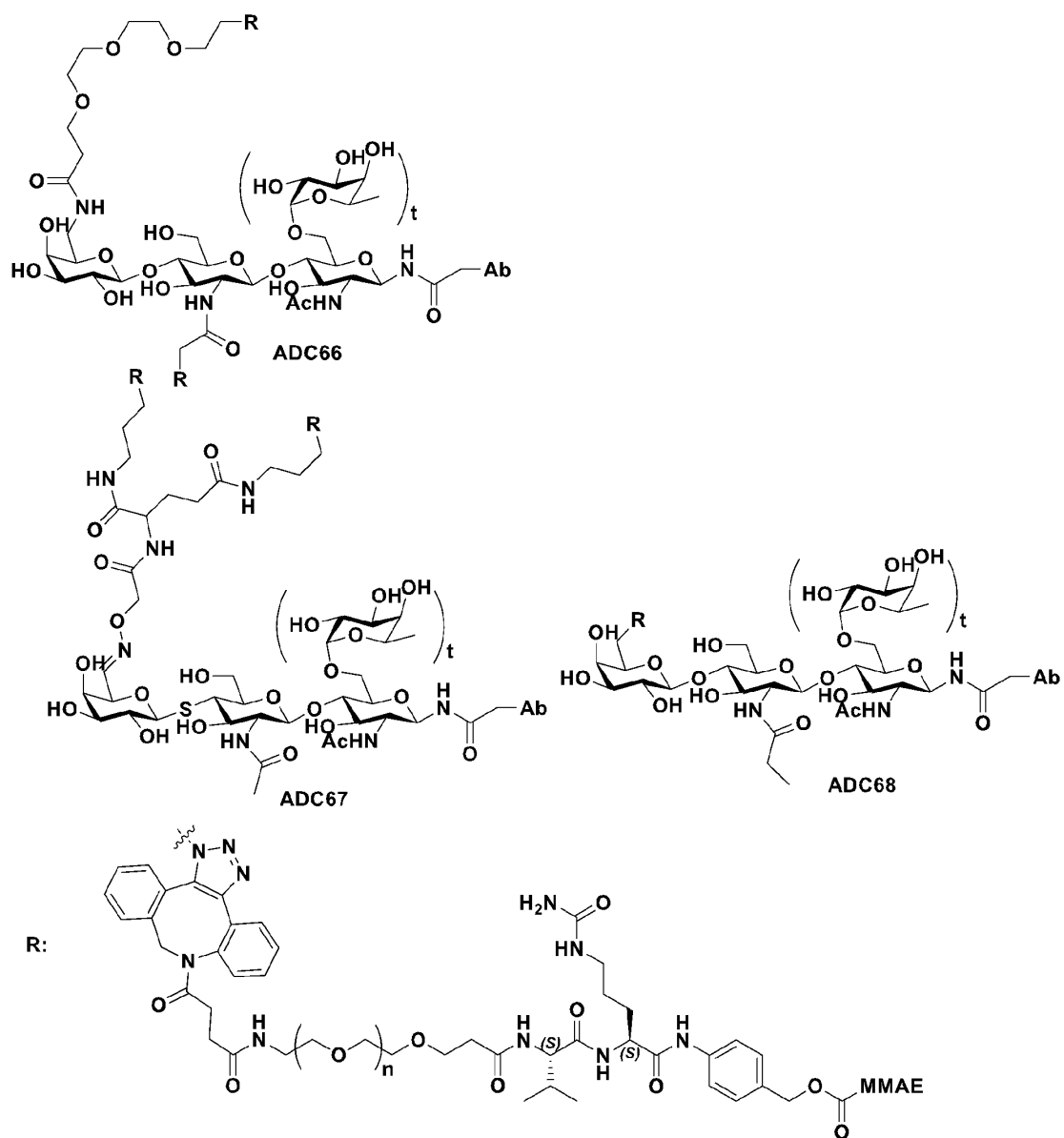
ADC56



ADC57

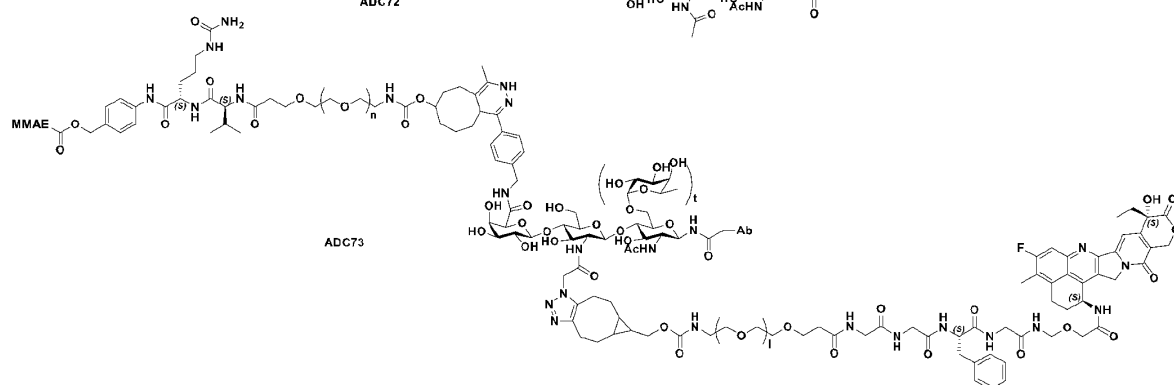
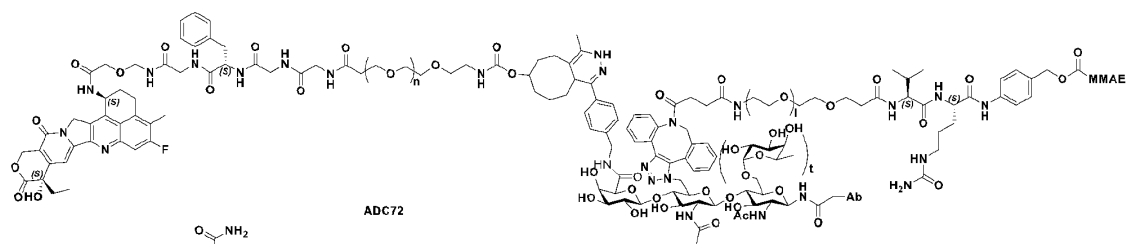
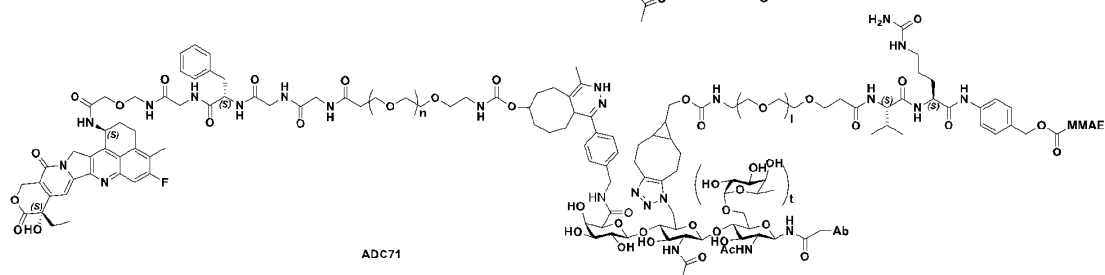
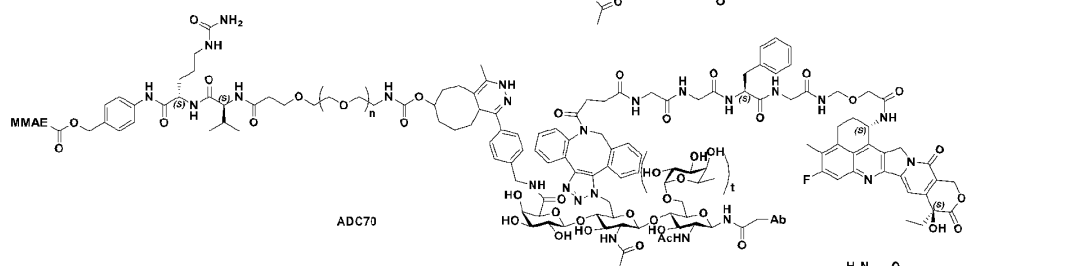
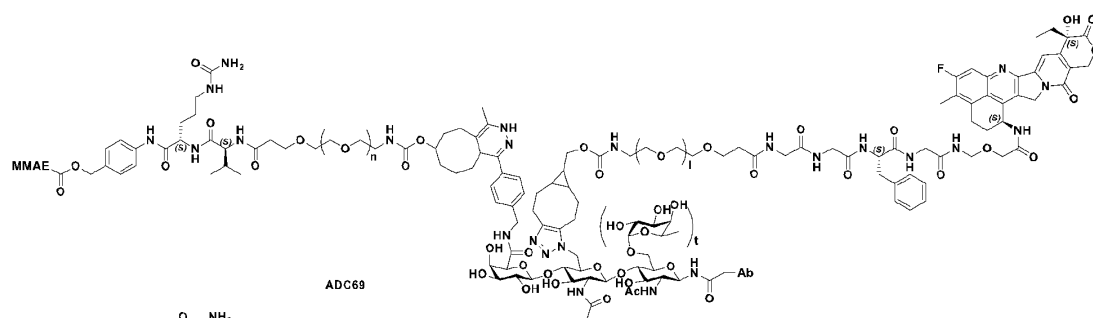






其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数; t 选自 0 或 1。

在本公开的一些实施方案中, 当式(III)所示的基于抗体的偶联药物具有双载荷时, 其选自以下具体化合物:









其中, m , n , l 分别独立选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数; t 选自 0 或 1。

在本公开的一些实施方案中，各个 n、各个 m、各个 I、各个 q 分别独立选自 0-30 的整数，例如，选自 0、1、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 和 30。

在本公开的一些实施方案中，各个 C₁-C₆ 烷基例如为 C₁ 烷基、C₂ 烷基、C₃ 烷基、C₄ 烷基、C₅ 烷基和 C₆ 烷基；各个 C₆-C₁₀ 芳基例如为苯基和萘基；各个 C₅-C₁₀ 杂芳基例如为 6、7、8、9、10、11、12、13 和 14 元杂芳基，含有 1 个或多个（例如，2、3、4 和 5 个）选自 N、O 和 S 的杂原子。

第四方面，本公开提供一种基于抗体的偶联药物的制备方法，所述方法包括以下三种方式：

方式一：

a) 在具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶或糖苷内切酶和岩藻糖水解酶的作用下，野生型抗体被水解形成含有一个 N-乙酰葡萄糖胺或核心岩藻糖化的 N-乙酰葡萄糖胺的去糖基化抗体；

b) 步骤 a) 中得到的去糖基化抗体与上文所述的二糖连接子在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下，偶联得到糖工程抗体；

c) 将步骤 b) 中所得到的包含正交反应性基团的糖工程抗体与带有能与所述正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团修饰的药物连接子 E-L-P 进行偶联，制备得到基于抗体的偶联药物；

方式二：

a) 在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下，野生型抗体与上文所述二糖连接子进行偶联，得到糖工程抗体；

b) 将步骤 a) 中所得到的包含正交反应性基团的糖工程抗体与带有能与所述正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团修饰的药物连接子 E-L-P 进行偶联，制备得到基于抗体的偶联药物；

方式三：

在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下，将野生型抗体和上文所述的二糖-小分子药物偶联物共孵育，或将去糖基化抗体和二糖-小分子药物偶联物共孵育，制备得到基于抗体的偶联药物。

在本公开的一些实施方案中，在所述方式一和方式二中，所述正交反应性基团和能与该正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团选自以下任一组合：叠氮基和炔基、四嗪基和反式环辛烯（TCO）、巯基和马来酰亚胺、巯基与巯基或巯基活化形式、醛基与氨基、醛基与氨基或肟基。

在本公开的一些实施方案中，具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶选自 Endo Se2、Endo Si、Endo S、Endo S2、Endo F3、Endo A、Endo D、Endo CC 及它们的突变体。

在本公开的一些实施方案中，具有糖基转移活性的糖苷内切酶选自 Endo Se2、Endo Si、Endo S、Endo S2、Endo F3 及它们的突变体。

在本公开的一些实施方案中，当制备无核心岩藻糖化的去糖基化抗体、糖工程抗体、基于抗体的偶联药物时，将具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶与岩藻糖水解酶联用。

第五方面，本公开提供了本公开第一方面提供的二糖连接子或者本公开第二方面提供的二糖偶联物在制备本公开基于抗体的偶联药物中的用途。

在本公开的一些实施方案中，所述基于抗体的偶联药物为本公开第三方面提供的基于抗体的偶联药物。

第六方面，本公开提供了本公开第三方面提供的基于抗体的偶联药物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗、或预防肿瘤、炎症、病毒、感染性疾病或其它免疫性疾病。

第七方面，本公开提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的本公开第三方面提供的基于抗体的偶联药物。

在本公开的一些实施方案中，所述药物组合物用于治疗、或预防疾病，所述疾病包括肿瘤、炎症、病毒、感染性疾病或其它免疫性疾病。

第八方面，本公开提供一种治疗、或预防疾病的方法，所述方法包括向患者施用治疗、或预防有效量的本公开第三方面提供的基于抗体的偶联药物。

在本公开的一些实施方案中，所述疾病包括肿瘤、炎症、病毒、感染性疾病或其它免疫性疾病。

本公开通过糖工程方法制备了均一化糖链修饰抗体。本公开内容涉及抗体分子的 Fc 区，其中 Fc 区被特异性糖链修饰，所述糖链能够增强 Fc 区的功能。在一些实施方案中，特异性糖链修饰的 Fc 区包含单克隆抗体，优选人源化单克隆抗体。本文公开了通过糖工程方法产生此类包含特异性糖链修饰的抗体或抗体片段的方法。

除非特别定义，本公开中使用的所有学术用语具有与本公开所属领域的技术人员通常理解的含义。在本公开中提及的所有出版物和专利文件可被视为所属技术领域具有通常知识者的提示。

在本公开中，术语“糖”是指多糖或氧化或未氧化的含有碳水化合物分子的分子，包括但不限于单糖、二糖、三糖、

低聚糖、或多糖。糖在本文中还可用于指含糖偶联物的碳水化合物部分，例如糖蛋白、糖脂、糖肽、糖蛋白质组、肽聚糖、脂多糖或蛋白聚糖。术语“糖链”在本文中可与“糖”互换使用。

如本公开所使用的，“糖链连接子”作为糖基偶联的活化的供体分子，可以是合成的含噁唑啉或噻唑啉的糖，例如具有还原末端经活化的寡糖、优选具有经噁唑啉结构化的寡糖分子；也可以是天然的 N-聚糖噁唑啉。糖链连接子还可以被化学修饰，例如通过叠氮化、炔基化、醛基化、巯基化等引入官能团。术语“二糖连接子”是至少含有两个单糖单元的糖链连接子，优选两个单糖单元通过糖苷键或硫醚键连接。

在本公开中，术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗体片段，只要它们表现出所需的生物学活性。术语“免疫球蛋白”在本文中可与“抗体”互换使用。本文使用的术语“单克隆抗体”是指从实质上均质的抗体群体中获得的抗体。

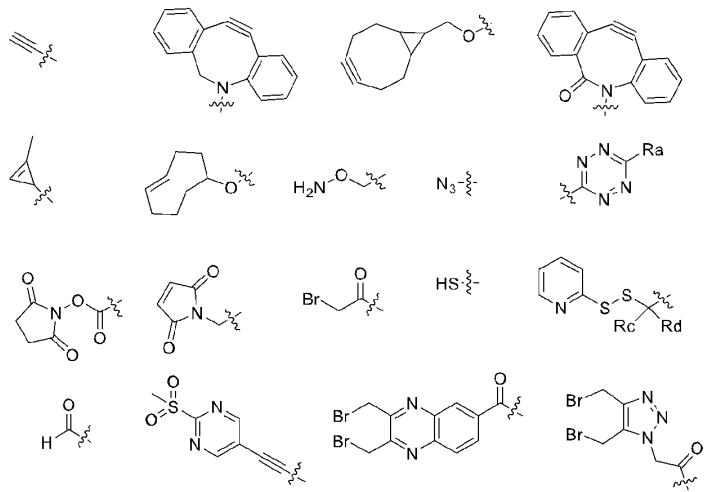
核心岩藻糖基化和非岩藻糖基化的糖蛋白是重要的分子类别，其在许多生物事件例如肿瘤转移、细胞粘附、病原体感染和免疫应答中发挥关键作用。天然和重组的岩藻糖基化和非岩藻糖基化的糖蛋白通常作为仅在侧链寡糖的结构方面不同的糖型的混合物被生产。

本公开的术语“基于抗体的偶联药物”泛指所有靶向特定细胞的多肽/蛋白质与载荷进行共价连接以后形成的偶联物。所述靶向特定细胞的多肽/蛋白质可以是抗体或其抗原结合片段，例如单抗、双抗或多抗等；所述载荷可以是细胞毒素、小分子药物、近红外或荧光探针、多肽、RNA 及相关药物、放射性同位素标记、造影剂及核磁共振成像剂；所形成的共价偶联物可用于治疗或检测。本公开的术语“抗体-药物偶联物”指所有靶向特定细胞的多肽/蛋白质与细胞毒素进行共价连接以后形成的偶联物。

本公开的术语“糖苷内切酶”是指具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷水解酶，通常此类酶属于糖苷水解酶家族 18 或 85，本领域公知的一些糖苷内切酶例如 Endo S、Endo S2、Endo F3、Endo A、Endo D、Endo CC 及它们的突变体，例如参见 WO2022/226420 中所记载的那些。此类酶还可能同时具有糖基转移活性，本领域公知的具有此类活性的酶例如 Endo S、Endo S2、Endo F3 及它们的突变体，例如参见 WO2022/226420 中所记载的那些。

本公开所使用的“野生型抗体”，典型是指天然存在的或经重组表达后产生的具有 N-糖基化位点（N-聚糖）的抗体，例如 Fc 段具有 N297 位点的所有抗体都属于“野生型抗体”的范畴，Fc 段来自于 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。本公开的术语“去糖基化抗体”是指野生型抗体在糖苷水解酶的作用下，形成的含有一个 N-乙酰葡萄糖胺或核心岩藻糖基化的 N-乙酰葡萄糖胺的抗体。

本公开所使用的术语“药物连接子 E-L-P”是指包含正交反应性基团、接头（linker）和载荷（payload）的共价连接物。典型的 E-L-P 中 E 包含如下任一结构：



以下通过反应式概括性地示出本公开中的糖工程抗体以及糖链定点 ADC 的制备路线。

糖工程化改造抗体的通用方法：

通用操作一：糖工程抗体的制备方法

野生型抗体、制备得到的二糖连接子、糖苷内切酶(Endo Si 或 Endo Se2)，使各项的浓度依次为 10 mg/mL、2 mM (抗体浓度的 30 倍当量)、0.4 mg/mL，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育 12 h，后经 protein A 纯化后得到所需非天然糖工程抗体。

通用操作二：基于叠氮修饰糖工程抗体的定点 ADC 制备方法

制备得到的叠氮修饰糖工程抗体，环炔类连接子-载荷，使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

通用操作三：基于环炔基修饰糖工程抗体的定点 ADC 制备方法

制备得到的环炔基修饰糖工程抗体，叠氮类连接子-载荷，使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

通用操作四：基于四嗪修饰糖工程抗体的定点 ADC 制备方法

制备得到的四嗪修饰糖工程抗体，反式环辛烯(TCO)类连接子-载荷，使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

通用操作五：一步法糖定点偶联 ADC 的制备方法

制备得到的带有载荷的二糖连接子、野生型抗体、糖苷内切酶 (Endo Si 或 Endo Se2)，使各项浓度依次为 0.4 mM、5 mg/mL、0.4 mg/mL，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

通用操作六：基于叠氮及四嗪修饰糖工程抗体的双载荷定点 ADC 制备方法

制备得到的叠氮及四嗪修饰糖工程抗体，环炔类连接子-载荷，反式环辛烯(TCO)类连接子-载荷，使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM、0.33 mM，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

通用操作七：基于直链炔基修饰糖工程抗体的定点 ADC 制备方法

预先混合硫酸铜，三 (3-羟丙基三唑甲基)胺 (THPTA)、抗坏血酸钠，使各项浓度分别为 20 mM、100 mM、150 mM，作为催化剂备用。将制备得到直链炔基修饰的糖工程抗体、叠氮类连接子-载荷以及催化剂混合，使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.5 mM、0.67 mM (硫酸铜)，3.33 mM (THPTA)，5 mM (抗坏血酸钠)，调节反应体系 pH 为 7.4，25°C 孵育过夜，LC-MS 确证转化为产物后，经 protein A 纯化或超滤得到所需糖定点偶联 ADC。

技术效果

本公开实现了以下的至少一种有益技术效果：

基于糖基定点结构修饰的基础上，丰富和发展了多个新型二糖连接子修饰可用位点，提供了多种新型二糖连接子结构。

本公开在基于糖苷内切酶开发基础上，发现并测试了两种底物特异性更宽，转移效率更佳的野生型糖苷内切酶。

本公开通过酶催化反应实现正交反应性基团在抗体上的定点引入，从而实现与小分子药物的定点偶联，操作简单，易于工业化生产。而且，定点偶联的抗体-药物偶联物具有较好的成药性，可用于治疗肿瘤、炎症、病毒、感染性疾病或其它免疫性疾病。

附图的简要说明

图 1. 不同糖苷内切酶对化合物 G0 转糖基活性检测；

图 2. 不同糖苷内切酶对化合物 G1 转糖基活性检测；

图 3. 不同糖苷内切酶对化合物 G2 转糖基活性检测；

图 4. 低剂量糖定点偶联 ADC 在 NCI-N87 移植瘤模型中的药效；

图 5. 高剂量糖定点偶联 ADC 在 NCI-N87 移植瘤模型中的药效。

实施例

以下通过具体实施例来描述通过本公开制备方法制备二糖连接子、糖工程抗体以及糖定点偶联 ADC 的具体过程。

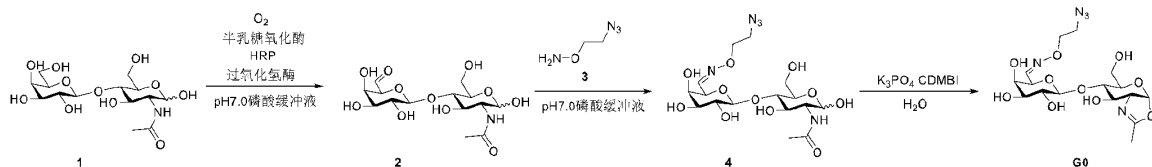
在本公开中，糖链连接子委托合成自武汉糖智药业有限公司。DBCO (二苯并环辛炔) 类化合物和四嗪类化合物购自上海毕得医药科技有限公司，D-葡萄糖胺盐酸盐和叠氮氨基酸类化合物购自安耐吉化学技术有限公司；乙腈购自武汉申试有限公司；半乳糖氧化酶、过氧化氢酶、辣根过氧化物酶购自上海颀心实验室有限公司。其它化合物、试剂如未作进一步解释均购自国药集团化学试剂有限公司。所使用的仪器、色谱柱包括：LC-MS 安捷伦 1290+6135B，分析型高效液相色谱仪(Thermo ultimate 3000)，通威 ELSD-UM500，制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术，LC 2100)；安捷伦 SB C18 (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)，Waters XBridge BEH Amide (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μ m)，Welch HILIC Amide (10 μ m, 21.2 $\times$ 250 mm)。

本公开实施例中所使用的抗体为包含 Fc 段的野生型抗体，所述 Fc 段序列例如为 SEQ ID NO:5 所示，典型的如帕妥珠单抗。本公开中，曲妥珠抗体 (Trastuzumab) 购买自三优生物医药 (上海) 有限公司。本公开中，抗体、糖链修饰抗体、ADC 纯化、性质测定所使用的填料、色谱柱、仪器包括：5 ml cOmplete™ His-Tag Purification Column (Roche)，HiLoad™ 26/600 Superdex™ 200 prep grade 色谱柱 (Cytive)，AmMag™ Protein A Magnetic Beads (GenScript)，SDA030 蛋白纯化系统 (Sepure)，Acquity I-Class/RDa (Waters) 液相色谱质谱连用仪，Arc Premier 高效液相色谱仪，ACQUITY UPLC BEH PROTEIN C4 (Waters, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm) 色谱柱，TSKgel G3000SWXL (7.8 mm $\times$ 30 cm, 5 μ m) SEC 色谱柱，TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm $\times$ 10 cm, 2.5 μ m) HIC 色谱柱。

本公开中, 药物连接子 DBCO-GGFG-Dxd 和 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd 购自上海禧耀医药科技有限公司; 药物连接子 DBCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和 N₃-PEG₄-VC-PAB-MMAE 购自 MedChemExpress LLC。

1、二糖连接子的制备

实施例 1: 化合物 G0 的合成



步骤 1: 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液的配制方法: 将 0.68 g 磷酸二氢钾溶于 100 mL 去离子水, 再通过 1 N 氢氧化钠溶液将磷酸缓冲液的 pH 调至 7.0±0.2。室温条件下, 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 40 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液和化合物 1(800 mg, 2.09 mmol), 搅拌, 用注射器针头持续通入氧气(O₂), 通入时间约为 0.5-1 小时; 再依次加入 1 kU 半乳糖氧化酶(galactose oxidase), 10 kU 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase), 200 kU 过氧化氢酶(catalase), 室温反应 6 小时, 待反应完成后停止通入氧气, 制备的化合物 2 无需纯化直接进入下一步反应。

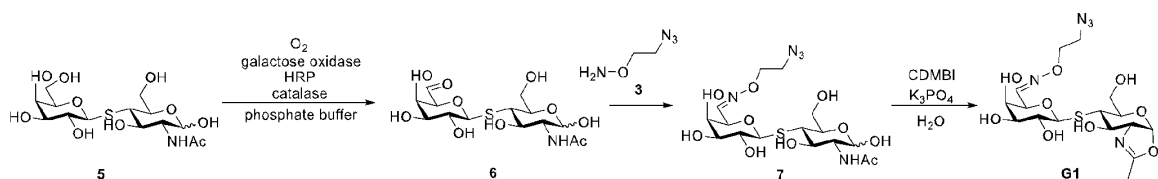
步骤 2: 在上一步的反应液中加入 250 μL 化合物 3(O-(2-叠氮乙基)胺, CAS: 1397706-70-5, (250 μL, 2.45 mmol), 15-25°C 反应过夜, 点板(TLC)监测反应情况(异丙醇:浓氨水:去离子水=10:3:2)。反应完成, 旋蒸除去大部分水(>95%), 再加入 40 mL 乙醇, 过滤除去不溶物, 滤液旋干后通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:2-10:3, 含 1%浓氨水), 收集组分浓缩后再冻干, 得化合物 4 (350 mg, 两步产率 36%)。

ESI-MS calc. for C₁₆H₂₇N₅O₁₁ [M+H]⁺ m/z= 466.2, found m/z= 466.2. ¹H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 7.47 (d, J= 4.1 Hz, 0.7H), 6.81 (d, J= 4.6 Hz, 0.3H), 5.16 (q, J= 1.5 Hz, 0.7H), 4.80 (ddd, J= 4.7, 3.5, 1.2 Hz, 0.3H), 4.67–4.65 (m, 0.3H), 4.49 (d, J= 7.9 Hz, 0.65H), 4.46 (dd, J= 7.9, 1.6 Hz, 0.35H), 4.42 (ddd, J= 4.1, 2.8, 1.2 Hz, 0.7H), 4.29–4.19 (m, 2H), 4.04 (dt, J= 2.8, 1.3 Hz, 1H), 3.97–3.89 (m, 1H), 3.88–3.78 (m, 3H), 3.73–3.60 (m, 3H), 3.54 (m, 3H), 2.00 (d, J= 1.8 Hz, 3H).

步骤 3: 向 50 mL 离心管中分别加入 5 mL 去离子水、化合物 4(100 mg, 0.21 mmol)、磷酸钾(684 mg, 3.22 mmol), 冰水浴降温至 0°C, 搅拌, 缓慢加入 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎗氯化物(CDMBI, 232 mg, 1.07 mmol), 0°C 反应半小时后升温至室温反应搅拌过夜。TLC 检测反应终点(二氯甲烷:甲醇=10:2, 含 1%浓氨水)。反应完全, 通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水/甲醇=20:1-10:1), 收集组分浓缩后再冻干, 得化合物 G0(63 mg, 产率 66%)。

ESI-MS calc. for C₁₆H₂₆N₅O₁₀ [M+H]⁺ m/z= 448.2, found m/z= 448.2. ¹H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 7.49 (d, J= 4.8 Hz, 0.7H), 6.81 (d, J= 4.6 Hz, 0.3H), 6.09 (dd, J= 7.3, 2.3 Hz, 1H), 4.43 (d, J= 7.8 Hz, 0.7H), 4.38 (d, J= 7.9 Hz, 0.3H), 4.34 (m, 0.3H), 4.33–4.3 (m, 1H), 4.25–4.15 (m, 3H), 4.11 (m, 1H), 3.98 (dd, J= 3.4, 1.1 Hz, 0.7H), 3.74 (m, 1H), 3.67–3.57 (m, 3H), 3.53–3.44 (m, 3H), 3.40–3.35 (m, 1H), 1.99 (t, J= 1.9 Hz, 3H).

实施例 2: 化合物 G1 的合成



步骤 1: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 5 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液和化合物 5(230 mg, 0.58 mmol), 30°C 水浴条件下搅拌, 用注射器针头持续通入氧气(O₂), 通入时间约为 0.5 小时; 另取 5 mL 离心管, 依次加入 1 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 280 U 半乳糖氧化酶(galactose oxidase), 10 kU 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase), 200 kU 过氧化氢酶(catalase), 0.16 mL 1 mM 硫酸铜水溶液, 于 30°C 水浴活化 0.5 小时。之后再将活化的混合酶加入到 100 mL 单口反应瓶中, 30°C 水浴反应 6 小时。待反应完成后停止通入氧气, 制备的化合物 6 无需纯化直接进入下一步反应。

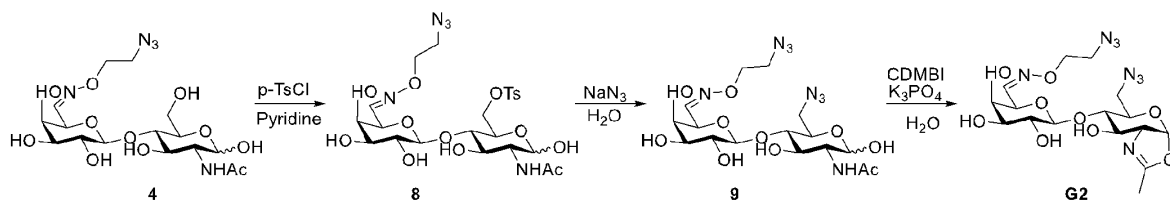
步骤 2: 在上一步的反应液中加入化合物 3(130 μL, 1.27 mmol), 25°C 反应过夜, TLC 监测反应情况(异丙醇:浓氨水:去离子水=10:3:2)。反应完成, 旋蒸出大部分水(>90%), 再加入 20 mL 甲醇, 过滤除去不溶物, 分别用 10 mL

甲醇洗涤沉淀两次，滤液旋干，通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1-5:1)。收集组分浓缩后得到化合物 **7**(150 mg, 两步产率 54%)。

步骤 3: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 10 mL 去离子水和化合物 **7**(150 mg, 0.31 mmol)，降温至 0°C 搅拌，加入磷酸钾(1020 mg, 4.81 mmol)，反应液再降温至 -3 - 0°C，加入 CDMBI(330 mg, 1.52 mmol)，0°C 条件下反应过夜。TLC 检测反应终点(异丙醇:浓氨水:去离子水=50:5:4)。反应完成，过滤除去不溶物，用 3 mL 水洗涤不溶物。滤液用 C18 柱色谱法纯化(5%-15%的甲醇-水溶液)，制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术，LC 2100)，收集组分浓缩后冻干得到化合物 **G1**(86 mg, 产率 60%)。

ESI-MS calc. for $C_{16}H_{26}N_5O_9S$ $[M+H]^+$ $m/z=464.1$, found $m/z=464.1$. 1H NMR (400MHz, deuterium oxide) δ 7.48 (d, $J=5.4$ Hz, 0.7H), 6.91 (d, $J=5.6$ Hz, 0.3H), 6.01 (d, $J=7.56$, 2.3 Hz, 1H), 4.51 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J=8.4$ Hz, 0.3H), 4.41-4.44 (m, 1H), 4.25 (d, $J=5.2$ Hz, 0.7H), 4.17 (d, $J=5.6$ Hz, 0.3H), 4.17-4.15 (m, 2H), 4.10-4.04(m, 1H), 3.98 (d, $J=5.4$ Hz, 0.7H), 3.76-3.74 (m, 1H), 3.64-3.53 (m, 2H), 3.49-3.34 (m, 4H), 2.91 (t, $J=8.6$ Hz, 1H), 1.95 (d, $J=1.6$ Hz, 3H).

实施例 3: 化合物 **G2** 的合成



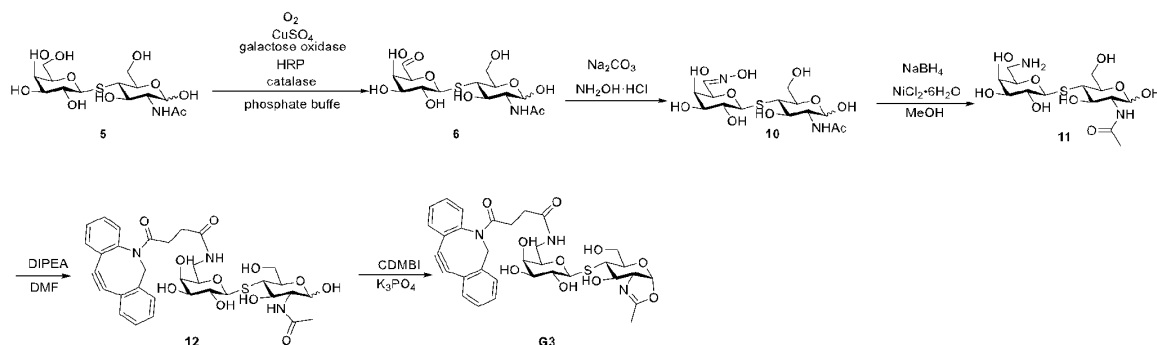
步骤 1: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL 吡啶和化合物 **4**(200 mg, 0.43 mmol)，充入氮气，体系降温至 -15°C。将对甲苯磺酰氯(p-TsCl, 410 mg, 2.15 mmol)溶于 5 mL 吡啶，用注射器滴加到 100 mL 三口反应瓶中，-15°C 左右反应过夜。TLC 检测反应终点(二氯甲烷:甲醇=10:1, 含 0.1%浓氨水)。反应完成，加入 15 mL 二氯甲烷稀释，然后通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1-10:1)，收集组分浓缩后得到化合物 **8** 粗品(140 mg, 产率 53%)。

步骤 2: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 8 mL 去离子水、化合物 **8** 粗品(140 mg, 0.23 mmol)、叠氮化钠(235 mg, 3.61 mmol)，充入氮气，60°C 左右反应搅拌 40 小时。反应完成，反应液过滤，滤液通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水:甲醇=10:1-5:1)，收集组分浓缩后得到化合物 **9** (90 mg, 产率 81%)。

步骤 3: 向 100 mL 单口反应瓶中加入 10 mL 去离子水和化合物 **9** (90 mg, 0.18 mmol)，反应液降温至 0°C 左右。向单口反应瓶中加入磷酸钾(584 mg, 2.75 mmol)后，反应液再降温至 -3 - 0°C，加入 CDMBI (200 mg, 0.92 mmol)，0°C 左右反应搅拌过夜。TLC 检测反应终点(异丙醇:浓氨水:去离子水=50:5:4)。反应完成后，反应液过滤除去不溶物，用 3 mL 水洗涤不溶物。滤液用 15 mL 甲苯分别洗三次洗涤除去杂质。水相通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水:甲醇=5:1-3:1, 含 0.1%浓 $NH_3 \cdot H_2O$)，收集组分浓缩后再冻干得到化合物 **G2** (46 mg, 产率 53%)

ESI-MS calc. for $C_{16}H_{25}N_5O_9$ $[M+H]^+$ $m/z=473.1$, found $m/z=473.1$. 1H NMR (400MHz, deuterium oxide) δ 7.54 (d, $J=5.2$ Hz, 0.7H), 6.87 (d, $J=5.8$ Hz, 0.3H), 6.01 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=8.4$ Hz, 0.7H), 4.34 (d, $J=8.2$ Hz, 0.3H), 4.31 (d, $J=5.8$ Hz, 0.3H), 4.29-4.26 (m, 1H), 4.21-4.14 (m, 3H), 4.08 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J=4.2$ Hz, 0.7H), 3.68 (t, $J=8.2$ Hz, 1H), 3.61-3.47 (m, 3H), 3.47-3.42 (m, 3H), 3.39-3.35 (m, 1H), 1.96 (d, $J=1.4$ Hz, 3H).

实施例 4: 化合物 **G3** 的合成



步骤 1: 向 1000 mL 单口反应瓶中分别加入化合物 **5** (2.83 g, 7.1 mmol)和 115 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液，

30°C 水浴条件下搅拌, 用注射器针头持续通入氧气(O₂), 通入时间约为 0.5 小时; 另取 50 mL 离心管, 依次加入 10 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 3 kU 半乳糖氧化酶(galactose oxidase), 30 kU 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase), 600 kU 过氧化氢酶(catalase), 1.8 mL 1 mM 硫酸铜水溶液, 于 30°C 水浴活化 0.5 h。之后再将活化的混合酶加入到 1000 mL 单口反应瓶中, 30°C 水浴反应 6 小时。待反应完成后停止通入氧气, 制备的化合物 6 无需纯化直接进入下一步反应。

步骤 2: 向上一部的反应体系中分别加入碳酸钠(Na₂CO₃, 376 mg, 3.5 mmol)和盐酸羟胺(NH₂OH·HCl, 542 mg, 6.4 mmol), 于 25°C 反应过夜, TLC 监测反应情况(异丙醇:浓氨水:去离子水=10:2:1)。反应完成, 向体系 100 mL 甲醇之后过滤除去不溶物, 滤液旋干, 通过 C18 柱(5%甲醇-水溶液)纯化, 收集组分浓缩后得到化合物 10(2.68 g, 产率 92%)。

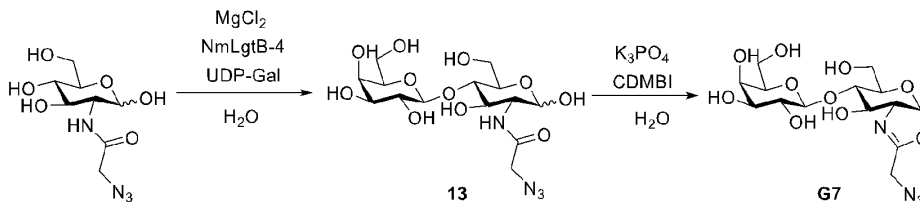
步骤 3: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入化合物 10(2.68 g, 6.5 mmol), 50 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 100 mL 甲醇, 搅拌, 降温到 0°C, 分别加入六水氯化镍(NiCl₂·6H₂O, 3.2 g, 13.5 mmol), 硼氢化钠(NaBH₄, 1.2 g, 31.7 mmol), 0°C 反应过夜。反应完成, 反应液过滤, 滤液通过酰胺柱色谱法纯化(Welch HILIC Amide, 10 μm, 21.2x250 mm, 90%-50%的乙腈-水溶液), 收集组分浓缩后得到化合物 11(1.85 g, 产率 71%)。

步骤 4: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 5 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 化合物 11(113 mg, 0.28 mmol), N,N-二异丙基乙胺(DIPEA, 181 μL, 0.742 g/mL at 25°C, 1.04 mmol), 化合物 20(DBCO-COOSu, 167 mg, 0.42 mmol), 室温反应过夜。TLC 检测反应终点(异丙醇:浓氨水:去离子水=25:5:3)。反应完成, 旋干溶剂, 通过硅胶柱色谱法纯化(甲醇:二氯甲烷=1:9-1:4), 收集组分浓缩后得化合物 12(163 mg, 产率 91%)。

步骤 5: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 16 mL 去离子水, 化合物 12(163 mg, 0.24 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾(756 mg, 3.56 mmol), 维持反应温度在 0°C, 加入 CDMBI(285 mg, 1.31 mmol), 0°C 左右反应搅拌过夜。TLC 检测反应终点(异丙醇:浓氨水:去离子水=25:5:3)。反应完成, 反应液过滤, 用 3 mL 水洗涤沉淀。收集滤液, 用 30 mL 甲苯分别洗涤滤液四次, 去除杂质。水相通过 C18 柱色谱法纯化(20%-50%的乙腈-水溶液), 收集组分浓缩后冻干得化合物 G3(白色固体产物, 70 mg, 产率 44%)。

ESI-MS calc. for C₃₃H₃₈N₃O₁₀S [M+H]⁺ m/z = 668.2, found m/z = 668.2. ¹H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 8.21 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30–7.16 (m, 5H), 7.09 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.32–4.10 (m, 2H), 3.91 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.71–3.62 (m, 2H), 3.52 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.46–3.28 (m, 3H), 3.26–3.02 (m, 3H), 3.01–2.91 (m, 1H), 2.74 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 2.41–2.29 (m, 1H), 2.06 (s, 2H), 1.86 (d, J = 1.6 Hz, 3H).

实施例 5: 化合物 G7 的合成

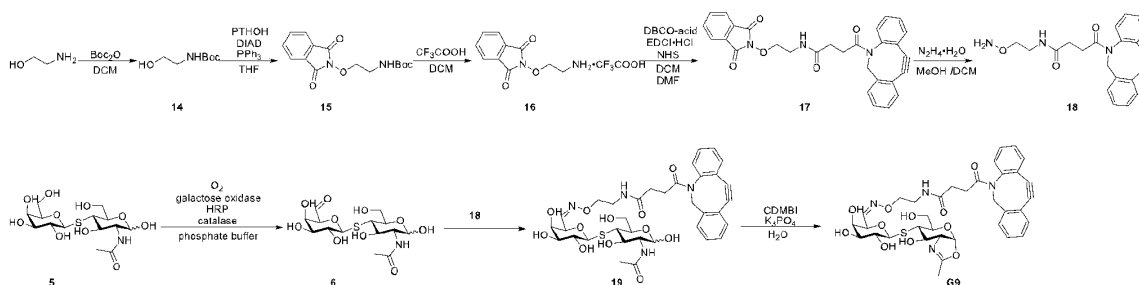


步骤 1: 分别称取 2-[(叠氮基乙酰基)氨基]-2-脱氧-D-葡萄糖(26.2 g, 100 mmol)和 64.1 g 的 UDP-Gal(尿苷 5'-二磷酸半乳糖二钠盐, 64.1 g, 105 mmol)加入 1000 mL 单口反应瓶中, 加入 600 mL 去离子水搅拌溶解, 加入 MgCl₂(4 g, 42 mmol), 加入 0.3 g β-1,4-半乳糖转移酶(NmLgtB-4)催化反应进行, 体系 pH 为 8.0, 反应温度 37°C, 搅拌速度 200 rpm, 反应过夜。反应完成后加入等体积乙醇除酶, 离心后, 上清液浓缩。浓缩液经电渗析纯化, 过膜浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 收集组分浓缩后得到化合物 13(8.2 g, 产率 19%)。

步骤 2: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 10 mL 去离子水和化合物 13(100 mg, 0.24 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾(610 mg, 2.87 mmol), 再降温-3-0°C, 加入 CDMBI(220 mg, 1.01 mmol), 0°C 左右反应搅拌过夜。TLC 检测反应终点。反应完成, 反应液过滤除去不溶物, 用 3 mL 水洗涤不溶物。滤液用 15 mL 甲苯分三次洗涤, 水相通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水:甲醇=5:1-3:1, 含 0.1%浓氨水), 收集组分浓缩后再冻干得化合物 G7(51 mg, 产率 52%)。

HRMS calc. for C₁₄H₂₃N₄O₁₀ [M+H]⁺ m/z = 407.14153, found m/z = 407.14003. ¹H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 5.99 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.22–4.17 (m, 2H), 4.07–4.05 (m, 1H), 3.96 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 1H), 3.7 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.61–3.38 (m, 8H), 3.27–3.21 (m, 2H).

实施例 6: 化合物 G9 的合成



步骤 1: 向 1000 mL 三口反应瓶中分别加入 500 mL 二氯甲烷, 2-氨基乙醇(10 g, 164 mmol), 三乙胺(34 mL, 245 mmol), 充入氮气, 0°C下加入二碳酸二叔丁酯(Boc₂O, 35.7 g, 164 mmol),在室温条件下搅拌反应 4-5 小时。反应完成后, 旋干二氯甲烷, 加入 300 mL 乙酸乙酯溶解, 200 mL 饱和氯化铵溶液洗涤, 100 mL 水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 溶液浓缩得化合物 **14**(20 g, 产率 76%)。

步骤 2: 向 2 L 三口反应瓶中分别加入 1 L 四氢呋喃(THF), 化合物 **14**(20 g, 124 mmol), N-羟基邻苯二甲酰亚胺(PTHOH, 21.2 g, 130 mmol), 三苯基膦(PPh₃, 35.8 g, 136 mmol), 充入氮气, 搅拌并将反应体系温度降至 0°C左右, 逐渐滴加偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD, 26.3 mL, 130 mmol), 0°C条件下反应过夜, TLC 检测反应完全(石油醚:乙酸乙酯=2:1)。反应完成, 向反应液中加入 500 mL 乙酸乙酯, 有机相分别用 200 mL 饱和氯化钠水溶液洗涤和 200 mL 去离子水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1-1:1), 得 41 g 化合物 **15**粗品, 直接用于下一步反应。

步骤 3: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 6 mL 二氯甲烷, 化合物 **15**粗品(1.25 g, 4.08 mmol), 三氟醋酸(CF₃COOH, 3.0 mL, 39.18 mmol), 室温反应 2 小时。TLC 监测反应终点(石油醚:乙酸乙酯=10:1)。反应完成, 浓缩, 油泵抽干, 获得 1.3 g 化合物 **16**粗品, 未经纯化, 直接用于下一步反应。

步骤 4: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 6 mL 二氯甲烷, DBCO-acid (CAS:1353016-70-2, 0.5 g, 1.64 mmol), N-羟基丁二酰亚胺 (HNS, CAS: 6066-82-6, 0.28 g, 2.43 mmol)和 EDCI · HCl (CAS: 7084-11-9, 0.47 g, 2.45 mmol), 室温搅拌反应 3-4 小时, 再加入化合物 **16**粗品 (1.3 g, 4.06 mmol)和 N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA, 3 mL, 17.22 mmol)室温搅拌反应 2-3 小时, TLC 检测反应终点(石油醚:乙酸乙酯=10:1)。反应完成, 过滤除去不溶物, 10 mL 二氯甲烷淋洗不溶物两次, 滤液用 20 mL 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次, 有机相无水硫酸钠干燥, 浓缩过硅胶柱 (石油醚:乙酸乙酯=1:1-1:2), 得化合物 **17**(0.23 g, 产率 29%)。

步骤 5: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 4 mL 二氯甲烷、2 mL 甲醇和化合物 **17** (0.42 g, 0.85 mmol), 再加入水合肼 (N₂H₄ · H₂O, 36 μL, 0.94 mmol), 室温反应 2 小时, TLC 监测反应终点(二氯甲烷:甲醇=5:1)。反应完成, 加入 40 mL 去离子水, 水相用 20 mL 二氯甲烷萃取三次, 合并有机相, 用 20 mL 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后硅胶柱(甲醇:二氯甲烷=1:19-1:9), 得化合物 **18** (0.2 g, 产率 65%)。

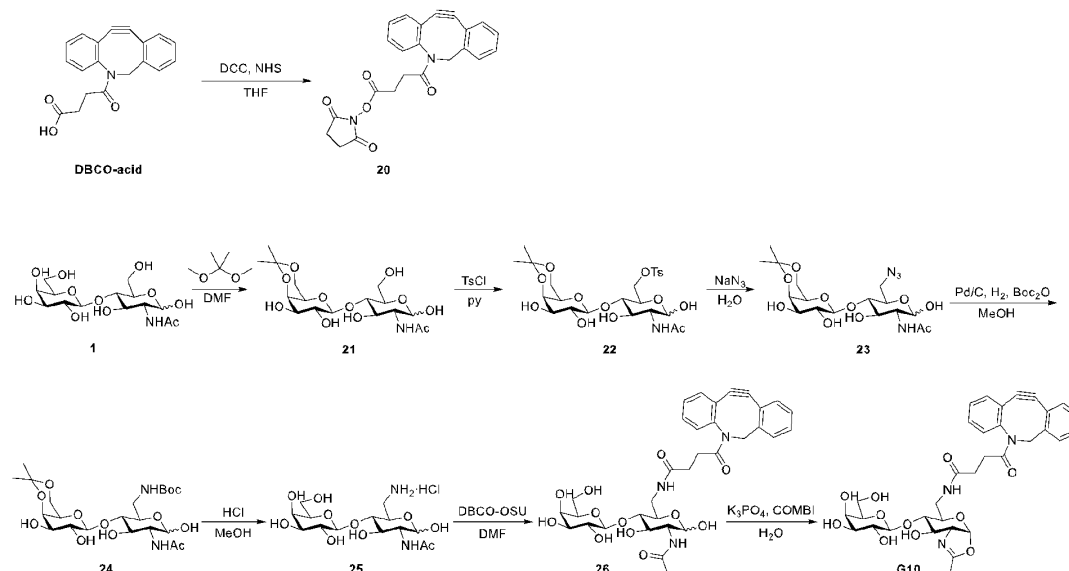
步骤 6: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 5 mL 50 mM pH7.0 磷酸缓冲液和化合物 **5** (120 mg, 0.30 mmol), 30°C水浴条件下搅拌, 用注射器针头持续通入氧气(O₂), 通入时间约为 0.5 小时; 另取 5 mL 离心管, 依次加入 1 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 280 U 半乳糖氧化酶(galactose oxidase), 10 kU 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase), 200 kU 过氧化氢酶(catalase), 0.16 mL 1 mM 硫酸铜水溶液, 于 30°C水浴活化 0.5 小时。之后再将活化的混合酶加入到 100 mL 单口反应瓶中, 30°C水浴反应 6 小时。待反应完成后停止通入氧气, 制备的化合物 **6**无需纯化直接进入下一步反应。

步骤 7: 向 100 mL 单口反应瓶中加入化合物 **18** (120 mg, 0.33 mmol), 25°C反应过夜, TLC 监测反应情况(异丙醇:浓氨水:去离子水=10:2:1)。反应完成, 旋蒸出大部分水 (>90%), 再加入 20 mL 甲醇充分溶解, 过滤除去不溶物, 10 mL 甲醇洗涤不溶物两次, 滤液浓缩后通过硅胶柱色谱法纯化 (二氯甲烷:甲醇=15:1-6:1)。收集组分后再次浓缩后通过 C18 柱色谱法纯化 (30%-70%乙腈-水溶液)。收集组分得到化合物 **19** (120 mg, 产率 54%)。

步骤 8: 向 100 mL 单口反应瓶中加入分别 15 mL 去离子水和化合物 **19** (120 mg, 0.16 mmol), 反应体系降温至 0°C左右, 加入磷酸钾(514 mg, 2.42 mmol), 再降温至 0°C, 加入 CDMBI (175 mg, 0.81 mmol), 0°C左右搅拌反应过夜。TLC 检测反应终点 (异丙醇:浓氨水:去离子水=50:5:3)。反应完成, 过滤除去不溶物, 用 3 mL 水洗涤不溶物。滤液通过 C18 柱色谱法纯化(30%-70%乙腈-水溶液), 收集组分后浓缩后冻干, 可得化合物 **G9** (白色固体产物, 45 mg, 产率 39%)。

ESI-MS calc. for $C_{35}H_{43}N_4O_{12}S [M+H_2O+H]^+$ $m/z = 743.3$, found $m/z = 743.3$. 1H NMR (400MHz, deuterium oxide) δ 7.68 (d, $J = 5.2$ Hz, 0.7H), 7.56-7.35 (m, 8H), 6.84 (d, $J = 5.2$ Hz, 0.3H), 6.18-6.13 (m, 1H), 5.10 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 7.4$ Hz, 0.7H), 4.54-4.52 (m, 1H), 4.33 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 0.3H), 4.18-4.16 (m, 1H), 4.07 (s, 1H), 4.03-3.80 (m, 4H), 3.76-3.58 (m, 3H), 3.54-3.46 (m, 1H), 3.34-3.19 (m, 2H), 3.04 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 2.57-2.49 (m, 1H), 2.29-2.15 (m, 3H), 2.08-2.01 (m, 3H).

实施例 7: 化合物 G10 的合成



步骤 1: 向 100 mL 单口瓶中分别加入 10 mL 四氢呋喃, 11,12-二脱氢- γ -氧代二苯并[b,f]氮杂辛烷-5(6H)-丁酸 (DBCO-acid, 0.5 g, 1.64 mmol), N,N' -二环己基碳二亚胺(DCC, 0.35 g, 1.70 mmol)和 N -羟基琥珀酰亚胺(NHS, 0.2 g, 1.74 mmol), 充入氮气, 室温反应过夜。反应完成, 过滤掉固体, 滤液浓缩后过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=2:1-1:1), 收集组分后浓缩得化合物 **20**(0.4 g, 产率 61%)。

步骤 2: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 260 mL N,N -二甲基甲酰胺, 化合物 **1**(5 g, 13 mmol)和 2, 2-二甲氧基丙烷(18.8 g, 181 mmol), 搅拌, 室温下加入对甲苯磺酸($TsOH$, 0.2 g, 1.2 mmol), $25^\circ C$ 搅拌 30 分钟。反应完成后, 冰浴条件下加入碳酸氢钠固体淬灭反应, 提至室温继续搅拌 1 小时, 过滤掉固体, 滤液浓缩后用乙酸乙酯打浆, 超声震荡 30 分钟, 过滤, 淋洗并收集滤饼, 用油泵干燥得到化合物 **21**(3.5 g, 产率 64%)。

步骤 3: 向 250 mL 三口反应瓶中分别加入 100 mL 吡啶和化合物 **21**(3.5 g, 8.27 mmol), 置换氮气, 反应体系降温至 $-20^\circ C$, 开启搅拌, 分批加入对甲苯磺酰氯(5.5 g, 28.85 mmol), 继续 $-20^\circ C$ 反应过夜。TLC 检测反应主点为产物(二氯甲烷:甲醇=20:1)。反应完成, 加入 100 mL 饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应, 浓缩后通过硅胶柱色谱法纯化(甲醇:二氯甲烷=1:9-2:8), 收集组分后浓缩后, 得化合物 **22**(2.6 g, 产率 54%)。

步骤 4: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 30 mL 去离子水, 化合物 **22**(1.5 g, 2.60 mmol)和叠氮钠(2.5 g, 38.46 mmol), $60^\circ C$ 反应 36 小时, TLC 监测反应终点(二氯甲烷:甲醇=20:1)。反应完成, 通过 C18 柱色谱法纯化(5%-15% 甲醇-水溶液), 将收集组分旋干至 20 mL 后冻干, 得化合物 **23**(0.8 g, 产率 68%)。

步骤 5: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL 甲醇, 化合物 **23**(0.8 g, 1.78 mmol)和二碳酸二叔丁酯(Boc_2O , 0.6 g, 2.75 mmol), 置换 3 次氮气, 加入 Pd/C (80 mg, 0.18 mmol), 置换 3 次氢气, 在氢气球条件下室温搅拌 2 小时。TLC 检测应终点(二氯甲烷:甲醇=10:1)。反应完成, 用硅藻土过滤, 浓缩后通过 C18 柱色谱法纯化(5%-20% 甲醇-水溶液), 将收集组分旋干得化合物 **24**(0.4 g, 产率 43%)。

步骤 6: 向 50 mL 两口反应瓶中分别加入 2 mL 甲醇、10 mM 氯化氢的乙醇溶液(0.2 mL)和化合物 **24**(0.1 g, 0.19 mmol), 室温搅拌 2 小时。TLC 检测应终点(异丙醇:水:浓氨水=20:4:5)。反应完成, 旋干溶剂, 通过 C18 柱色谱法纯化(5% 甲醇水溶液), 将收集组分旋干至 10 mL 后再冻干, 得到化合物 **25**(30 mg, 产率 38%)。

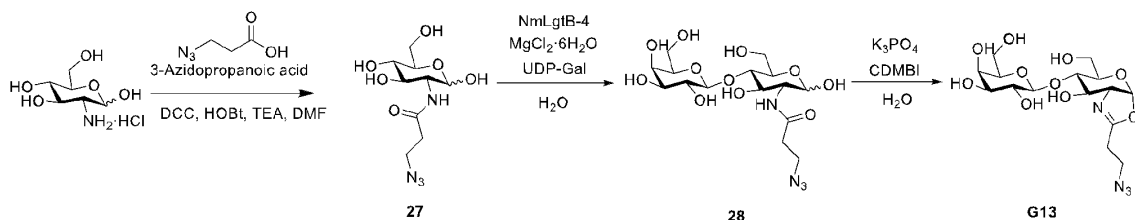
步骤 7: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 2 mL N,N -二甲基甲酰胺, 化合物 **25**(40 mg, 0.10 mmol), 化合物 **20**(64 mg, 0.16 mmol)和三乙胺(TEA, 80 mg, 0.50 mmol)。室温搅拌反应 2 小时。反应完成, 旋干 DMF, 通过 C18

柱色谱法纯化(20%-50%甲醇水溶液), 洗脱液浓缩到 5 mL 左右, 得到化合物 **26**(30 mg, 产率 45%)。

步骤 8: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 5 mL 水和化合物 **26**(30 mg, 0.04 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾(142 mg, 0.67 mmol), 再降温 -3 - 0°C, 加入 CDMBI(48 mg, 0.22 mmol), 0°C 左右搅拌反应过夜。TLC 检测反应终点(异丙醇:浓氨水:去离子水=50:5:4)。反应完成, 反应液过滤除去不溶物, 用 3 mL 去离子水洗涤滤饼。滤液用 15 mL 甲苯洗涤三次, 除去杂质。通过 C18 柱色谱法纯化(20%-50%甲醇水溶液), 洗脱液旋蒸出甲醇, 再冻干, 可得化合物 **G10** (26 mg, 产率 99%)。

ESI-MS calc. for $C_{33}H_{38}N_3O_{11}$ $[M+H]^+$ $m/z = 652.3$, found $m/z = 652.3$. 1H NMR (400MHz, deuterium oxide) δ 7.68-7.34 (m, 8H), 6.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 4.44-4.36 (m, 2H), 3.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.68-3.49 (m, 5H), 3.46-3.32 (m, 3H), 2.64-2.53 (m, 1H), 2.34-2.13 (m, 3H), 2.00-1.95 (m, 3H).

实施例 8: 化合物 **G13** 的合成



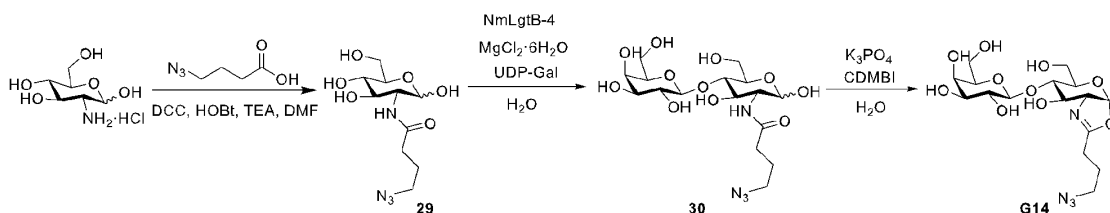
步骤 1: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL N,N -二甲基甲酰胺, D -葡萄糖胺盐酸盐(1.1 g, 5.10 mmol), N,N' -二环己基碳二亚胺(DCC, 1.16 g, 5.62 mmol), 1-羟基苯并三唑(HOBt, 0.76 g, 5.62 mmol)和三乙胺(TEA, 0.57 g, 5.62 mmol), 搅拌均匀, 冰水浴下, 加入 3-叠氮丙酸(3-Azidopropanoic acid, 0.65 g, 5.62 mmol), 加完后, 恢复室温搅拌反应过夜, 直接浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 减压浓缩得到化合物 **27**(380 mg, 产率 27%)。

步骤 2: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 20 mL 去离子水, 化合物 **27**(380 mg, 1.38 mmol)和 UDP-Gal(790 mg, 1.29 mmol), 搅拌, 加入适量的金属盐离子 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.1 g), 在 β -1,4-半乳糖转移酶(NmLgtB-4, 0.06 g)的作用下进行反应, 反应液 pH 为 8.0, 反应温度 37°C, 搅拌转速 200 rpm 过夜反应。反应完后加入等体积乙醇除酶, 浓缩。后经电渗析纯化, 过膜浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 减压浓缩得到化合物 **28**(120 mg, 收率 21%)。

步骤 3: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 10 mL 去离子水, 化合物 **28**(100 mg, 0.23 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾(580 mg, 2.73 mmol), 再降温 -3 - 0°C, 加入 CDMBI(210 mg, 0.97 mmol), 反应温度维持在 0°C 左右搅拌反应过夜。TLC 检测反应终点。反应完成, 过滤除去不溶物, 用 3 mL 水洗涤滤饼。滤液用 15 mL 甲苯洗涤, 除去杂质。水相通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水:甲醇=5:1-3:1, 含 0.1%浓氨水), 收集组分浓缩后冻干, 得化合物 **G13**(58 mg, 产率 60%)。

ESI-MS calc. for $C_{15}H_{24}KN_4O_{10}$ $[M+K]^+$ $m/z = 459.1$, found $m/z = 459.1$. 1H NMR (400MHz, deuterium oxide) δ 6.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.33-4.28 (m, 2H), 4.12 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.78 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.71-3.46 (m, 9H), 3.42-3.435 (m, 2H), 2.58 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H).

实施例 9: 化合物 **G14** 的合成



步骤 1: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL N,N -二甲基甲酰胺, D -葡萄糖胺盐酸盐(1.1 g, 5.10 mmol), N,N' -二环己基碳二亚胺(DCC, 1.16 g, 5.62 mmol), 1-羟基苯并三唑(HOBt, 0.76 g, 5.62 mmol)和三乙胺(TEA, 0.57 g, 5.62 mmol), 搅拌均匀, 冰水浴下, 加入 4-叠氮丁酸(4-Azidobutyric acid, 0.73 g, 5.62 mmol), 加完后, 恢复室温搅拌反应过夜, 直接浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 减压浓缩得到化合物 **29**(320 mg, 产率

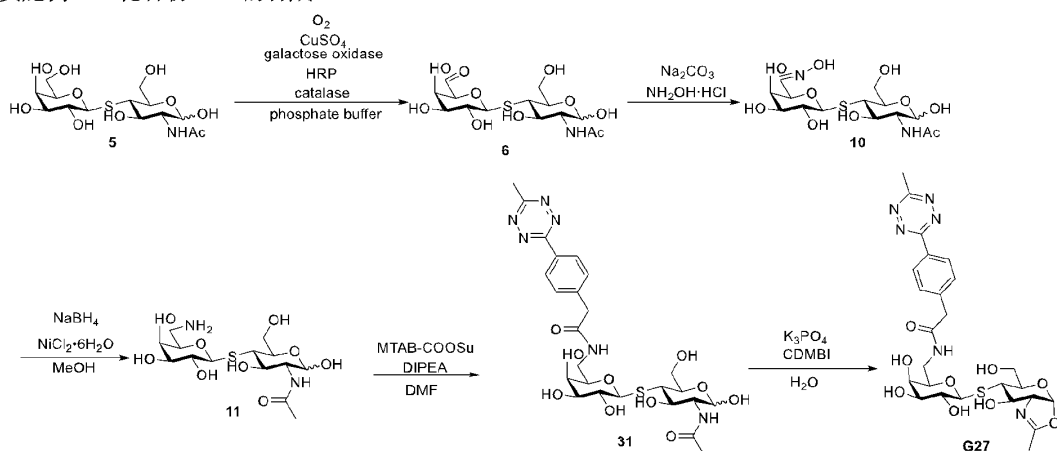
22%)。

步骤 2: 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 20 mL 去离子水, 化合物 **29**(320 mg, 1.10 mmol) 和 UDP-Gal(730 mg, 1.20 mmol), 搅拌, 加入适量的金属盐离子 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), 在 β -1,4-半乳糖转移酶(NmLgtB-4, 0.06 g)的作用下进行反应, 反应液 pH 为 8.0, 反应温度 37°C, 搅拌转速 200 rpm 过夜反应。反应完后加入等体积乙醇除酶, 浓缩。后经电渗析纯化, 过膜浓缩, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 减压浓缩得到化合物 **30**(130 mg, 收率 26%)。

步骤 3: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 10 mL 去离子水, 化合物 **30**(100 mg, 0.22 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾(580 mg, 2.73 mmol), 再降温 -3 - 0°C, 加入 CDMBI(210 mg, 0.97 mmol), 反应温度维持在 0°C 左右搅拌反应过夜。TLC 检测反应终点。反应完成, 过滤除去不溶物, 用 3 mL 水洗涤滤饼。滤液用 15 mL 甲苯洗涤, 除去杂质。水相通过 C18 柱色谱法纯化(去离子水:甲醇=5:1-3:1, 含 0.1% 浓氨水), 收集组分浓缩后冻干, 得化合物 **G14**(61 mg, 产率 64%)。

ESI-MS calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{10} [\text{M}+\text{K}]^+$ $m/z = 473.1$, found $m/z = 473.1$. ^1H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 5.099 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.33–4.28 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.71–3.46 (m, 7H), 3.40–3.34 (m, 1H), 3.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 2.37 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.77–1.86 (m, 2H).

实施例 10: 化合物 **G27** 的合成



步骤 1: 向 1000 mL 单口反应瓶中分别加入 115 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液和化合物 **5**(2.83 g, 7.09 mmol), 30°C 水浴条件下搅拌, 用注射器针头持续通入氧气(O_2), 通入时间约为 0.5 小时; 另取 50 mL 离心管, 依次加入 10 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 3 kU 半乳糖氧化酶(galactose oxidase), 30 kU 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase), 600 kU 过氧化氢酶(catalase), 1.8 mL 1 mM 硫酸铜水溶液, 于 30°C 水浴活化 0.5 小时。之后再将活化的混合酶加入到 1000 mL 单口反应瓶中, 30°C 水浴反应 6 小时。待反应完成后停止通入氧气, 制备的化合物 **6** 无需纯化直接进入下一步反应。

步骤 2: 在上一步的反应液中分别加入碳酸钠(Na_2CO_3 , 306 mg, 2.89 mmol)和盐酸羟胺($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 442 mg, 6.36 mmol), 25°C 反应过夜, TLC 监测反应情况(异丙醇:浓氨水:去离子水=10:2:1)。反应完成, 向反应体系加入 100 mL 甲醇, 过滤除去不溶物, 滤液旋干后通过 C18 柱色谱法纯化(5% 甲醇的水溶液), 得到化合物 **10** (2.68 g, 产率 92%)。

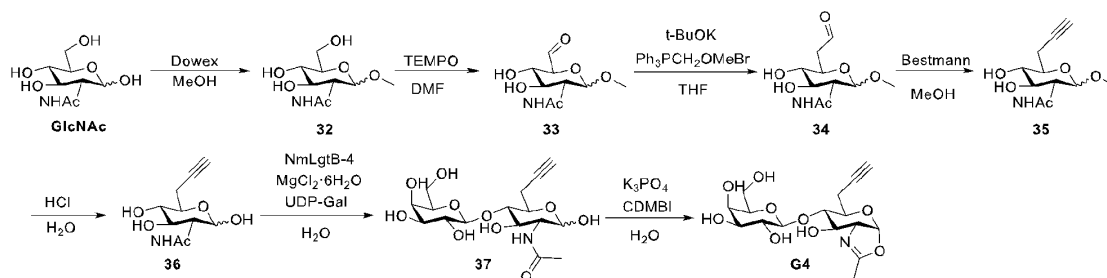
步骤 3: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入化合物 **10** (2.68 g, 6.5 mmol), 50 mL 50 mM pH 7.0 磷酸缓冲液, 100 mL 甲醇, 搅拌, 降温到 0°C, 分别加入六水氯化镍($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.2 g, 13.5 mmol), 硼氢化钠(NaBH_4 , 1.2 g, 31.7 mmol), 0°C 反应过夜。反应完成, 反应液过滤, 滤液通过酰胺柱色谱法纯化(Welch HILIC Amide, 10 μm , 21.2x250 mm, 90%-50% 的乙腈-水溶液), 收集组分浓缩后得到化合物 **11**(1.85 g, 产率 71%)。

步骤 4: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 5 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 化合物 **11**(250 mg, 0.63 mmol), N,N-二异丙基乙胺(DIPEA, 330 μL , 0.742 g/mL at 25°C, 1.89 mmol), 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)乙酸酯(MTAB-COOSu, 310 mg, 0.95 mmol), 室温反应过夜。TLC 检测反应终点 (异丙醇:浓氨水:去离子水=25:5:3)。反应完成, 旋干溶剂, 通过硅胶柱色谱法纯化(甲醇:二氯甲烷=3:17-3:7), 收集组分浓缩后得化合物 **31**(300 mg, 产率 78%)。

步骤 5: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 30 mL 去离子水和化合物 **31** (300 mg, 0.49 mmol), 反应体系降温至 0°C 左右, 加入磷酸钾 (1.56 g, 7.35 mmol), 再降温 0°C, 加入 CDMBI (533 mg, 2.46 mmol), 0°C 左右反应搅拌过夜。TLC 检测反应终点 (异丙醇:浓氨水:去离子水=25:5:3)。反应完成, 过滤除去不溶物, 用 3 mL 去离子水洗涤不溶物。滤液用 30 mL 甲苯 30 mL 洗涤水相三次, 除去杂质。水相经 C18 柱色谱法纯化 (20%-50% 乙腈-水溶液), 收集组分浓缩后再冻干, 得化合物 **G27** (46 mg, 产率 16%)。

ESI-MS calc. for $C_{25}H_{33}N_6O_9S$ $[M+H]^+$ $m/z = 593.2$, found $m/z = 593.2$. 1H NMR (400 MHz, deuterium oxide) δ 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.99 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.69 (s, 2H), 3.54–3.49 (m, 2H), 3.47–3.43 (m, 1H), 3.38–3.32 (m, 2H), 3.28–3.20 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.82 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.86 (d, $J = 1.6$ Hz, 3H)。

实施例 11: 化合物 **G4** 的合成



步骤 1: 向 2L 单口反应瓶中分别加入 1L 甲醇和 50 g N-乙酰基-D-氨基葡萄糖 (GlcNAc, 0.23 mol), 室温搅拌溶解。再加入 100 g 阳离子树脂 Dowex (H^+), 体系温度加热至 70°C 搅拌 24 小时。降温至室温, 过滤除掉滤渣, 滤液减压浓缩得 38.4 g 白色固体化合物 **32**, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 2: 向 2L 三口反应瓶中分别加入 1 L DMF 和化合物 **32** (20 g, 85.02 mmol), 室温搅拌溶解, 再依次加入碳酸氢钠 (214.5 g, 2.55 mol) 和四甲基哌啶氧化物 (0.4 g, 2.56 mmol)。体系置换成氮气保护, 降温至 0°C 左右, 再加入三氯异氰尿酸 (19.8 g, 85.02 mmol)。反应液在 0°C 搅拌 4 小时, 然后过滤除掉固体。滤液减压浓缩, 再通过硅胶柱色谱法纯化 (二氯甲烷:甲醇=20:1-10:1), 得到 9.5 g 类白色固体化合物 **33**, 收率为 48%。

步骤 3: 氮气保护和 0°C 下, 向 500 mL 三口反应瓶中分别加入 75 mL THF、(甲氧基甲基)三苯基溴化磷 (Ph_3PCH_2OMeBr , 15.0 g, 38.86 mmol)、叔丁醇钾 ($t-BuOK$, 4.33 g, 38.59 mmol) 的 THF (70 mL) 溶液, 然后在 0°C 下搅拌 2 小时。向其中加入化合物 **33** (5.0 g, 21.44 mmol) 的 THF (37 mL) 溶液, 然后升温至室温并继续搅拌 3 小时。反应液减压浓缩至原约体积 40%, 然后向其中加入 30% 的硫酸 (30 mL), 20°C 下搅拌 3 小时。用 2 M 的氢氧化钠水溶液, 在低温下将反应液 pH 调至 7 左右, 然后减压浓缩, 用甲醇 (150 mL) 复溶, 过滤除掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化 (二氯甲烷:甲醇=30:1-10:1), 得到 1.37 g 黄色固体化合物 **34**, 收率为 25%。

步骤 4: 氮气保护和 20°C 下, 向 50 mL 三口反应瓶分别加入 14 mL 甲醇、化合物 **34** (1.37 g, 5.54 mmol)、碳酸钾 (1.53 g, 11.1 mmol) 和 Bestmann 试剂 (1.49 g, 7.76 mmol)。反应液在 20°C 下搅拌 12 小时, 过滤除掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化 (乙腈:水=1:20-1:2), 得到 439 mg 黄色固体化合物 **35**, 收率为 32%。

步骤 5: 向 100 mL 两口反应瓶中分别加入 12 mL 6 M 盐酸溶液和化合物 **35** (1.37 g, 5.63 mmol), 60°C 搅拌反应 3 小时。反应液降至室温后, 用 1 M 氢氧化钠溶液调 pH 至 7 左右, 反应液减压浓缩, 通过 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:20), 得到 222 mg 类白色固体化合物 **36**, 收率为 53%。

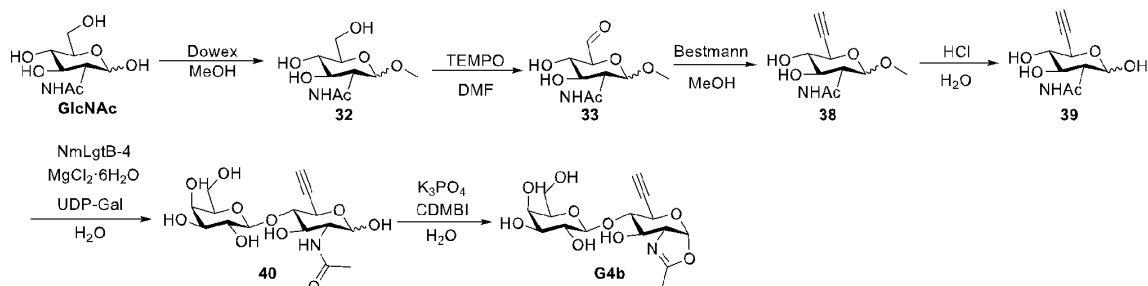
步骤 6: 室温条件下, 向 50 mL 两口反应瓶中分别依次加入化合物 **36** (222 mg, 0.97 mmol), UDP-Gal (590 mg, 1.06 mmol)、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (100 mg) 的去离子水 (20 mL) 溶液和 β 1,4 半乳糖转移酶 NmlgtB-4 (60 mg)。体系升至 37°C 搅拌反应过夜。加入等体积乙醇, 过滤除掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化 (二氯甲烷:甲醇=10:1) 得 214 mg 固体化合物 **37**, 收率为 56%。

步骤 7: 0°C 条件下, 向 100 mL 三口反应瓶中依次分别加入 10 mL 水、化合物 **37** (214 mg, 0.55 mmol)、磷酸钾 (1.74 g, 8.20 mmol) 和 CDMBI (0.6 g, 2.76 mmol)。反应液于 0°C 搅拌过夜, 过滤除掉固体, 滤液用甲苯 (10 mL $\times$ 3) 萃取, 合并水相后。水相通过 C18 制备纯化 (乙腈:水=1:10-1:3, 制备型高效液相色谱仪 (武汉睿合色谱技术, LC 2100)) 得 78 mg 白色固体化合物 **G4**, 收率为 38%。

ESI-MS calc. for $C_{16}H_{24}NO_9$ $[M+H]^+$ $m/z = 374.1$, found $m/z = 374.1$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 5.93 (d, $J = 7.4$ Hz,

1H), 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.23 (s, 1H), 4.07 – 4.03 (m, 1H), 3.78 (s, 1H), 3.74 – 3.53 (m, 5H), 3.51 (s, 1H), 3.42 – 3.35 (m, 2H), 2.56 (s, 1H), 2.52 – 2.46 (m, 1H), 1.92 (s, 3H).

实施例 12: 化合物 G4b 的合成



步骤 1: 向 2L 单口反应瓶中分别加入 1L 甲醇和 50 g N-乙酰基-D-氨基葡萄糖(GlcNAc, 0.23 mol), 室温搅拌溶解。再加入 100 g 阳离子树脂 Dowex(H⁺), 体系温度加热至 70°C 搅拌 24 小时。降温至室温, 过滤除掉滤渣, 滤液减压浓缩得 38.4g 白色固体化合物 32, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 2: 向 2L 三口反应瓶中分别加入 1 L DMF 和化合物 32(20 g, 85.02 mmol), 室温搅拌溶解, 再依次加入碳酸氢钠 (214.5 g, 2.55 mol)和四甲基哌啶氧化物(0.4 g, 2.56 mmol)。体系置换成氮气保护, 降温至 0 °C 左右, 再加入三氯异氰尿酸(19.8 g, 85.02 mmol)。反应液在 0 °C 搅拌 4 小时, 然后过滤除掉固体。滤液减压浓缩, 再通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1-10:1), 得到 9.5 g 类白色固体化合物 33, 收率为 48%。

步骤 3: 氮气保护和 20 °C 下, 向 250 mL 三口反应瓶分别加入 95 mL 甲醇、化合物 33(9.5 g, 40.73 mmol)、碳酸钾 (11.3 g, 81.76 mmol)和 Bestmann 试剂(10.2 g, 53.09 mmol)。反应液在 20 °C 下搅拌 14 小时, 过滤除掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1-15:1), 得到 5.95 g 黄色固体化合物 38, 收率为 63%。

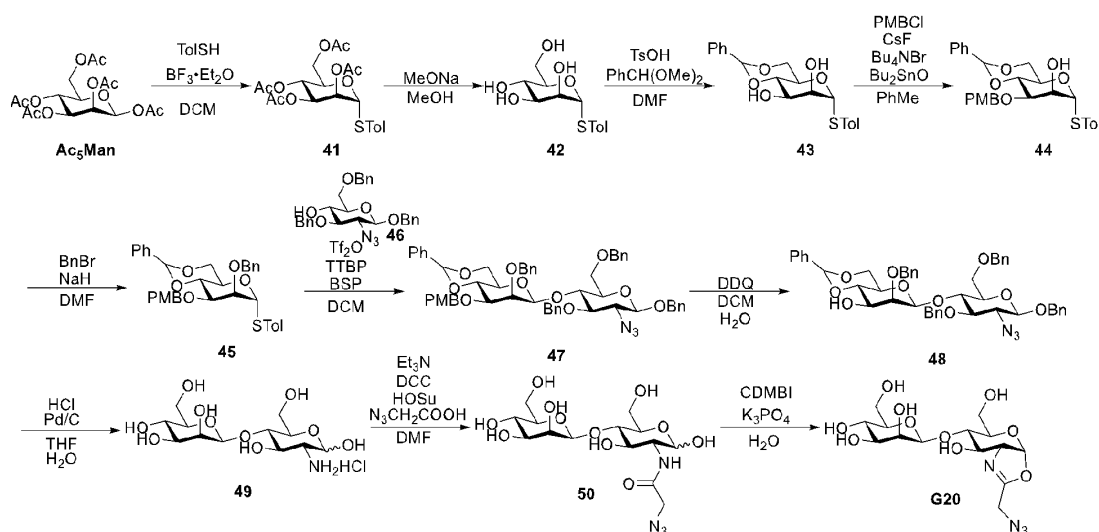
步骤 4: 向 100 mL 单口反应瓶中分别加入 29 mL 6 M 盐酸溶液和化合物 38 (1.0 g, 4.36 mmol), 60 °C 搅拌反应 5 小时。反应液降至室温后, 用 1 M 氢氧化钠溶液调 pH 至 7 左右, 反应液减压浓缩, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:20), 得到 460 mg 类白色固体化合物 39, 收率为 49%。

步骤 5: 室温条件下, 向 100 mL 单口反应瓶中分别依次加入化合物 39(460 mg, 2.14 mmol), UDP-Gal (1.31 g, 2.30 mmol)、MgCl₂·6H₂O (100 mg)的去离子水 (20 mL)溶液和 β1,4 半乳糖转移酶 NmLgtB-4 (60 mg)。体系升至 37°C 搅拌反应过夜。加入等体积乙醇, 过滤除掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1)得 320 mg 固体化合物 40, 收率为 39%。

步骤 6: 0 °C 条件下, 向 100 mL 三口反应瓶中依次分别加入 15 mL 水、化合物 40 (0.32g, 0.85 mmol)、磷酸钾 (2.7 g, 12.72 mmol)和 CDMBI (0.92 g, 4.24 mmol)。反应液于 0 °C 搅拌过夜, TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。过滤除掉固体, 滤液用甲苯(10 mL×3)萃取, 合并水相后。水相通过 C18 制备纯化(乙腈:水=1:10-1:3, 制备型高效液相色谱仪(武汉春合色谱技术, LC 2100)得 116 mg 白色固体化合物 G4b, 收率为 38%。

ESI-MS calc. for C₁₅H₂₂NO₉ [M+H]⁺ m/z = 360.1, found m/z = 360.1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.95 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.17 – 4.08 (m, 2H), 4.05 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.98 – 3.88 (m, 1H), 3.78 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.73 – 3.43 (m, 5H), 3.44 – 3.27 (m, 1H), 1.94 (s, 3H).

实施例 13: 化合物 G20 的合成



步骤 1: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 150 mL 二氯甲烷、五乙酰基甘露糖(Ac₅Man, 50 g, 0.128 mol)和 4-甲苯磺酚(TolSH, 25 g, 0.201 mol), 室温搅拌溶解。再加入三氟化硼乙醚(BF₃·Et₂O, 40 mL, 0.32 mol), 室温搅拌反应 3 小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)显示反应完全。反应液用二氯甲烷(450 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠(1000 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 得化合物 **41** 粗品, 以理论产量 58 g 投下一步。

步骤 2: 向 2.0 L 单口反应瓶中分别加入 600 mL 甲醇和化合物 **41**(58 g, 0.175 mol), 室温搅拌溶解。再加入 5 M MeONa 的甲醇溶液(40 mL), 室温搅拌反应 2 小时。TLC(二氯甲烷:甲醇=20:1)显示反应完全。加入 1 M 稀盐酸调 pH=7, 减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1)得 30.8 g 类白色固体化合物 **42**, 收率为 82%。

步骤 3: 向 1.0 L 单口反应瓶中分别加入 300 mL DMF、化合物 **42**(30 g, 0.105 mol)和苯甲醛二甲基缩醛(40 mL)室温搅拌溶解。再加入 TsOH(0.54 g, 0.003 mol), 室温搅拌反应过夜。加入饱和碳酸氢钠(40 mL)淬灭反应, 减压浓缩后, 浓缩液用 300 mL 石油醚-乙酸乙酯混合溶液(1:1)打浆, 析出固体。过滤后的固体再用 250 mL 水-乙醇混合溶液(4:1)打浆, 过滤得白色固体化合物 **43**, 17.8 g, 产率 45%。

步骤 4: 氮气保护下, 向 1.0 L 单口反应瓶中分别加入 350 mL 甲苯和化合物 **43**(17.8 g, 0.048 mol), 室温搅拌溶解。再加入二丁基氧化锡(Bu₂SnO, 12.1 g, 0.049 mol), 125°C 反应 3 小时。冷却到室温, 反应体系加入四丁基溴化铵(Bu₄NBr, 16.2 g, 0.050 mol), 氟化铯(CsF, 7.4 g, 0.049 mol)和对甲氧基氯苄(PMBCl, 7.8 g, 0.050 mol), 氮气保护下, 125°C 反应 3 小时。冷却后加入乙酸乙酯(800 mL), 用饱和碳酸氢钠(600 mL)洗涤, 有机相减压浓缩后, 浓缩液通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=4:1)得无色油状化合物 **44**, 18 g, 产率 76%。

步骤 5: 氮气保护下, 向 1.0 L 单口反应瓶中分别加入 350 mL DMF 和化合物 **44**(18 g, 0.036 mol), 室温搅拌溶解。再加入氢化钠(NaH, 2.2 g, 60wt%, 0.055 mol), 常温搅拌 10 分钟。然后加入溴化苄(BnBr, 6.5 mL, 0.055 mol), 常温反应 6 小时。加入饱和氯化铵(20 mL)淬灭反应。溶液减压浓缩后, 向浓缩液加入乙酸乙酯(800 mL), 用水(300 mL×2)洗涤。有机相减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=30:1-20:1), 得无色胶状化合物 **45**, 19.2 g, 产率 90%。

步骤 6: 氮气保护下, 向 500 mL 三口反应瓶中分别加入 150 mL 二氯甲烷和化合物 **45**(5.6 g, 0.010 mol), 室温搅拌溶解。再加入干燥的 4Å 分子筛(28 g), 室温搅拌 2 小时。体系再降温到 -60°C, 加入 1-(苯基磺酰基)吡咯(BSP, 2.0 g, 0.010 mol)和三特丁基膦(TTBP, 5.0 g, 0.025 mol), 搅拌 45 分钟。再缓慢滴加三氟甲磺酐(Tf₂O, 2.0 mL, 0.012 mol), 保持 -60°C 反应 30 分钟。再加入化合物 **46**(3.2 g, 0.007 mol)的二氯甲烷溶液(10 mL), -60°C 反应 3 小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=5:1)显示反应完全, 反应液过滤, 并用二氯甲烷(300 mL)淋洗滤渣, 滤液用水(200 mL)洗涤一次。有机相减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=8:1), 得无色胶状化合物 **47**, 14.1 g, 产率 65%。

步骤 7: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 56 mL 二氯甲烷、3.2 mL 水和化合物 **47**(1.6 g, 1.71 mmol), 室温搅拌全溶。体系降温至 0°C, 加入 2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌(DDQ, 0.9 g, 3.96 mmol), 0°C 反应 0.5 小时, 然后升至室温继续搅拌 1 小时。反应液用二氯甲烷(50 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠(30 mL×2)洗涤。有机相减压浓缩后, 通过

硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1-7:1)得黄色胶状化合物 **48**, 1.39 g, 产率 99%。

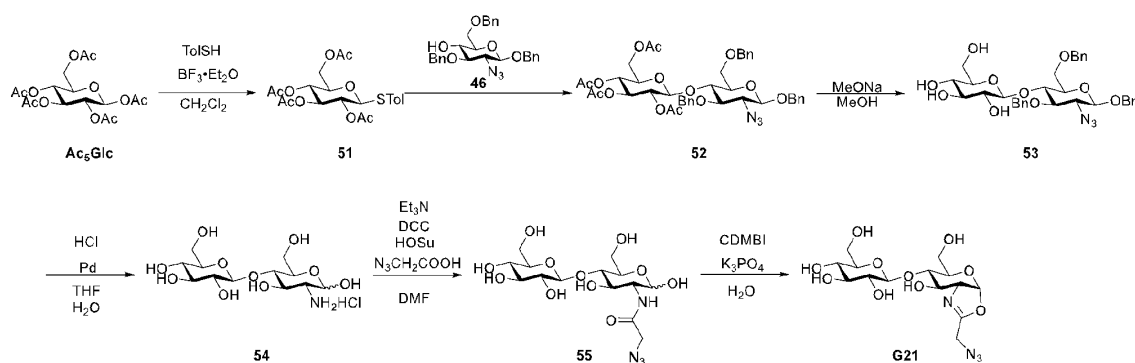
步骤 8: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 75 mL 四氢呋喃、20 mL 水和化合物 **48** (1.39 g, 1.73 mmol), 室温搅拌全溶。体系置换成氮气保护, 向体系中分别加入 Pd/C (2 g, 10wt%, 1.88 mmol) 和 HCl (5 mL, 1 M) 水溶液。将体系充入氢气 (15 psi)。室温搅拌过夜, TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=4: 2: 1) 显示反应完成。反应液过滤, 滤液减压浓缩, 得黄色固体化合物 **49**, 无需纯化, 直接用于下一步 (预估产量 0.6 g, 收率为 93%)。

步骤 9: 氮气保护下, 向 100 mL 单口瓶中分别加入化合物 **49** (600 mg, 1.59 mmol), 叠氮乙酸 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{COOH}$, 241 mg, 2.38 mmol), N-羟基丁二酰亚胺 (HOSu, 329 mg, 2.86 mmol)、三乙胺 (Et_3N , 0.66 mL, 4.77 mmol) 的 DMF (10 mL) 溶液和 N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC, 721 mg, 3.49 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=25: 5: 3) 显示反应完成。过滤, 滤液减压浓缩后, 通过酰胺柱纯化得白色固体化合物 **50**, 0.5 g, 产率 74%。

步骤 10: 0 °C 条件下, 向 100 mL 三口反应瓶中依次分别加入 10 mL 水、化合物 **50** (160 mg, 0.38 mmol)、磷酸钾 (K_3PO_4 , 1200 mg, 5.65 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物 (CDMBI, 409 mg, 1.88 mmol)。反应液于 0 °C 搅拌过夜, TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=25: 5: 3) 显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液通过酰胺柱色谱法纯化得 120 mg 白色固体化合物 **G20**, 收率为 78%。

ESI-MS calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z=407.1$, found $m/z=407.1$. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.02 (d, $J=7.1$ Hz, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.14–4.07 (m, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.82–3.67 (m, 3H), 3.65–3.53 (m, 3H), 3.52–3.34 (m, 3H), 3.32–3.23 (m, 1H), 3.24–3.12 (m, 1H).

实施例 14: 化合物 **G21** 的合成



步骤 1: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 150 mL 二氯甲烷、五乙酰葡萄糖 (**Ac₅Glc**, 50 g, 0.128 mol) 和 4-甲苯硫酚 (TolSH, 27 g, 0.217 mol), 室温搅拌溶解。再加入三氟化硼乙醚 ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 40 mL, 0.32 mol), 室温搅拌反应 3 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=3: 1) 显示反应完全。反应液用二氯甲烷 (800 mL) 稀释, 饱和碳酸氢钠 (1000 mL) 洗涤, 有机相减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=7: 1-3: 1) 得 48 g 白色固体化合物 **51**, 收率为 82%。

步骤 2: 氮气保护下, 向 500 mL 三口反应瓶中分别加入 200 mL 二氯甲烷、化合物 **51** (12.5 g, 0.028 mol) 和化合物 **46** (10.1 g, 0.021 mol), 室温搅拌溶解。再加入干燥的 4Å 分子筛 (35 g), 室温搅拌 2 小时。降温到 -10 °C, 向反应液中加入 N-碘代丁二酰亚胺 (NIS, 8.8 g, 0.039 mol) 和三氟甲基磺酸三甲基硅酯 (TMSOTf, 2.9 mL, 0.016 mol)。加料完毕升温至室温, 在室温搅拌过夜。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=3: 1) 显示反应完全。反应液过滤并用二氯甲烷 (300 mL) 淋洗滤渣, 向滤液加入水 (300 mL), 剧烈搅拌下缓慢加入硫代硫酸钠至有机相褪色, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 =7: 1-4: 1) 得 17 g 白色固体化合物 **52**, 收率为 99%。

步骤 3: 向 1.0 L 单口反应瓶中分别加入 200 mL 甲醇和化合物 **52** (17 g, 21.09 mmol), 室温搅拌溶解。再加入 5 M MeONa 的甲醇溶液 (1 mL), 室温搅拌反应 2 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=10: 1) 显示反应完全。加入阳离子树脂 (H^+) 中和, 调 pH=6-7。过滤, 滤液减压浓缩得 12.6 g 浅黄色固体化合物 **53**, 收率为 93%, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 4: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 60 mL 四氢呋喃、7.5 mL 水和化合物 **53** (2 g, 3.14 mmol), 室温搅拌全溶。体系置换成氮气保护, 向体系中加入 Pd/C (2 g, 10wt%, 1.88 mmol) 和 HCl (12.5 mL, 1 M) 水溶液, 充入 H_2 (15 psi), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=4: 2: 1) 显示反应完成, 反应液过滤, 滤液减压浓缩, 得黄色固体化合物 **54**, 无需纯化, 直接用于下一步 (以理论产量 1.18 g 投下一步)。

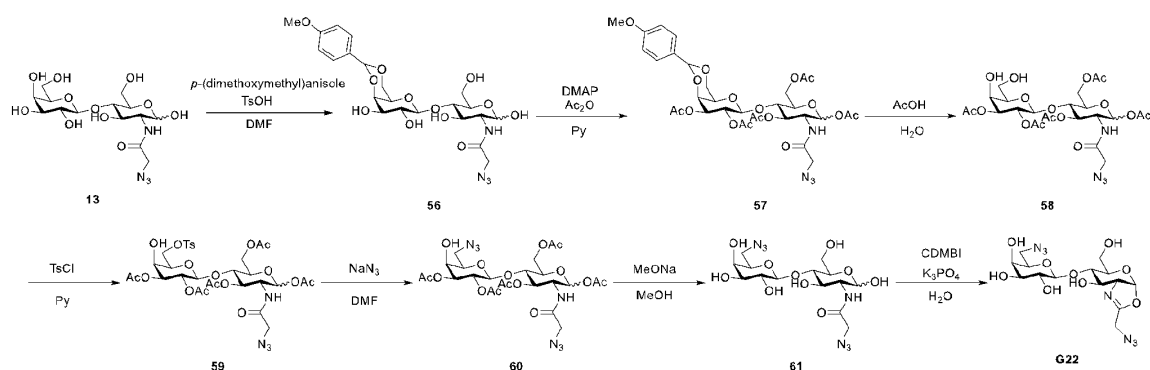
步骤 5: 氮气保护下, 向 100 mL 单口瓶中分别加入化合物 **54** (1.18 g, 3.12 mmol), 叠氮乙酸 ($\text{N}_3\text{CH}_2\text{COOH}$,

473 mg, 4.68 mmol), N-羟基丁二酰亚胺(HOSu, 647 mg, 5.62 mmol)、三乙胺(Et₃N, 1.3 mL, 9.40 mmol)的 DMF(15 mL)溶液和 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 1.42 g, 6.88 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=25:5:3)显示反应完成。过滤, 滤液减压浓缩后, 通过酰胺柱色谱法纯化得 370 mg 白色固体化合物 **55**, 收率 28%。

步骤 6: 0 °C条件下, 向 100 mL 三口反应瓶中依次分别加入 10 mL 水、化合物 **55** (120 mg, 0.28 mmol)、磷酸钾(K₃PO₄, 900 mg, 4.24 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 307 mg, 1.41 mmol)。反应液于 0 °C搅拌过夜, TLC (异丙醇: 浓氨水: 水=25:5:3)显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液通过酰胺柱色谱法纯化得 60 mg 白色固体化合物 **G21**, 收率为 52%。

ESI-MS calc. for C₁₄H₂₃N₄O₁₀ [M+H]⁺ m/z= 407.1, found m/z= 407.2. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.04 (dd, *J* = 7.3, 2.9 Hz, 1H), 4.38 – 4.22 (m, 2H), 4.17 – 4.07 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 22.6 Hz, 2H), 3.80 – 3.61 (m, 3H), 3.61 – 3.44 (m, 2H), 3.35 – 3.25 (m, 3H), 3.25 – 3.16 (m, 1H), 3.15 – 3.03 (m, 1H).

实施例 15: 化合物 **G22** 的合成



步骤 1: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 125 mL DMF、化合物 **13** (5 g, 0.012 mol)和 4-甲氧基苯甲醛二甲基缩醛(6.4 g, 0.035 mol), 室温搅拌溶解。再加入对甲苯磺酸(TsOH, 0.2 g, 0.001 mol), 室温搅拌 2 小时。然后, 加入饱和碳酸氢钠(100 mL)淬灭反应, 过滤掉固体, 滤液减压浓缩得物化合物 **56** 粗品, 以 6.39 g 计算直接投下一步。

步骤 2: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 100 mL 吡啶、化合物 **56** (6.39 g, 0.012 mol)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 0.14 g, 0.001 mol), 室温搅拌溶解。再向体系中加入乙酸酐(Ac₂O, 20 mL, 0.216 mol), 室温搅拌过夜。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=1:1)显示反应完全。将反应液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚: 乙酸乙酯=1:1-0:1)得 7.8 g 类白色固体化合物 **57**, 收率为 88%。

步骤 3: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 80 mL 乙酸 (AcOH)、20 mL 水和化合物 **57** (7.8 g, 0.010 mol), 室温搅拌 3 小时, TLC (石油醚: 乙酸乙酯=1:4)显示反应完全。减压浓缩后, 向浓缩液中加入水(150 mL), 然后用乙酸乙酯(150 mL×2)萃取。合并有机相, 减压浓缩得 5.9 g 类白色固体化合物 **58**, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 4: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 60 mL 吡啶和化合物 **58** (5.9 g, 9.30 mmol), 室温搅拌溶解, 降温至 20 °C~15 °C。在 -20 °C~15 °C下, 再加入对甲苯磺酰氯(TsCl, 6.8 g, 35.67 mmol), 然后搅拌过夜。加入 20 mL 甲醇淬灭反应, 然后反应液减压浓缩。浓缩后加入乙酸乙酯(400 mL)和 1 M HCl(1000 mL), 然后分出有机层。水相再用乙酸乙酯(400 mL)萃取, 然后合并有机相, 用饱和碳酸氢钠水溶液(200 mL)洗涤。有机相减压浓缩得 10 g 白色固体化合物 **59**, 无需纯化, 直接用于下一步(预估产量 5 g, 收率为 68%)。

步骤 5: 氮气保护和室温条件下, 向 250 mL 三口反应瓶中分别加入 120 mL DMF 和化合物 **59** (5 g, 7.55 mmol)。再加入叠氮化钠(NaN₃, 6.18 g, 95.06 mmol), 然后升温至 60 °C搅拌 60 小时。降温至室温, 过滤, 滤液减压浓缩。向残余物中加水(200 mL), 用乙酸乙酯(100 mL×2)萃取。合并有机相并减压浓缩, 得 2.4 g 白色固体化合物 **60**, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

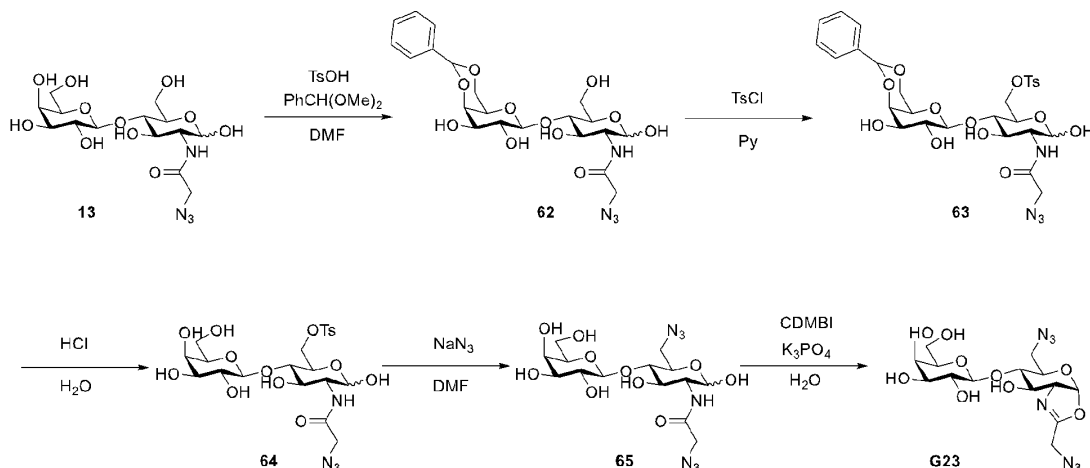
步骤 6: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 100 mL 甲醇和化合物 **60** (2.4 g, 3.64 mmol), 室温搅拌全溶。再加入甲醇钠(MeONa, 0.7 mL)的甲醇溶液, 室温搅拌过夜。用阳离子交换树脂(H⁺)调 pH 至 6~7, 过滤。滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇: 水=1:20), 得到 500 mg 类白色固体化合物 **61**, 收率为 30%。

步骤 7: 在 0 °C, 向 50 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL 水、化合物 **61** (125 mg, 0.28 mmol)、磷酸钾(K₃PO₄, 905 mg, 4.26 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 295 mg, 1.36 mmol), 然后在 0 °C搅拌过夜。TLC (异丙醇: 氨水: 水=25:5:3)显示反应完全。将反应液升至室温, 然后用甲苯(20 mL×4)萃取出杂质。水层直接

用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:10-1:3, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100))得 60 mg 白色固体化合物 **G22**, 收率为 50%。

ESI-MS calc. for $C_{14}H_{22}N_7O_9$ $[M+H]^+$ $m/z = 432.1$, found $m/z = 432.1$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.38 – 4.24 (m, 2H), 4.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.02 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 3.99 – 3.79 (m, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.67 – 3.53 (m, 3H), 3.54 – 3.38 (m, 3H), 3.36 – 3.27 (m, 2H), 3.24 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H).

实施例 16: 化合物 **G23** 的合成



步骤 1: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 200 mL DMF 、化合物 **13** (5 g, 0.012 mol) 和苯甲醛二甲基缩醛(2.15 g, 0.014 mol), 室温搅拌溶解。再加入对甲苯磺酸($TsOH$, 0.2 g, 0.001 mol), 室温搅拌应过夜。然后, 加入饱和碳酸氢钠(100 mL)淬灭反应, 过滤掉固体, 滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=2:3-1:1), 得 4.0 g 白色固体化合物 **62**, 收率为 66%。

步骤 2: 在 $-20^\circ C \sim -15^\circ C$ 下, 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 100 mL 吡啶和化合物 **62** (4.0 g, 0.008 mol), 搅拌溶解。再加入对甲苯磺酰氯($TsCl$, 2.98 g, 0.016 mol), 然后搅拌过夜。加入 20 mL 甲醇淬灭反应, 然后减压浓缩。残余物无需纯化, 直接用于下一步(以理论产量 5.2 g 计算投料)。

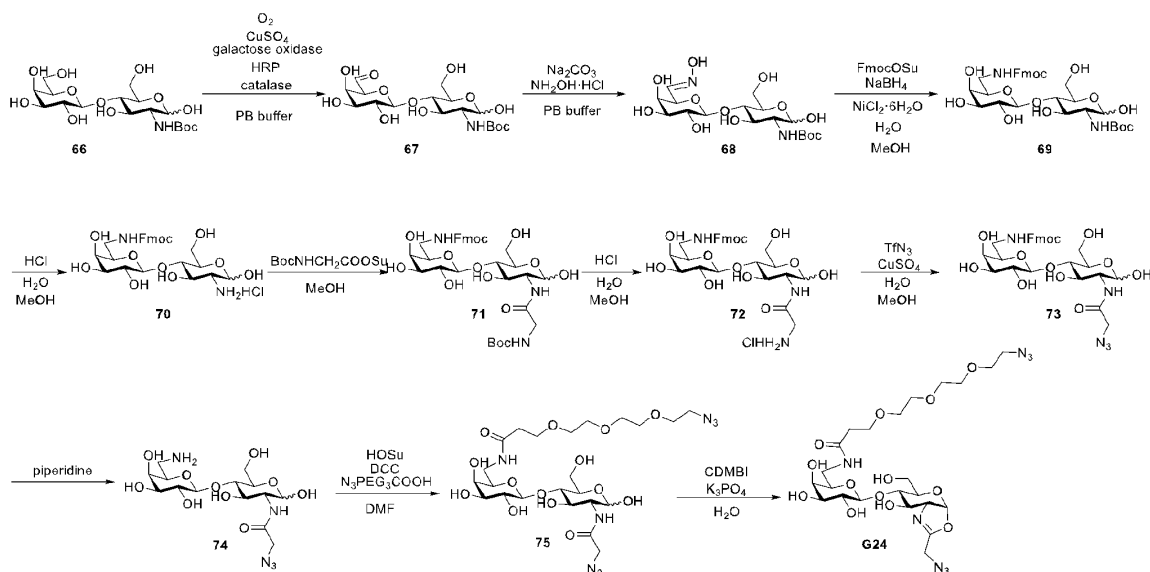
步骤 3: 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 100 mL, 1 M HCl 水溶液和化合物 **63** (5.2 g, 0.007 mol) 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:1)得 1 g 黄色固体化合物 **64**, 收率为 22%。

步骤 4: 氮气保护下, 向 100 mL 三口反应瓶中分别加入 20 mL DMF 和化合物 **64** (1 g, 0.0016 mol), 室温搅拌溶解。再加入叠氮化钠(NaN_3 , 1.05 g, 0.016 mol), 然后升温至 $60^\circ C$ 搅拌 48 小时。反应液过滤, 滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:20-1:2)得 0.22 g 化合物 **65**, 收率为 30%。

步骤 5: 向 50 mL 三口反应瓶中分别加入 10 mL 水和化合物 **65** (150 mg, 0.334 mmol), 室温搅拌溶解。降温至 $0^\circ C$, 再加入磷酸钾(K_3PO_4 , 1.06 g, 5.0 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物($CDMBI$, 362 mg, 1.67 mmol), 然后在 $0^\circ C$ 搅拌过夜。TLC (异丙醇:氨水:水=25:5:3)显示反应完全。将反应液升至室温, 然后用甲苯(20 mL $\times$ 4)萃取出杂质。水层直接通过 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:20-1:2, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100))得 100 mg 白色固体化合物 **G23**, 收率为 69%。

ESI-MS calc. for $C_{14}H_{22}N_7O_9$ $[M+H]^+$ $m/z = 432.1$, found $m/z = 432.1$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.30 - 6.21 (m, 1H), 4.50 - 4.41 (m, 2H), 4.36 - 4.29 (m, 1H), 4.30 - 4.14 (m, 1H), 3.95 - 3.90 (m, 1H), 3.87 - 3.59 (m, 8H), 3.59 - 3.48 (m, 2H).

实施例 17: 化合物 **G24** 的合成



步骤 1: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 40 mL)中依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 18 mL), 硫酸铜($CuSO_4$, 2 mM, 10 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 340 mg)和过氧化氢酶(catalase, 10 mL), 然后在 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C 下, 向 2.0 L 三口反应瓶中分别加入磷酸缓冲液(phosphate buffer, 200 mL)和化合物 66 (13 g, 29.45 mmol), 入氧气(O_2) 15-30 分钟, 然后将混合酶加入到反应体系中, 30 °C 水浴反应 6 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气, 反应液不做进一步处理, 直接用于下一步。

步骤 2: 向反应液中加入 Na_2CO_3 (1.56 g, 14.72 mmol)和盐酸羟胺($NH_2OH \cdot HCl$, 2.25 g, 32.38 mmol), 室温反应 2 小时, TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成。加入甲醇 300 mL, 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇 300 mL 淋洗, 所得滤液直接用于投下一步反应(其中的化合物 68, 以 13.0 g, 收率 97%)。

步骤 3: 在 0 °C 下, 向 2.0 L 单口反应瓶中分别加入 600 mL 甲醇、280 mL 磷酸缓冲液、化合物 68 (13 g, 0.029 mol)和六水氯化镍($NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 17.0 g, 0.072 mol), 搅拌。再加入硼氢化钠($NaBH_4$, 5.4 g, 0.143 mol)和 9-芴甲基 N-琥珀酰亚胺基碳酸酯($FmocOSu$, 19.3 g, 0.057 mol), 0 °C 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:3-1:2)得 16 g 白色固体化合物 69, 收率为 84%。

步骤 4: 室温下, 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 45 mL 甲醇、化合物 69 (3.3 g, 0.005 mol)和 HCl 水溶液(20 mL, 5 M)反应 4 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完成, 减压浓缩得化合物 70 粗品, 以理论产量 2.98 g 计算直接投下一步。

步骤 5: 室温下, 向 250 mL 反应瓶中分别加入 100 mL 甲醇和化合物 70 (2.98 g, 0.005 mol), 加入甲醇钠调 pH=7, 氮气保护下, 再加入 Boc-甘氨酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯($BocNHCH_2COOSu$, 6.1 g, 0.022 mol), 然后搅拌过夜。反应液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:3-2:3), 得 3.1 g 白色固体化合物 71, 收率 86%。

步骤 6: 室温下, 向 250 mL 单口反应瓶中分别加入 40 mL 甲醇、化合物 71 (3.3 g, 0.005 mol)和 HCl 水溶液(17 mL, 5 M)反应 4 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完成, 减压浓缩得化合物 72 粗品, 以 2.8 g 计算直接投下一步。

步骤 7: 三氟甲磺酰基叠氮化物(TfN_3)的制备: 在 -5-0 °C 下, 向溶有 NaN_3 (3.5 g, 53.2 mmol, 3 eq)的 H_2O (25 mL)和 DCM (40 mL)混合物中(250 mL 三口反应瓶)加入 Tf_2O (3 mL, 17.7 mmol, 1 eq), 然后搅拌 2.5 小时。分液, 水相用 DCM (10 mL×2)萃取, 合并 DCM 用饱和碳酸氢钠(40 mL)洗涤, 得 TfN_3 的 DCM 溶液, TfN_3 以 3.0 g (17.1 mmol, 97%)计算投入使用。

室温下, 向溶有化合物 72 (2.8 g, 0.004 mol), K_2CO_3 (0.65 g, 0.005 mol), $CuSO_4$ (6.8 mg, 0.043 mmol)的水(60 mL)和甲醇 (120 mL)溶液中(1.0 L 单口瓶)加入上述所得的 TfN_3 的二氯甲烷溶液, 室温反应过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压蒸出甲醇和二氯甲烷, 产物从水中析出, 过滤得 3 g 化合物 73 粗品, 直接用于下一步投料(预估实际含量 80%, 收率为 87%)。

步骤 8: 室温下, 向 100 mL 单口瓶中分别加入 20 mL DMF 和化合物 73 (1.5 g, 80wt%, 0.002 mol), 搅拌溶解。

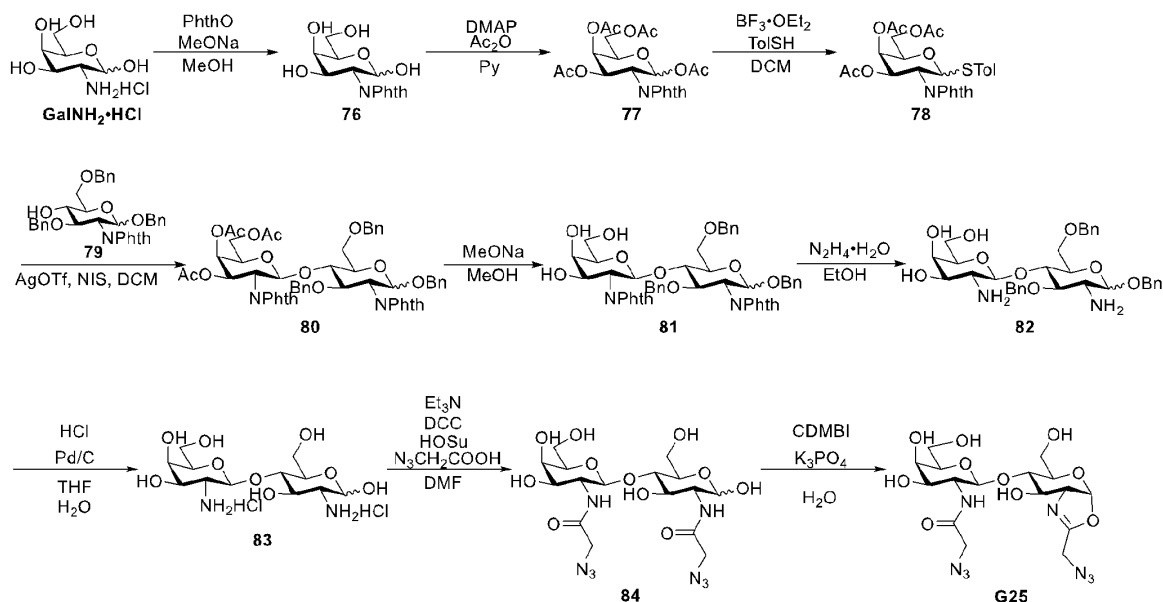
向体系中加入哌啶(Piperidine, 2 mL, 0.020 mol), 反应 2 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 减压浓缩得化合物 **74** 粗品, 以 0.78 g 计算直接投下一步。

步骤 9: 氮气保护和室温下, 向 100 mL 单口瓶中分别加入 15 mL DMF、化合物 **74** (0.78 g, 1.8 mmol), N-羟基丁二酰亚胺(HOSu, 0.32 g, 2.8 mmol)和 N₃-PEG₃-COOH (0.68 g, 2.8 mmol)和 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 0.76 g, 3.7 mmol), 反应过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:5-1:2)得 0.63 g 白色固体化合物 **75**, 收率为 52%。

步骤 10: 在 0 °C, 向溶有化合物 **75** (130 mg, 0.20 mmol)的水(8 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K₃PO₄, 634 mg, 2.99 mmol)和 2-氯-1,3-二甲苯-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 216 mg, 0.99 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。将反应液过滤, 滤液直接用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:5-1:2, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100), 得 82 mg 白色固体化合物 **G24**, 收率为 65%。

ESI-MS calc. for C₂₃H₃₉N₈O₁₃ [M+H]⁺ m/z = 635.2, found m/z = 635.2. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.19 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 3.1, 1.6 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.27 (ddd, *J* = 8.6, 3.1, 1.5 Hz, 1H), 4.24 - 4.11 (m, 2H), 3.85 (dd, *J* = 3.4, 0.9 Hz, 1H), 3.81 - 3.74 (m, 3H), 3.72 - 3.63 (m, 13H), 3.58 (dd, *J* = 9.9, 3.4 Hz, 1H), 3.52 - 3.40 (m, 6H), 2.54 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

实施例 18: 化合物 **G25** 的合成



步骤 1: 室温下, 向 D-(+)-半乳糖胺盐酸盐(GalNH₂·HCl, 50 g, 0.23 mol)的 MeOH (400 mL)悬浮液中(1.0 L 单口瓶)加入 MeONa (13.2 g, 0.24 mol), 室温搅拌 20 分钟, 再加入邻苯二甲酸酐(PhthO, 37.8 g, 0.26 mol), 搅拌过夜。减压浓缩得化合物 **76** 粗品直接投下一步(以 71 g 计算投料)。

步骤 2: 向 2.0 L 单口反应瓶中分别加入 700 mL 吡啶、化合物 **76** (71 g, 0.23 mol)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 1.4 g, 0.01 mol), 搅拌溶解。再向体系中加入乙酸酐(Ac₂O, 195 mL, 2.08 mol), 室温搅拌过夜。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1)显示反应完全。将反应液减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1-2:1)得 59 g 固体化合物 **77**, 收率为 54%。

步骤 3: 向 500 mL 单口反应瓶中分别加入 180 mL 二氯甲烷、化合物 **77** (59 g, 0.12 mol)、4-甲苯磺酚(TolSH, 24.5 g, 0.20 mol)和三氟化硼乙醚(BF₃·Et₂O, 50 mL, 0.40 mol), 室温搅拌 3 小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完全。用二氯甲烷(900 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠水溶液(1200 mL)洗涤, 有机相减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=7:1-3:1)得 43 g 白色固体化合物 **78**, 产率 64%。

步骤 4: 氮气保护下, 向溶有化合物 **78** (9.4 g, 17.36 mmol)和化合物 **79** (10.0 g, 17.25 mmol)的二氯甲烷 (150 mL)溶液中(500 mL 三口反应瓶)加入干燥的 4Å 分子筛(30 g), 室温搅拌 2 小时。降温到-10°C 左右, 加入 N-碘代丁二酰亚胺(NIS, 7.0 g, 31.11 mmol)和三氟甲烷磺酸银(AgOTf, 0.66 g, 2.57 mmol), 然后升至室温搅拌过夜。TLC(石

油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完全。反应液过滤并用二氯甲烷 (300 mL)淋洗滤渣, 向滤液加入水(300 mL), 剧烈搅拌下缓慢加入硫化硫酸钠至有机相褪色, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1-1:1)得 15 g 无色胶状化合物 **80**, 收率为 87%。

步骤 5: 氮气保护和 0°C 下, 向溶有化合物 **80** (15 g, 15.04 mmol) 的甲醇(300 mL)溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入甲醇钠(1.5 mL, 5 M 的甲醇溶液), 室温搅拌反应 3 小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:3)显示反应完成, 加入阳离子树脂(H⁺)中和, 调 pH=6-7。过滤, 滤液减压浓缩得 13 g 浅黄色固体化合物 **81** 粗品, 无需进一步纯化, 直接用于投下一步。

步骤 6: 氮气保护下, 向溶有化合物 **81** (13 g, 14.93 mmol) 的乙醇 (400 mL) 溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入水合肼(N₂H₄·H₂O, 14.5 mL, 298.91 mmol), 80°C 搅拌过夜。TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1)显示反应完成, 冷却后过滤。滤液减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=2:3-2:1)得 7.8 g 白色固体化合物 **82**, 收率为 85%。

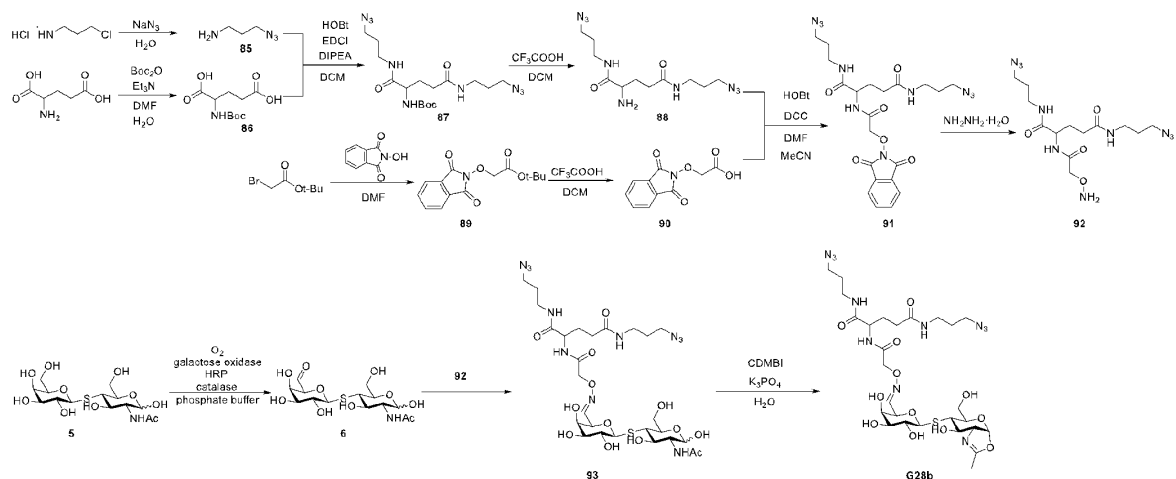
步骤 7: 向溶有化合物 **82** (2 g, 3.27 mmol) 的四氢呋喃(240 mL)和水(70 mL)混合溶液中(500 mL 单口瓶)加入 Pd/C (2 g, 10wt%, 1.88 mmol)和 1 M 的稀 HCl (13 mL), 充入 H₂ (15 psi), 室温搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=4:2:1)显示反应完成, 反应液过滤, 滤液减压浓缩, 得白色固体化合物 **83**, 无需纯化, 直接用于下一步(以 1.1 g 投下一步)。

步骤 8: 氮气保护下, 向溶有化合物 **83** (1.1 g, 2.66 mmol), 叠氮乙酸(N₃CH₂COOH, 807 mg, 7.99 mmol), N-羟基丁二酰亚胺(HOSu, 1.1 g, 9.56 mmol)和三乙胺(3 mL)的 DMF (15 mL) 溶液中(50 mL 单口瓶)加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 2.2 g, 10.66 mmol), 室温过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成。过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用酰胺柱色谱法纯化得 0.8 g 白色固体化合物 **84**, 产率 59%。

步骤 9: 在 0 °C, 向溶有化合物 **84** (130 mg, 0.26 mmol) 的水(10 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K₃PO₄, 817 mg, 3.85 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓化物(CDMBI, 278 mg, 1.28 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液 C18 制备纯化(乙腈:水=1:20-1:4)得 80 mg 白色固体化合物 **G25**, 收率为 63%。

ESI-MS calc. for C₁₆H₂₅N₈O₁₀ [M+H]⁺ m/z = 489.1, found m/z = 489.1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.18 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 3.1, 1.7 Hz, 1H), 4.26 (ddd, J = 7.4, 3.2, 1.6 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 4.0, 1.8 Hz, 2H), 4.04 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 3.95 - 3.88 (m, 2H), 3.85 - 3.55 (m, 7H), 3.33 (ddd, J = 8.8, 6.4, 2.4 Hz, 1H).

实施例 19: 化合物 **G28b** 的合成



步骤 1: 氮气保护下, 向溶有 3-氯丙胺盐酸盐(36 g, 0.28 mol)的水(220 mL)中(500 mL 反应瓶)加入叠氮化钠(NaN₃, 54 g, 0.83 mol), 80°C 搅拌过夜。加入氢氧化钠(33 g, 0.83 mol), 用乙醚 200 mL×5 萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩到约 100 mL 化合物 **85** 后直接用于投下一步(按 22 g 产率 79% 计算下一步投料)。

步骤 2: 向溶有谷氨酸(52 g, 0.19 mol)的 DMF(300 mL)和水(200 mL)混合溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加三乙胺(98 mL), 室温搅拌反应 10 分钟。再加入二碳酸二叔丁酯(Boc₂O, 81 g, 0.37 mol), 反应 2.5 小时。加入饱和食盐水(600 mL)和 HCl 水溶液(4 M, 160 mL), 用乙酸乙酯(400 mL×3)萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 再减压浓缩后, 残余物用二氯甲烷(200 mL)打浆得 85 g 白色粉末固体化合物 **86**, 产率 97%。

步骤 3: 氮气保护下, 向化合物 **85** (10 g, 0.10 mol), 化合物 **86** (14 g, 0.06 mol) 和 1-羟基苯并三唑(HOBt, 27 g, 0.20 mol) 的二氯甲烷(200 mL)悬浮液中(500 mL 反应瓶)加入 EDCI (39 g, 0.20 mol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA, 84 mL, 0.48 mol), 室温搅拌过夜。TLC (乙酸乙酯:甲醇=1:0)显示反应结束。减压浓缩, 残余物加入饱和碳酸氢钠(400 mL), 乙酸乙酯(200 mL×3)萃取, 合并有机相减压浓缩后, 通过硅胶柱色谱法纯化(乙酸乙酯:甲醇=1:0-5:1), 得 8 g 浅黄色油状化合物 **87**, 产率 48%。

步骤 4: 向溶有化合物 **87** (8 g, 0.02 mol) 的二氯甲烷(30 mL)溶液中(100 mL 反应瓶)加入三氟乙酸(14.5 mL), 室温反应 2 小时。TLC (乙酸乙酯:甲醇=10:1)显示反应完全。减压浓缩后, 通过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:10-2:3), 得 4.5 g 无色油状化合物 **88**, 产率 74%。

步骤 5: 向溶有 *N*-羟基邻苯二甲酰亚胺(50 g, 0.31 mol)的 DMF(30 mL)溶液中(2.0 L 三口反应瓶)加入碳酸钾(85 g, 0.62 mol)和溴乙酸叔丁酯(47 mL, 0.32 mol), 60°C 搅拌 2 小时。TLC (乙酸乙酯:甲醇=10:1)显示反应完全。反应液冷却至室温然后倒入冰水(2 L), 搅拌析出白色固体, 过滤, 滤饼用水(300 mL)洗涤, 再用石油醚(300 mL)打浆, 得 60 g 白色固体化合物 **89**, 产率 70%。

步骤 6: 向溶有化合物 **89** (20 g, 0.07 mol) 的二氯甲烷(80 mL)溶液中(500 mL 反应瓶)加入三氟乙酸(43 mL), 室温搅拌 6 小时。TLC (乙酸乙酯:甲醇=10:1)显示反应完全。反应液减压浓缩, 残余物用乙酸乙酯(50 mL)打浆, 得 12 g 白色固体化合物 **90**, 产率 75%。

步骤 7: 氮气保护下, 向溶有化合物 **88** (5 g, 16.06 mmol), 化合物 **90** (3.9 g, 17.63 mmol) 和 1-羟基苯并三唑(HOBt, 2.9 g, 21.46 mmol) 的 DMF (65 mL) 和 乙腈 (65 mL) 混合溶液中(500 mL 反应瓶)加入 *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC, 4.4 g, 21.33 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇:水=20:1)显示反应结束。过滤除去白色沉淀, 滤液减压浓缩得化合物 **91** 粗品, 无需纯化直接投下一步(以 8.26 g 计算下一步投料)。

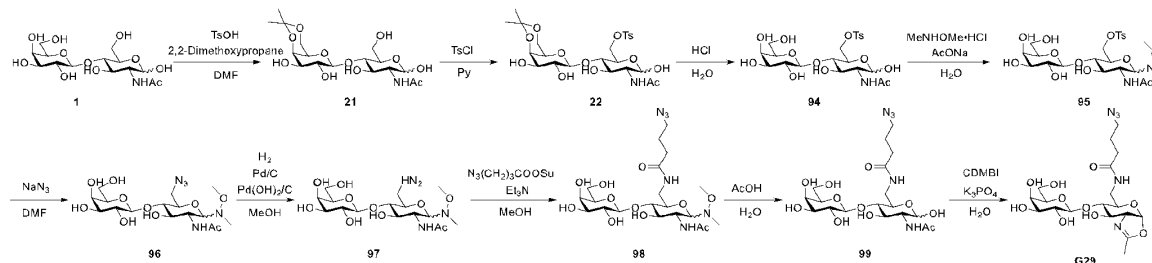
步骤 8: 向溶有化合物 **91** (8.26 g, 16.05 mmol) 的甲醇(200 mL)溶液中(500 mL 反应瓶)加入水合肼(5.1 mL, 105.14 mmol), 室温反应 2 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=20:1:1)显示反应完全。减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:3-1:2), 得 6g 白色固体化合物 **92**, 产率 97%。

步骤 9: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 5 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 3 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 50 mg), 过氧化氢酶(catalase, 1.5 mL)和硫酸铜(CuSO_4 , 1 mM, 0.9 mL), 30°C 水浴活化 30 分钟。30°C 下, 向溶有化合物 **5** (600 mg, 1.50 mmol) 的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 25 mL)中(100 mL 单口反应瓶)通入氧气(O_2)30 分钟, 再将混合酶加入到反应体系中, 30°C 水浴反应 6 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气。加入化合物 **92** (693 mg, 1.80 mmol), 室温反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 加入甲醇(300 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇(300 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:10-1:4)得 700 mg 白色粉末固体化合物 **93**, 产率 61%。

步骤 10: 在 0°C, 向溶有化合物 **93** (170 mg, 0.22 mmol) 的水(8 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 709 mg, 3.34 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 242 mg, 1.11 mmol), 然后在 0°C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。反应液过滤, 滤液直接用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:4-7:3)得 112 mg 白色固体化合物 **G28b**, 收率为 67%。

ESI-MS calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 746.2$, found $m/z = 746.2$. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.55 (d, $J = 4.6$ Hz, 0.7H), 6.85 (d, $J = 4.5$ Hz, 0.3H), 5.97 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.44 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.22 – 4.16 (m, 1H), 4.06 (s, 1H), 4.00 – 3.94 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 3.61 (d, $J = 17.7$ Hz, 2H), 3.47 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.24 (d, $J = 9.5$ Hz, 4H), 3.17 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.90 (s, 1H), 2.19 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.04 – 1.96 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.84 (dd, $J = 14.8, 7.6$ Hz, 1H), 1.68 – 1.60 (m, 4H).

实施例 20: 化合物 **G29** 的合成



步骤 1: 向溶有化合物 **1** (10 g, 26.09 mmol) 和 TsOH (0.45 g, 2.61 mmol) 的 DMF (250 mL) 溶液 (500 mL 单口反应瓶) 加入 2, 2-二甲氧基丙烷 (51 mL), 室温搅拌 25 分钟。然后加入饱和碳酸氢钠 (50 mL) 淬灭反应, 过滤掉固体, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 纯化 (甲醇:水=1:20), 得 4.9 g 白色固体化合物 **21**, 收率为 44%。

步骤 2: 在 -20 °C 下, 向溶有化合物 **21** (4.9 g, 11.57 mmol) 的吡啶 (200 mL) 溶液 (500 mL 单口反应瓶) 加入 TsCl (4.0 g, 20.98 mmol), 然后搅拌过夜。加入 20 mL 甲醇淬灭反应, 然后减压浓缩。残余物过 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=2:3-1:1) 得 2.3 g 黄色固体化合物 **22**, 收率为 34%。

步骤 3: 将化合物 **22** (2.3 g, 3.98 mmol) 溶于 HCl (30 mL, 1.5 M) 水溶液 (250 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。TLC (二氯甲烷:甲醇=20:1) 显示反应完成, 然后减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:2-1:1), 得 1.8 g 黄色固体化合物 **94**, 收率为 86%。

步骤 4: 向溶有化合物 **94** (2.3 g, 4.28 mmol) 的水 (15 mL) 溶液 (100 mL 单口反应瓶) 滴加 N,O-二甲基羟胺盐酸盐 (MeNHOMe·HCl, 1.09 g, 11.17 mmol) 和乙酸钠 (AcONa, 0.91 g, 11.09 mmol) 的水 (10 mL) 溶液, 室温反应过夜。TLC (二氯甲烷:甲醇=20:1) 显示反应完成。反应液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:2-1:1) 得 1.2 g 化合物 **95**, 收率为 48%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **95** (1.2 g, 2.07 mmol) 的 DMF (30 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入 NaN₃ (1.1 g, 16.9 mmol), 然后升温至 60 °C 反应过夜。TLC (异丙醇:水:浓氨水=25:5:3) 显示反应完成, 反应液过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:20-1:4) 得 0.9 g 化合物 **96**, 收率为 96%。

步骤 6: 向溶有化合物 **96** (0.9 g, 1.99 mmol) 的甲醇 (20 mL) 溶液 (100 mL 单口反应瓶) 加入 Pd/C (1 g, 5wt%, 0.47 mmol) 和 Pd(OH)₂/C (1 g, 20wt%, 1.42 mmol), 充入氢气 (15 psi), 室温搅拌反应过夜。反应液过滤, 滤液减压浓缩, 残余物直接用于投下一步 (0.8 g, 94% 计算)。

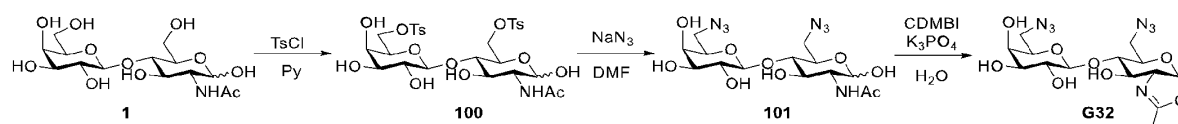
步骤 7: 向溶有化合物 **97** (0.8 g, 1.88 mmol) 的甲醇 (20 mL) 溶液 (100 mL 单口反应瓶) 加入 N₃(CH₂)₃COOSu (1.28 g, 5.66 mmol) 和 Et₃N (0.4 mL), 室温搅拌反应过夜。反应液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:20-1:4) 得 0.41 g 化合物 **98**, 收率为 40%。

步骤 8: 将化合物 **98** (0.41 g, 0.76 mmol) 溶于乙酸 (60 mL) 和水 (15 mL) 中, 60 °C 反应 4 小时。TLC (i-PrOH:NH₃·H₂O:H₂O=25:5:3) 显示反应完成。反应液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化 (甲醇:水=1:4-3:7) 得 0.34 g 白色固体化合物 **99**, 产率 90%。

步骤 9: 在 0 °C, 向溶有化合物 **99** (200 mg, 0.41 mmol) 的水 (13 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入磷酸钾 (K₃PO₄, 1.29 g, 6.08 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物 (CDMBI, 440 mg, 2.03 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。反应液过滤, 滤液直接用 C18 制备 (乙腈:水=1:5-2:3, 制备型高效液相色谱仪 (武汉睿合色谱技术, LC 2100)) 得 140 mg 白色固体化合物 **G29**, 收率为 72%。

ESI-MS calc. for C₁₈H₃₀N₃O₁₀ [M+H]⁺ m/z = 476.2, found m/z = 476.2. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.09 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.43 (dd, J = 3.0, 1.5 Hz, 1H), 4.21 (dq, J = 6.7, 1.7 Hz, 1H), 3.96 - 3.90 (m, 1H), 3.87 - 3.62 (m, 5H), 3.61 - 3.35 (m, 6H), 2.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.07 (d, J = 1.8 Hz, 3H), 1.91 (q, J = 7.0 Hz, 2H).

实施例 21: 化合物 **G32** 的合成



步骤 1: 在 25 °C 条件下, 向溶有化合物 **1** (3.0 g, 7.83 mmol) 的吡啶 (30 mL) 溶液 (100 mL 单口反应瓶) 加入 TsCl (3.7 g, 19.41 mmol), 搅拌 3 小时。TLC (乙腈:水=10:1) 显示反应完成, 减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化 (二氯甲烷:甲醇=50:1-10:1), 得 2.2 g 黄色固体化合物 **100**, 收率为 40%。

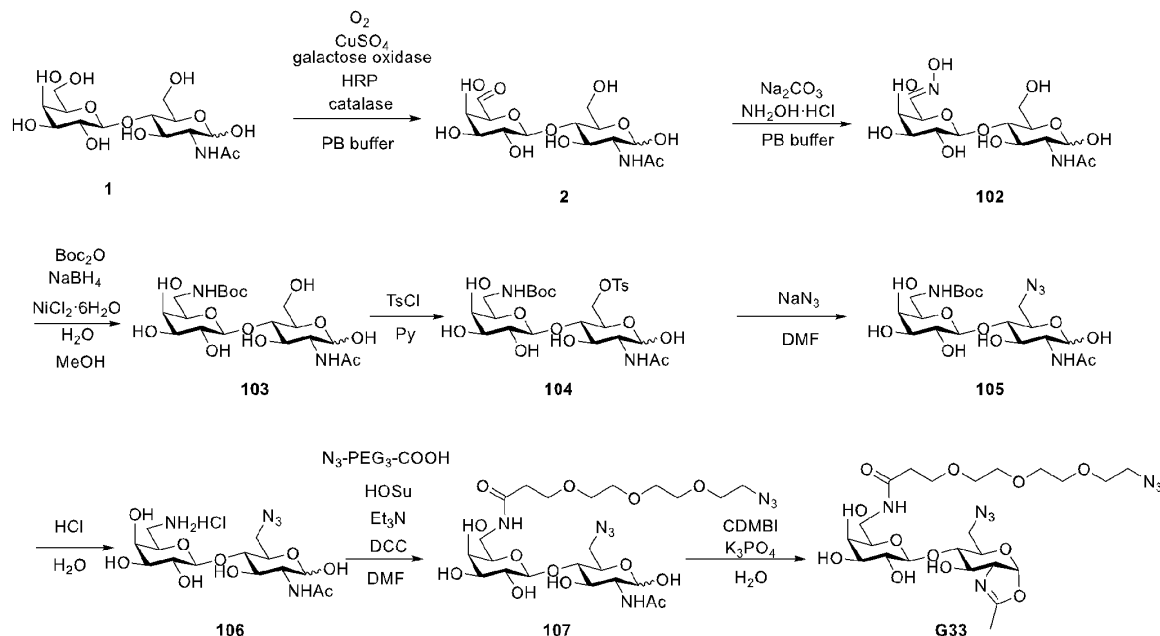
步骤 2: 氮气保护下, 向溶有化合物 **100** (2.2 g, 3.18 mmol) 的 DMF (15 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入 NaN₃ (1.03 g, 15.8 mmol), 然后升温至 80 °C 搅拌 12 小时。反应液降温至室温, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 制备 (乙腈:水=1:10-1:2, 制备型高效液相色谱仪 (武汉睿合色谱技术, LC 2100)) 得 160 mg 白色固体化合物 **101**, 收率为 11%。

步骤 3: 在 0 °C, 向溶有化合物 **101** (160 mg, 0.37 mmol) 的水 (12 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入磷酸钾 (K₃PO₄, 1.18 g, 5.56 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物 (CDMBI, 400 mg, 1.84 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。用甲苯 (20 mL × 4) 萃取出杂质, 水层直接用 C18 制备 (乙

腈:水=1:10-1:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100))得 120 mg 白色固体化合物 **G32**, 收率为 78%。

ESI-MS calc. for $C_{14}H_{22}N_7O_8$ $[M+H]^+$ $m/z = 416.1$, found $m/z = 416.1$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 5.96 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.40 – 4.23 (m, 2H), 4.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.71 – 3.61 (m, 2H), 3.57 – 3.42 (m, 4H), 3.43 – 3.33 (m, 2H), 3.29 (dd, $J = 13.2, 3.7$ Hz, 1H), 1.93 (s, 3H).

实施例 22: 化合物 **G33** 的合成



步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 25 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 12.5 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 210 mg), 过氧化氢酶(catalase, 6.25 mL)和硫酸铜($CuSO_4$, 1 mM, 4 mL)的水溶液, $30^\circ C$ 水浴活化 30 分钟。 $30^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **1** (5 g, 13.04 mmol)的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 125 mL)中(2.0 L 单口反应瓶)通入氧气(O_2), 30 分钟后再将混合酶加入到反应体系中。 $30^\circ C$ 水浴反应 6 小时, TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气。然后, 向反应液中加入 Na_2CO_3 (691 mg, 6.52 mmol)和 $NH_2OH \cdot HCl$ (997 mg, 14.35 mmol), 室温搅拌 3 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 加入甲醇(300 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇(300 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=6:1-3:1)得 4.0 g 化合物 **102**, 产率 77%。

步骤 3: 在 $0^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **102** (5.5 g, 13.88 mmol)和 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (8.25 g, 34.71 mmol)的甲醇 (160 mL)和磷酸缓冲液(PB, 80 mL)混合溶液(500 mL 单口反应瓶)加入 $NaBH_4$ (3.15 g, 83.27 mmol)和 Boc_2O (9.09 g, 41.65 mmol), $0^\circ C$ 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:5-1:2)得 3.2 g 白色固体化合物 **103**, 收率为 48%。

步骤 4: 在 $-20^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **103** (1.6 g, 3.32 mmol)的吡啶(32 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入 $TsCl$ (0.7 g, 3.67 mmol), 搅拌过夜。减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-3:1)得 0.6 g 化合物 **104**, 收率 28%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **104** (0.6 g, 0.94 mmol)的 DMF (20 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入 NaN_3 (0.61 g, 9.38 mmol), 然后升温至 $60^\circ C$ 搅拌 24 小时。反应液降至室温, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:3-1:2)得 0.4 g 白色固体化合物 **105**, 收率为 84%。

步骤 6: 将化合物 **105** (0.4 g, 0.79 mmol)溶于稀 HCl (5 mL, 1.5 M)溶液中(25 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩得化合物 **106** 粗品, 直接投下一步(以 300 mg 产量计算)。

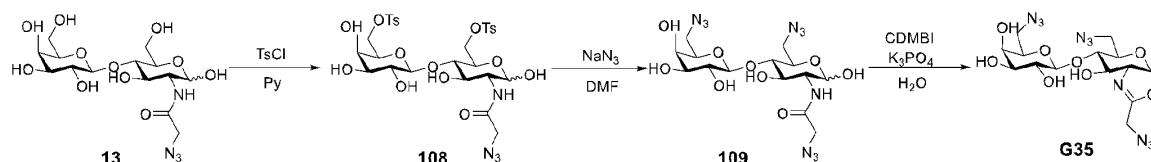
步骤 7: 氮气保护和室温下, 向溶有化合物 **106** (300 mg, 0.68 mmol), $HOSu$ (140 mg, 1.22 mmol), N_3-PEG_3-COOH (250 mg, 1.01 mmol)和 Et_3N (0.28 mL, 2.01 mmol)的 DMF (5 mL)溶液中(25 mL 单口瓶)加入 DCC (314 mg, 1.52 mmol), 反应过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱

法纯化(甲醇:水=1:4-3:7)得 0.23 g 白色固体化合物 **107**, 收率为 55%。

步骤 8: 在 0 °C, 向溶有化合物 **107** (230 mg, 0.36 mmol) 的水(10 mL)溶液中(50 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 1150 mg, 5.42 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 392 mg, 1.81 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。将反应液过滤, 滤液直接用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:4-1:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 80 mg 白色固体化合物 **G33**, 收率为 36%。

ESI-MS calc. for $C_{23}H_{39}N_8O_{12}$ $[M+H]^+$ $m/z = 619.2$, found $m/z = 619.2$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.11 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.43 - 4.36 (m, 2H), 4.22 (dq, $J = 6.7, 1.6$ Hz, 1H), 3.91 - 3.87 (m, 1H), 3.80 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.77 - 3.54 (m, 15H), 3.54 - 3.40 (m, 6H), 2.57 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H).

实施例 23: 化合物 **G35** 的合成



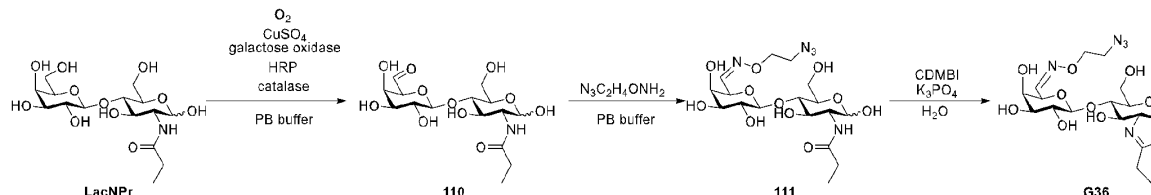
步骤 1: 在 -15 °C 条件下, 向溶有化合物 **13** (2.0 g, 4.71 mmol) 的吡啶(60 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入 TsCl (2.7 g, 14.16 mmol), 搅拌 13 小时。TLC (乙腈:水=10:1)显示反应完成, 加入乙酸乙酯(200 mL)稀释, 再加入饱和的碳酸氢钠水溶液(100 mL)。分液, 有机相用饱和的食盐水洗涤(150 mL×3), 无水硫酸钠干燥后过滤, 减压浓缩得 2.8 g 黄色固体化合物 **108**, 收率为 81%。

步骤 2: 向溶有化合物 **108** (2.8 g, 3.82 mmol) 的 DMF(50 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入叠氮钠(3.73 g, 57.38 mmol), 60 °C 搅拌 40 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成。减压浓缩, C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:10-1:3)得 1.8 g 白色固体化合物 **109** 粗品。

步骤 3: 在 0 °C, 向溶有化合物 **109** (0.35 g, 0.74 mmol) 的水(15 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 2.35 g, 11.07 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 0.8 g, 3.68 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。用甲苯(20 mL×4)萃取出杂质, 水层直接用 C18 制备(乙腈:水=1:10-1:3, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100))得 166 mg 白色固体化合物 **G35**, 收率为 49%。

ESI-MS calc. for $C_{14}H_{21}N_{10}O_8$ $[M+H]^+$ $m/z = 457.1$, found $m/z = 457.1$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.40 - 4.25 (m, 2H), 4.20 - 4.11 (m, 1H), 4.10 - 3.92 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.57 - 3.20 (m, 8H).

实施例 24: 化合物 **G36** 的合成

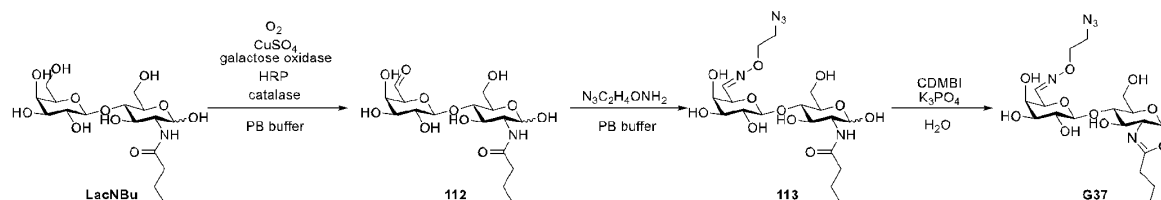


步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 8 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 4 mL), 硫酸铜($CuSO_4$, 1mM, 1.2 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 66 mg)和过氧化氢酶(catalase, 2 mL), 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C 下, 向溶有化合物 **LacNPr** (1.6 g, 4.03 mmol) 的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 40 mL)中(1.0 L 单口反应瓶)通入氧气(O_2) 30 分钟, 再将混合酶加入到反应体系中, 30 °C 水浴反应 6 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气, 反应液不做进一步处理, 直接用于下一步。加入 $N_3C_2H_4ONH_2$ (0.62 g, 6.07 mmol), 室温反应 14 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 减压浓缩, 残余物加入 40 mL 甲醇复溶, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物 C18 制备(乙腈:水=1:20-1:3, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 0.84 g 白色固体化合物 **111**, 收率为 43%。

步骤 3: 在 0 °C, 向溶有化合物 **111** (840 mg, 1.75 mmol) 的水(30 mL)溶液中(100 mL 三口瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 5.58 g, 26.29 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 1.9 g, 8.75 mmol), 然后再 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。将反应液过滤, 滤液直接用制备型高效液相色谱仪(甲醇:水=1:20-1:4, 武汉睿合色谱技术, LC 2100), 得 417 mg 白色固体化合物 **G36**, 收率为 51%。

ESI-MS calc. for $C_{17}H_{28}N_3O_{10}$ $[M+H]^+$ $m/z = 462.2$, found $m/z = 462.2$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.51 (d, $J = 4.8$ Hz, 0.7H), 6.85 (d, $J = 5.9$ Hz, 0.3H), 5.95 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.40 – 4.32 (m, 1H), 4.32 – 4.22 (m, 2H), 4.19 – 4.17 (m, 0.3H), 4.17 – 4.11 (m, 2H), 4.04 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 3.3$ Hz, 0.7H), 3.68 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.54 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H), 3.43 (dd, $J = 12.0, 6.3$ Hz, 3H), 3.32 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.31 – 2.23 (m, 2H), 1.03 (t, $J = 8.2$ Hz, 3H).

实施例 25: 化合物 G37 的合成

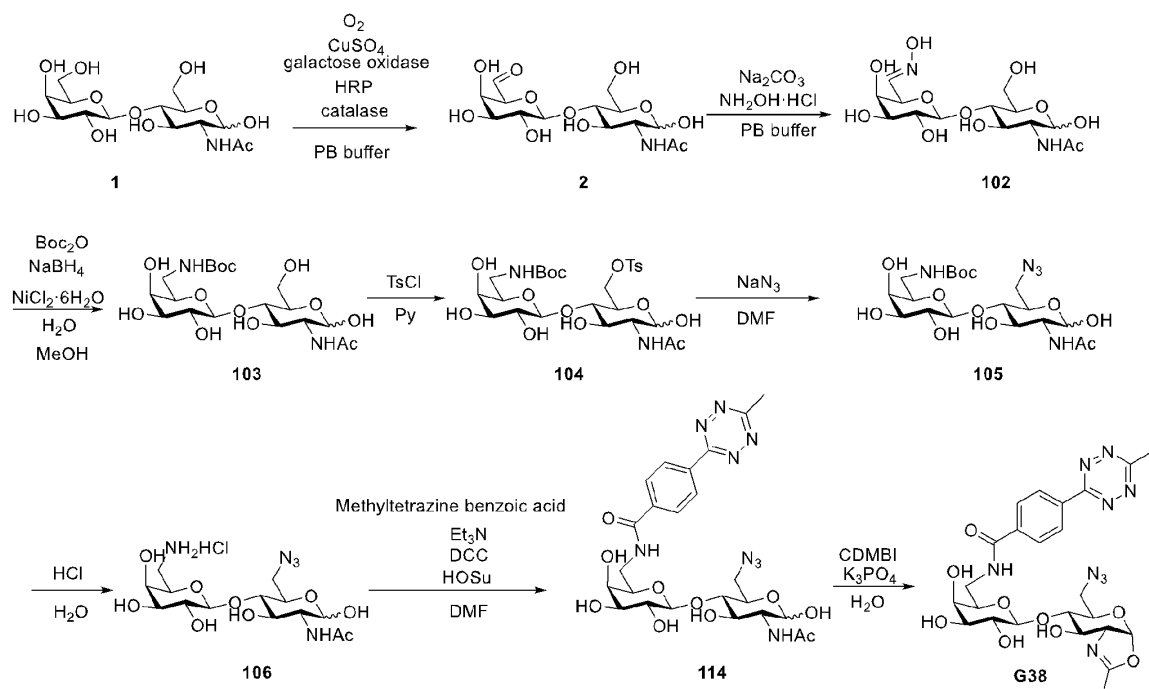


步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 8 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 4 mL), 硫酸铜($CuSO_4$, 1mM, 1.2 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 66 mg)和过氧化氢酶(catalase, 2 mL), $30^\circ C$ 水浴活化 30 分钟。 $30^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **LacNBu** (1.6 g, 3.89 mmol)的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 40 mL)中(1.0 L 单口反应瓶)通入氧气(O_2)30 分钟后, 再将混合酶加入到反应体系中, $30^\circ C$ 水浴反应 5 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气。向反应液加入 $N_3C_2H_4ONH_2$ (0.6 g, 5.88 mmol), 室温搅拌 14 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 减压浓缩, 残余物加入甲醇(40 mL)复溶, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物 **C18** 制备(乙腈:水=1:20-1:3, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 0.6 g 白色固体化合物 **113**, 收率为 31%。

步骤 3: 在 $0^\circ C$, 向溶有化合物 **113** (0.5 g, 1.01 mmol)的水(40 mL)溶液中(100 mL 三口瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 3.2 g, 15.08 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 1.1g, 5.07 mmol), 然后再 $0^\circ C$ 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。将反应液过滤, 滤液直接用 **C18** 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:10-1:3, 制备型高效液相色谱仪(甲醇:水=1:20-1:4, 武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 400 mg 白色固体化合物 **G37**, 收率为 83%。

ESI-MS calc. for $C_{18}H_{30}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$ $m/z = 476.2$, found $m/z = 476.2$. 1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 7.67 (d, $J = 4.8$ Hz, 0.7H), 7.01 (d, $J = 4.6$ Hz, 0.3H), 6.11 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.85 (dd, $J = 4.6, 1.2$ Hz, 0.3H), 4.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 0.7H), 4.50 – 4.39 (m, 2H), 4.38 – 4.26 (m, 2.3H), 4.22 (ddd, $J = 6.6, 3.0, 1.5$ Hz, 1H), 4.07 (d, $J = 3.2$ Hz, 0.7H), 3.87 – 3.80 (m, 1H), 3.71 (td, $J = 10.5, 5.8$ Hz, 3H), 3.65 – 3.53 (m, 3H), 3.51 – 3.44 (m, 1H), 2.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.68 (h, $J = 7.5$ Hz, 2H), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

实施例 26: 化合物 G38 的合成



步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 25 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 12.5 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 210 mg), 过氧化氢酶(catalase, 6.25 mL)和硫酸铜($CuSO_4$, 1mM, 4 mL), 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C下, 向溶有化合物 **1**(5 g, 13.04 mmol)的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 125 mL)中(500 mL 三口反应瓶)通入氧气(O_2)30 分钟后, 再将混合酶加入到反应体系中, 30 °C水浴反应 6 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气。向反应液加入 Na_2CO_3 (691 mg, 6.52mmol), $NH_2OH \cdot HCl$ (997 mg, 14.35 mmol), 室温反应 3 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 加入甲醇(300 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇(300 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=6:1-3:1)得 4.0 g 化合物 **102**, 产率 77%。

步骤 3: 在 0 °C下, 向溶有化合物 **102** (5.5 g, 13.88 mmol)和 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (8.25 g, 34.71 mmol)的 MeOH (160 mL)和磷酸缓冲液(PB, 80 mL)混合溶液(500 mL 三口反应瓶)加入 $NaBH_4$ (3.15 g, 83.27 mmol)和 Boc_2O (9.09 g, 41.65 mmol), 0 °C搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:5-1:2)得 3.2 g 白色固体化合物 **103**, 收率为 48%。

步骤 4: 在 -20 °C下, 向溶有化合物 **103** (2.5 g, 5.18 mmol)的吡啶(50 mL)溶液(250 mL 三口反应瓶)加入 $TsCl$ (1.83 g, 9.60 mmol), 搅拌过夜。减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-3:1)得 1.83 g 化合物 **104**, 收率 55%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **104** (1.83 g, 2.87 mmol)的 DMF (40 mL)溶液(100 mL 三口反应瓶)加入 NaN_3 (1.87 g, 28.76 mmol), 然后升温至 60 °C搅拌 48 小时。反应液过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:2)得 1.35 g 白色固体化合物 **105**, 收率为 92%。

步骤 6: 将化合物 **105** (0.5 g, 0.99 mmol)溶于稀 HCl (6.6 mL, 1.5 M)溶液(25 mL 三口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩得化合物 **106** 粗品, 直接投下一步(以 350 mg 产量, 产率 80%计算)。

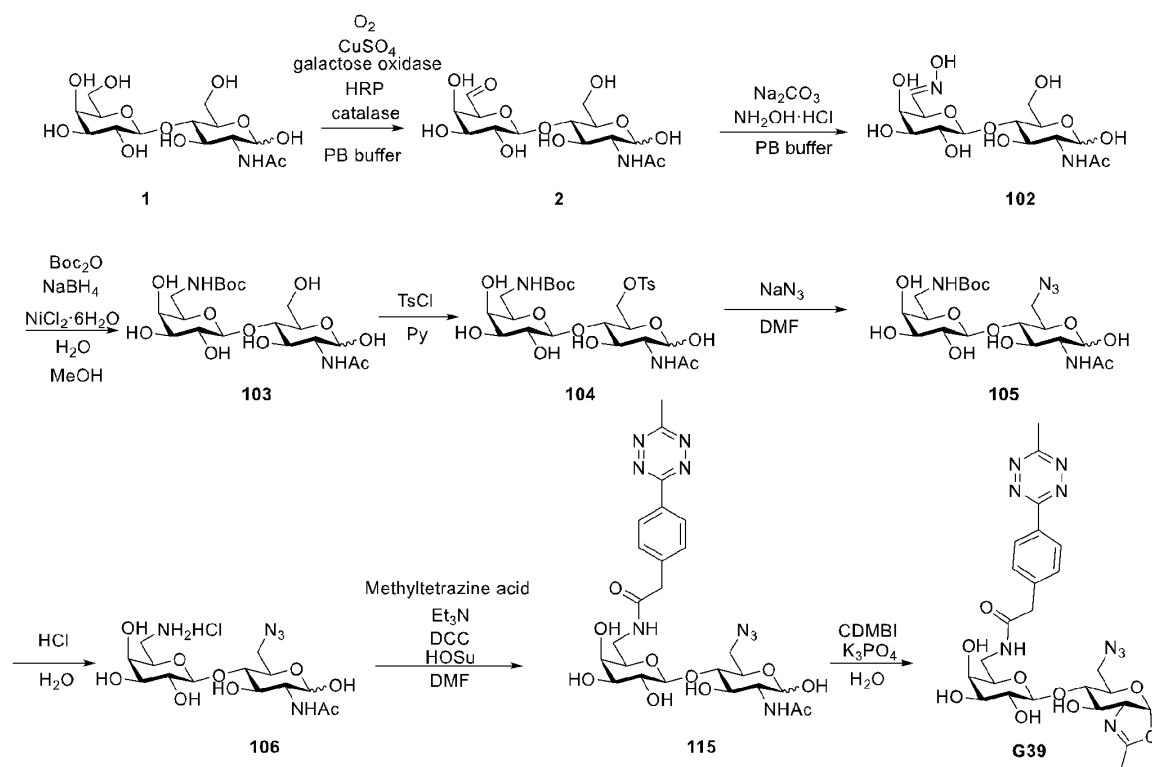
步骤 7: 氮气保护和室温下, 向溶有化合物 **106** (350 mg, 0.79 mmol), HOSu (163 mg, 1.42 mmol), 4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯甲酸(239 mg, 1.11 mmol)和 Et_3N (0.4 mL, 2.88 mmol)的 DMF (10 mL)溶液(25 mL 三口反应瓶)加入 DCC (407 mg, 1.97 mmol), 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:1)得 0.25 g 红色固体化合物 **114**, 收率为 52%。

步骤 8: 在 0 °C, 向溶有化合物 **114** (250 mg, 0.41 mmol)的水(40 mL)和乙腈(20 mL)溶液(250 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 1310 mg, 6.17 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 448 mg, 2.06 mmol), 然后在 0 °C搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。反应液用甲苯(30 mLx4)萃取, 水相直接用 C18

柱色谱法纯化(乙腈:水=1:4-1:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 80 mg 红色固体化合物 **G38**, 收率为 33%。

ESI-MS calc. for $C_{24}H_{30}N_9O_9$ $[M+H]^+$ $m/z = 588.2$, found $m/z = 588.2$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.59 - 8.47 (m, 2H), 8.09 - 7.98 (m, 2H), 6.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.40 (dd, $J = 3.1, 1.7$ Hz, 1H), 4.14 (ddt, $J = 7.0, 3.3, 1.7$ Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 3.92 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.78 (dt, $J = 8.7, 1.6$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.68 (dd, $J = 10.0, 3.4$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 13.2, 2.6$ Hz, 1H), 3.56 (ddd, $J = 10.0, 6.8, 4.1$ Hz, 2H), 3.46 (dd, $J = 13.2, 6.1$ Hz, 1H), 3.11 (s, 3H), 2.07 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H).

实施例 27: 化合物 **G39** 的合成



步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 25 mL), 依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 12.5 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 210 mg), 过氧化氢酶(catalase, 6.25 mL)和硫酸铜($CuSO_4$, 1mM, 4 mL), $30^\circ C$ 水浴活化 30 分钟。 $30^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **1** (5 g, 13.04 mmol)的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 125 mL)中(500 mL 单口反应瓶)通入氧气(O_2) 30 分钟后, 再将混合酶加入到反应体系中, $30^\circ C$ 水浴搅拌 6 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 停止通入氧气。加入 Na_2CO_3 (691 mg, 6.52mmol), $NH_2OH \cdot HCl$ (997 mg, 14.35 mmol), 室温反应 3 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 加入甲醇(300 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇(300 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=6:1-3:1)得 4.0 g 化合物 **102**, 产率 77%。

步骤 3: 在 $0^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **102** (5.5 g, 13.88 mmol)和 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (8.25 g, 34.71 mmol)的 $MeOH$ (160 mL)和磷酸缓冲液(PB, 80 mL)混合溶液中(500 mL 单口反应瓶)加入 $NaBH_4$ (3.15 g, 83.27 mmol)和 Boc_2O (9.09 g, 41.65 mmol), $0^\circ C$ 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:5-1:2)得 3.2 g 白色固体化合物 **103**, 收率为 48%。

步骤 4: 在 $-20^\circ C$ 下, 向溶有化合物 **103** (2.5 g, 5.18 mmol)的吡啶(50 mL)溶液中(250 mL 单口反应瓶)加入 $TsCl$ (1.83 g, 9.60 mmol), 搅拌过夜。减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-3:1)得 1.83 g 化合物 **104**, 收率 55%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **104** (1.83 g, 2.87 mmol)的 DMF (40 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入

NaN₃ (1.87 g, 28.76 mmol), 然后升温至 60°C 搅拌 48 小时。反应液过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:2)得 1.35 g 白色固体化合物 **105**, 收率为 92%。

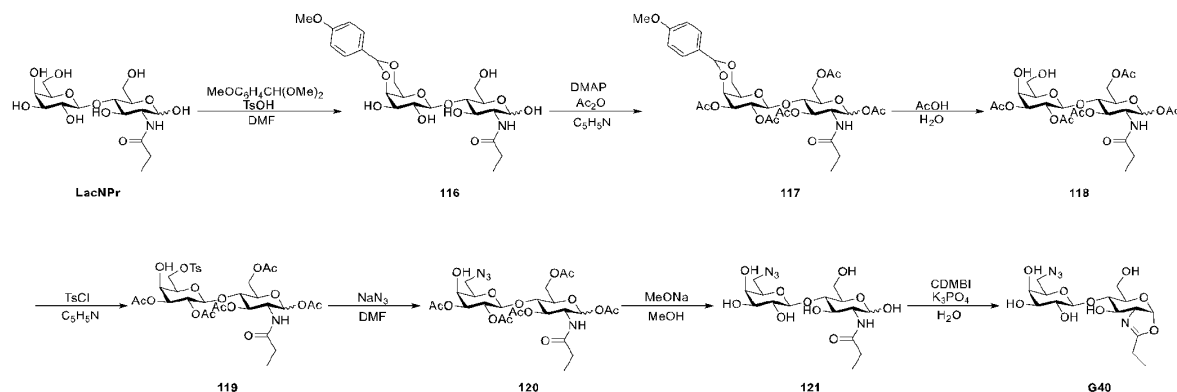
步骤 6: 将化合物 **105** (0.5 g, 0.99 mmol) 溶于稀 HCl (6.6 mL, 1.5 M) 溶液中 (25 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩得化合物 **106** 粗品, 直接投下一步 (以 350 mg 产量, 产率 80% 计算)。

步骤 7: 氮气保护和室温下, 向溶有化合物 **106** (500 mg, 1.13 mmol), HOSu (233 mg, 2.02 mmol), 2-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)乙酸 (337 mg, 1.46 mmol) 和 Et₃N (0.5 mL, 3.60 mmol) 的 DMF (10 mL) 溶液 (50 mL 单口瓶) 加入 DCC (581 mg, 2.82 mmol), 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:1) 得 0.35 g 红色固体化合物 **115**, 收率为 50%。

步骤 8: 在 0 °C, 向溶有化合物 **115** (150 mg, 0.24 mmol) 的水 (50 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入磷酸钾 (K₃PO₄, 771 mg, 3.63 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物 (CDMBI, 263 mg, 1.21 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。反应液用甲苯 (20 mL×4) 萃取, 水相直接用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:4-1:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 63 mg 红色固体化合物 **G39**, 收率为 43%。

ESI-MS calc. for C₂₅H₃₂N₉O₉ [M+H]⁺ m/z = 602.2, found m/z = 602.2. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.06 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.27 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.74 - 3.68 (m, 1H), 3.63 - 3.40 (m, 8H), 3.09 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 2.06 (q, *J* = 1.2 Hz, 3H).

实施例 28: 化合物 **G40** 的合成



步骤 1: 向溶有 **LacNPr** (10 g, 25.17 mmol) 和 TsOH (0.56 g, 3.25 mmol) 的 DMF (220 mL) 溶液 (500 mL 单口反应瓶) 加入 4-甲氧基苯甲醛二甲基缩醛 (11 mL, 64.59 mmol), 室温搅拌 12 小时。然后加入 Et₃N (10 mL) 淬灭反应, 减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1-6:1) 得 6.5 g 白色固体化合物 **116**, 收率为 50%。

步骤 2: 向溶有化合物 **116** (6.5 g, 12.61 mmol) 和 DMAP (0.077 g, 0.63 mmol) 的吡啶 (100 mL) 溶液 (500 mL 单口反应瓶) 加入 Ac₂O (12 mL, 127.77 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (石油醚:乙酸乙酯=1:2) 显示反应完全。将反应液减压浓缩, 残余物加入乙酸乙酯 (500 mL), 然后用水 (500 mL) 洗涤。有机相减压浓缩得 9.1 g 类白色固体化合物 **117**, 无需进一步纯化, 直接投下一步, 收率为 99%。

步骤 3: 将化合物 **117** (9.1 g, 12.54 mmol) 的乙酸 (80 mL) 和水 (20 mL) 混合液 (250 mL 单口反应瓶) 室温搅拌过夜。减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:3-0:1) 得 2.8 g 固体化合物 **118**, 收率为 36%。

步骤 4: 在 -20 °C 下, 向溶有化合物 **118** (2.8 g, 4.64 mmol) 的吡啶 (100 mL) 溶液 (250 mL 单口反应瓶) 加入 TsCl (1.4 g, 7.34 mmol), 然后搅拌过夜。加入 20 mL 甲醇淬灭反应, 减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:2-1:3) 得 1.9 g 固体化合物 **119**, 产率为 54%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **119** (1.9 g, 2.99 mmol) 的 DMF (40 mL) 溶液 (100 mL 三口反应瓶) 加入 NaN₃ (1.46 g, 22.46 mmol), 然后升温至 70 °C 搅拌 60 小时。降温至室温, 过滤, 滤液减压浓缩。向残余物中加水 (100 mL), 用乙酸乙酯 (50 mL×3) 萃取。合并有机相并减压浓缩, 得白色固体化合物 **120** 粗品, 无需进一步纯化, 直接投下一步 (以理论产量 1.58 g 计算)。

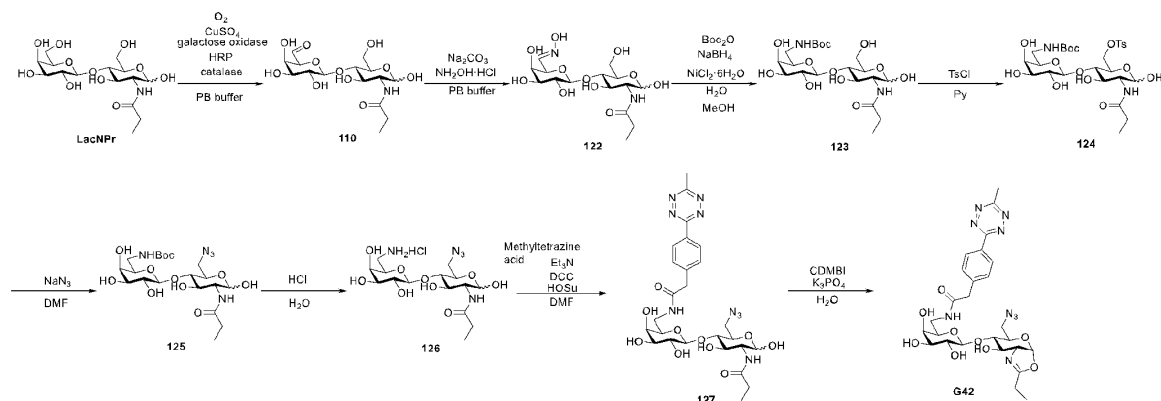
步骤 6: 向溶有化合物 **120** (1.58 g, 2.50 mmol) 的甲醇 (30 mL) 溶液 (100 mL 单口反应瓶) 加入甲醇钠 (0.5 mL, 5

M)的甲醇溶液, 室温搅拌反应 3 小时。用阳离子交换树脂(H⁺)调 pH 至 6~7, 过滤。滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:20-1:10), 得到 380 mg 固体化合物 **121**, 收率为 36%。

步骤 7: 在 0 °C, 向溶有化合物 **121** (200 mg, 0.47 mmol)的水(15 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K₃PO₄, 1.51 g, 7.11 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 0.51 g, 2.35 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。过滤, 滤液直接用 C18 制备(乙腈:水=1:20-1:4, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100))得 115 mg 白色固体化合物 **G40**, 收率为 60%。

ESI-MS calc. for C₁₅H₂₅N₄O₉ [M+H]⁺ m/z = 405.1, found m/z = 405.1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.48 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.22 (ddd, *J* = 6.3, 3.1, 1.6 Hz, 1H), 3.93 - 3.88 (m, 1H), 3.88 - 3.80 (m, 2H), 3.79 - 3.61 (m, 4H), 3.58 - 3.41 (m, 3H), 2.43 (qq, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 2H), 1.20 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 3H)。

实施例 29: 化合物 **G42** 的合成



步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 30 mL)依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 11 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 200 mg), 过氧化氢酶(catalase, 6 mL)和硫酸铜(CuSO₄, 2 mM, 6 mL)水溶液, 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C 下, 向溶有化合物 **LacNPr** (6 g, 15.10 mmol)的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 150 mL)中(500 mL 单口反应瓶)通入氧气(O₂) 30 分钟, 再将混合酶加入到反应体系中, 30 °C 水浴反应 6 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=4:2:1)显示反应完成, 停止通入氧气。向反应液加入 Na₂CO₃ (0.8 g, 7.55 mmol)和 NH₂OH·HCl (1.15 g, 16.55 mmol), 室温搅拌 3 小时。TLC(异丙醇:浓氨水:水=4:2:1)显示反应完成, 加入甲醇(200 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 滤饼用甲醇(200 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:20)得 5.0 g 化合物 **122**, 产率 80%。

步骤 3: 在 0 °C 下, 向溶有化合物 **122** (5 g, 12.18 mmol)和 NiCl₂·6H₂O (7.24 g, 30.46 mmol)的甲醇(400 mL)和磷酸缓冲液(PB, 200 mL)混合溶液(500 mL 单口反应瓶)加入 NaBH₄ (2.77 g, 73.22 mmol)和 Boc₂O (7.98 g, 36.56 mmol), 0 °C 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:2)得 5.1 g 白色固体化合物 **123**, 收率为 84%。

步骤 4: 在 -20 °C 下, 向溶有化合物 **123** (5.1 g, 10.27 mmol)的吡啶(100 mL)溶液中(250 mL 单口反应瓶)加入 TsCl (3.9 g, 20.46 mmol), 搅拌过夜。减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1-10:1)得 6.6 g 化合物 **124**, 收率 99%。

步骤 5: 氮气保护下, 向溶有化合物 **124** (6.6 g, 10.14 mmol)的 DMF (120 mL)溶液中(500 mL 三口反应瓶)加入 NaN₃ (6.6 g, 101.52 mmol), 然后升温至 60 °C 搅拌过夜。反应液将至室温, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:3-2:3)得 2.0 g 白色固体化合物 **125**, 收率为 38%。

步骤 6: 将化合物 **125** (0.6 g, 1.15 mmol)溶于 HCl (7.5 mL, 1.5 M in H₂O)溶液中(100 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩得化合物 **126** 粗品, 直接投下一步(以 450 mg 产量, 产率 85%计算)。

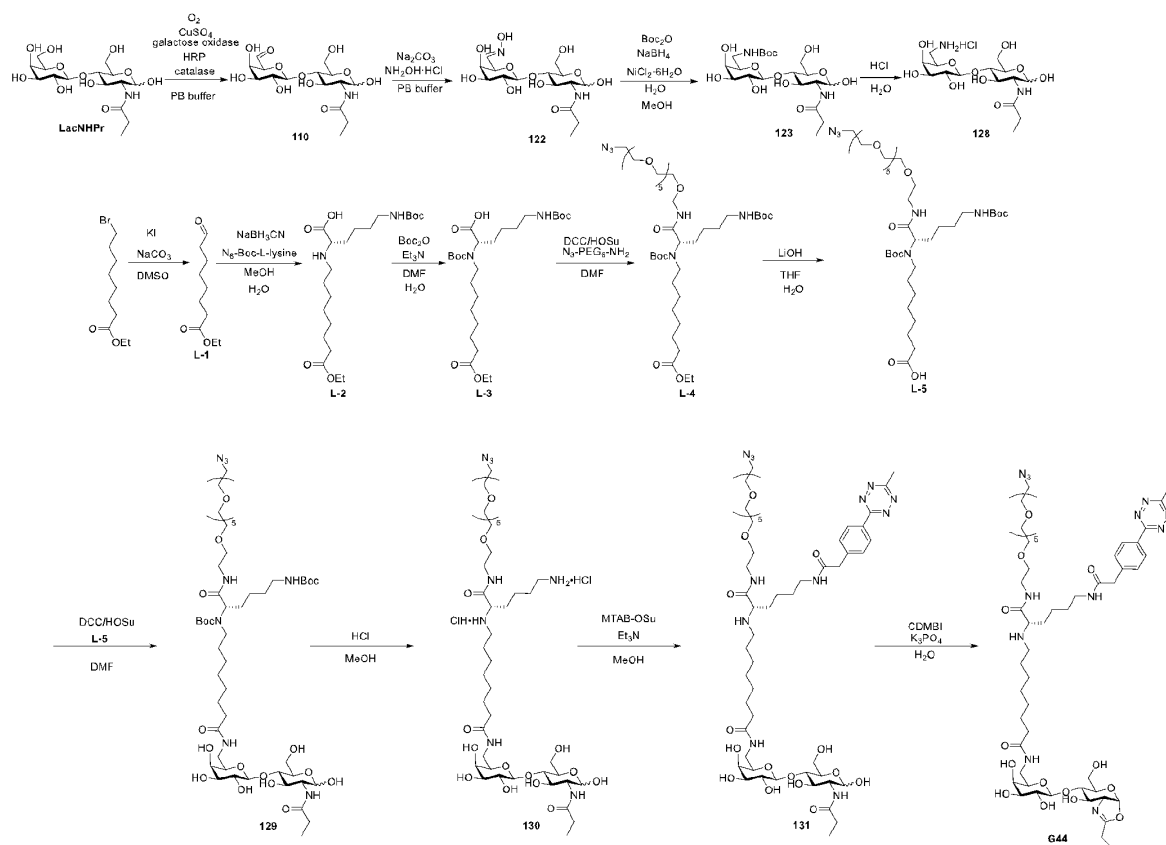
步骤 7: 氮气保护和室温下, 向溶有化合物 **126** (450 mg, 0.98 mmol), HOSu (164 mg, 1.42 mmol), 2-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)乙酸(294 mg, 1.28 mmol)和 Et₃N (0.5 mL, 3.60 mmol)的 DMF (10 mL)溶液中(50 mL 单口瓶)加入 DCC (324 mg, 1.57 mmol), 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:2-1:1)得 0.42 g 红色固体化合物 **127**, 收率为 67%。

步骤 8: 在 0 °C, 向溶有化合物 **127** (200 mg, 0.32 mmol)的水(30 mL)和乙腈(10 mL)混合溶液中(50 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K₃PO₄, 1010 mg, 4.76 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 343 mg, 1.49

mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。反应液用甲苯(20 mLx4)萃取, 水相直接用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:2-2:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 153 mg 红色固体化合物 **G42**, 收率为 78%。

ESI-MS calc. for: $C_{26}H_{34}N_9O_9$ $[M+H]^+$ $m/z = 616.2$, found $m/z = 616.2$. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.15 (dd, $J = 7.2$, 3.5 Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.83 - 3.66 (m, 3H), 3.63 - 3.40 (m, 8H), 3.09 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H), 2.42 - 2.36 (m, 2H), 1.16 (dd, $J = 8.7$, 6.6 Hz, 3H).

实施例 30: 化合物 **G44** 的合成



步骤 1 和 2: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 20 mL)依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 9 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 167 mg), 过氧化氢酶(catalase, 5 mL)和硫酸铜($CuSO_4$, 2 mM, 5 mL)水溶液, 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C 下, 向溶有化合物 **LacNHP** (5 g, 12.6 mmol) 的磷酸缓冲液(phosphate buffer, 100 mL)中(500 mL 单口反应瓶)通入氧气(O_2) 30 分钟。然后, 将混合酶加入到反应体系中, 30 °C 水浴搅拌 6 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=4:2:1) 显示反应完成, 停止通入氧气。向反应液中加入 Na_2CO_3 (0.67 g, 6.32 mmol) 和 $NH_2OH \cdot HCl$ (0.96 g, 13.81 mmol), 室温反应 3 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=4:2:1) 显示反应完成, 加入甲醇(200 mL), 用硅藻土过滤除去沉淀, 滤饼用甲醇(200 mL)淋洗, 所得滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:20)得 4.0 g 化合物 **122**, 产率 77%。

步骤 3: 在 0 °C 下, 向溶有化合物 **122** (4 g, 9.75 mmol) 和 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (5.79 g, 24.36 mmol) 的甲醇 (400 mL) 和磷酸缓冲液(PB, 200 mL) 混合溶液(1.0 L 单口反应瓶)加入 $NaBH_4$ (2.21 g, 58.42 mmol) 和 Boc_2O (6.38 g, 29.23 mmol), 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:4-1:2)得 4.5 g 白色固体化合物 **123**, 收率为 92%。

步骤 4: 将化合物 **123** (1.1 g, 2.22 mmol) 的稀盐酸水溶液 (13 mL, 1.5 M) 室温搅拌 2 小时, 然后减压浓缩得白色固体化合物 **128**, 直接投下一步(以 900 mg 产量, 产率为 94% 计算)。

步骤 5: 向溶有溴辛酸乙酯(27 g, 0.11 mol)的 DMSO (500 mL)溶液中(1.0 L 单口反应瓶) 加入 Na_2CO_3 (11.4 g, 0.11 mol)和 KI (17.9 g, 0.11 mol), 80°C 搅拌过夜。反应液倒入冰水(3 L)中, 石油醚:乙酸乙酯(400 mL:400 mL×3)萃取。合并有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=20:1-15:1), 得 11.0 g 白色油状化合物 **L-1**, 产率 55%。

步骤 6: 在 -10 °C 下, 向溶有化合物 **L-1** (3 g, 16.11 mmol)和 *N*₆-Boc-L-lysine (6 g, 24.36 mmol)的甲醇(320 mL)和水(80 mL)混合溶液中(1.0 L 单口反应瓶) 加入 NaBH_3CN (2 g, 31.83 mmol), -10 °C 搅拌过夜。TLC(二氯甲烷:甲醇=7:1)显示反应完成。反应液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=10:1), 得 5.7 g 淡黄色液体化合物 **L-2**, 产率 85%。

步骤 7: 在室温下, 向溶有化合物 **L-2** (3 g, 7.20 mmol)的 DMF(200 mL)和 H_2O (40 mL)的混合溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入 Boc_2O (15.7 g, 71.9 mmol)和 Et_3N (2 mL, 14.39 mmol), 搅拌过夜。TLC (二氯甲烷:甲醇=10:1)显示反应完成。反应液倒入水中(2 L), 然后乙酸乙酯(400 mL×3)萃取。合并有机相并减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=20:1-15:1), 得 1.7 g 淡黄色液体化合物 **L-3**, 收率为 45%。

步骤 8: 氮气保护下, 向溶有化合物 **L-3** (1.7 g, 3.29 mmol), $\text{N}_3\text{-PEG}_6\text{-NH}_2$ (1.15 g, 3.28 mmol)和 HOSu (0.45 g, 3.91 mmol)的 DMF 溶液(40 mL)中(250 mL 单口反应瓶)加入 DCC(1.22 g, 5.91 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (二氯甲烷:甲醇=10:1)显示反应完成。反应液减压浓缩, DCM (100 mL)复溶后过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=100:1-30:1), 得 2.3 g 淡黄色液体化合物 **L-4**, 收率为 82%。

步骤 9: 在 25°C 下, 向溶有化合物 **L-4** (2.3 g, 2.71 mmol)的 THF(20 mL)和 H_2O (40 mL)混合溶液中(250 mL 单口反应瓶)加入 LiOH (0.2 g, 8.35 mmol), 搅拌过夜。TLC (二氯甲烷:甲醇=50:1)显示反应完成。反应液加入水(50 mL), 然后用乙酸乙酯(150 mL×3)萃取。合并有机相, 有机相减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:1-2:1), 得 1.5 g 白色固体化合物 **L-5**, 收率为 67%。

步骤 10: 氮气保护和室温下, 向溶有化合物 **128** (0.9 g, 2.08 mmol), 化合物 **L-5** (1.5 g, 1.83 mmol), HOSu (0.32 g, 2.78 mmol)和 Et_3N (1 mL, 7.19 mmol)的 DMF (40 mL)溶液中(250 mL 单口瓶)加入 DCC (0.75 g, 3.63 mmol), 搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:1-7:3)得 0.75 g 白色固体化合物 **129**, 收率为 34%。

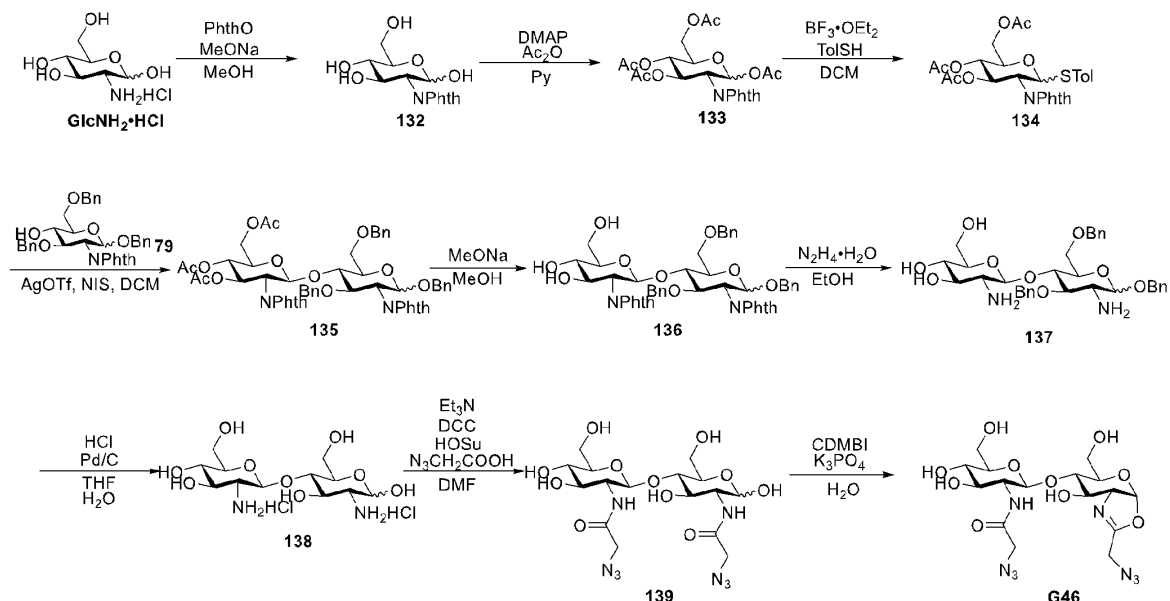
步骤 11: 向溶有化合物 **129** (250 mg, 0.21 mmol)的甲醇(4 mL)溶液中(100 mL 单口瓶)加入浓盐酸 HCl (1 mL, 10 M), 室温反应过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成, 减压浓缩得白色固体化合物 **130**, 直接投下一步(以 200 mg 产量, 收率 90%)。

步骤 12: 氮气保护下, 向溶有化合物 **130** (200 mg, 0.19 mmol)和 Et_3N (0.1 mL, 0.72 mmol)的甲醇(5 mL)溶液中(100 mL 单口瓶)加入 MTAB-OSu (98 mg, 0.30 mmol), 室温搅拌过夜。TLC(异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完成, 减压浓缩, 残余物用 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:1-7:3)得 160 mg 红色固体化合物 **131**, 收率为 70%。

步骤 13: 在 0 °C, 向溶有化合物 **131** (150 mg, 0.12 mmol)的水(60 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 394 mg, 1.86 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 134 mg, 0.62 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=50:5:3)显示反应完全。反应液过滤, 滤液用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:2-2:1, 制备型高效液相色谱仪(武汉睿合色谱技术, LC 2100)), 得 51 mg 红色固体化合物 **G44**, 收率为 34%。

ESI-MS calc. for: $\text{C}_{54}\text{H}_{89}\text{N}_{12}\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 1193.6$, found $m/z = 1193.6$. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.89 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.29 – 4.12 (m, 2H), 4.00 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.69 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.61 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 3.55 – 3.43 (m, 24H), 3.42 – 3.12 (m, 12H), 3.03 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.98 – 2.91 (m, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.30 – 2.15 (m, 4H), 2.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.52 – 1.30 (m, 6H), 1.28 – 1.13 (m, 4H), 1.14 – 1.02 (m, 8H), 0.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H).

实施例 31: 化合物 G46 的合成



步骤 1: 室温下, 向 D-葡萄糖胺盐酸盐(**GlcNH₂·HCl**, 21 g, 0.097 mol)的甲醇(200 mL)悬浮液中(500 mL 单口瓶)加入甲醇钠(5.5 g, 0.102 mol), 室温搅拌 30 分钟, 再加入邻苯二甲酸酐(PhthO, 15.9 g, 0.107 mol), 搅拌过夜。反应液减压浓缩得化合物 **132** 粗品, 直接投下一步(以 30 g 计算投料)。

步骤 2: 向溶有化合物 **132** (30 g, 0.097 mol)和 DMAP (0.6 g, 0.005 mol)的吡啶(500 mL)溶液中(2.0 L 单口反应瓶)加入 Ac₂O (100 mL, 1.065 mol), 室温搅拌过夜。TLC (石油醚:乙酸乙酯=1:1)显示反应完全。将反应液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1-2:1)得 19.5 g 固体化合物 **133**, 收率为 42%。

步骤 3: 向溶有化合物 **133** (19.5 g, 0.041 mol) 和 TolSH (7.6 g, 0.061 mol)的二氯甲烷(300 mL)溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入 BF₃·Et₂O (23 mL, 0.186 mol), 室温搅拌 3 小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完全。用二氯甲烷(500 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠(800 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=7:1-3:1)得 16 g 白色固体化合物 **134**, 收率为 72%。

步骤 4: 氮气保护下, 向溶有化合物 **134** (11.2 g, 0.021 mol)和化合物 **79** (12.0 g, 0.021 mol)的二氯甲烷(400 mL)溶液中(1.0 L 三口反应瓶)加入干燥的 4Å 分子筛(30 g), 室温搅拌 2 小时。降温到-10℃左右, 加入 NIS (7.0 g, 0.031 mol)和 AgOTf (0.53 g, 0.0021 mol), 再升至室温搅拌过夜。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完全。反应液过滤并用二氯甲烷(400 mL)淋洗滤饼, 向滤液加入水(500 mL), 剧烈搅拌下缓慢加入硫代硫酸钠至有机相褪色, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=3:1-1:1)得 18.2 g 无色胶状化合物 **135**, 收率为 88%。

步骤 5: 氮气保护和 0℃下, 向溶有化合物 **135** (18.2 g, 0.018 mol)的甲醇(200 mL)溶液中(500 mL 单口反应瓶)加入甲醇钠(3.6 mL, 5 M)的甲醇溶液, 0℃搅拌 3 小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=1:3)显示反应完成, 加入阳离子树脂(H⁺)中和, 调 pH=6-7。过滤, 滤液减压浓缩得 15.9 g 浅黄色固体化合物 **136** 粗品, 无需进一步纯化, 直接用于投下一步。

步骤 6: 氮气保护下, 向溶有化合物 **136** (13 g, 0.148 mol)的乙醇(700 mL)溶液中(2.0 L 单口反应瓶)加入 N₂H₄·H₂O (10.5 mL, 0.216 mol), 80℃搅拌反应过夜。TLC (二氯甲烷:甲醇=10:1)显示反应完成, 冷却后过滤, 滤液减压浓缩, 得 10.5 g 白色固体化合物 **137**, 收率为 94%。无需进一步纯化, 直接用于投下一步。

步骤 7: 向溶有化合物 **137** (2 g, 3.17 mmol)的四氢呋喃(120 mL)和水(40 mL)混合溶液中(100 mL 三口瓶)加入 Pd/C (1.75 g, 10wt%, 1.64 mmol)和浓 HCl (1.3 mL, 10 M), 充入 H₂ (15 psi), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=4:2:1)显示反应完成, 反应液过滤, 滤液减压浓缩, 得白色固体化合物 **138** 粗品, 无需纯化, 直接用于下一步(以 1.1 g 投下一步)。

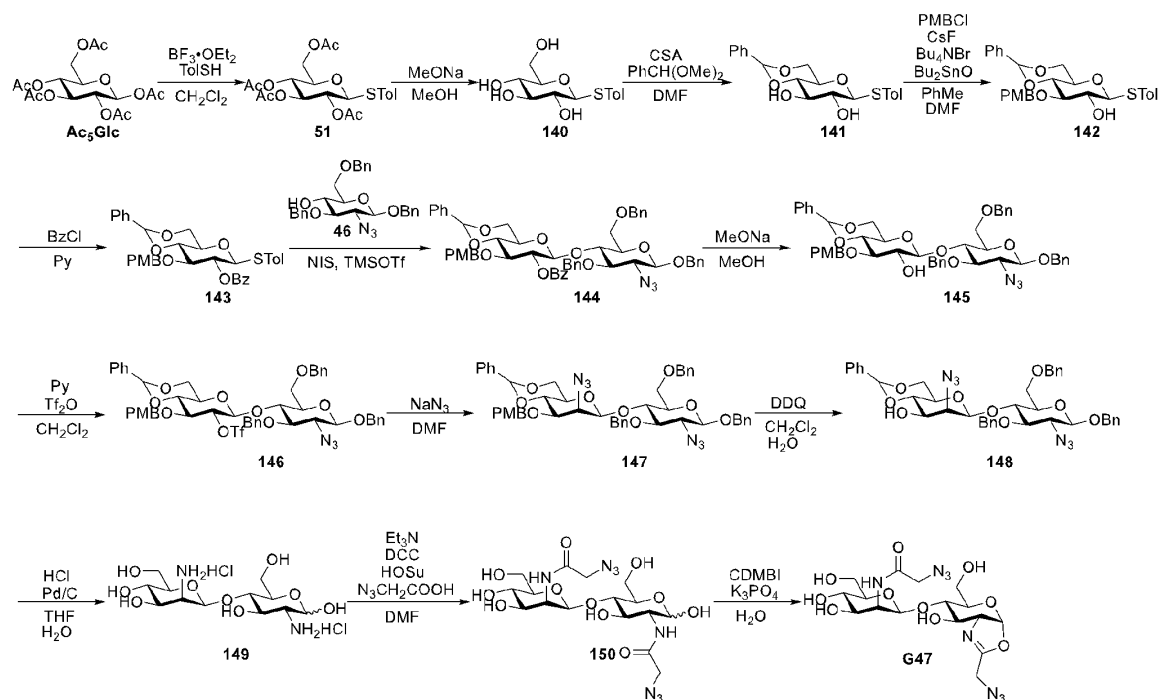
步骤 8: 氮气保护下, 向溶有化合物 **138** (1.1 g, 2.66 mmol), N₃CH₂COOH (807 mg, 7.98 mmol), HOSu (1.1 g, 9.56 mmol)和 Et₃N (3 mL)的 DMF (15 mL)溶液中(100 mL 单口瓶)加入 DCC (2.2 g, 10.66 mmol), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成。过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇

=5:1-4:1)得 0.8 g 白色固体化合物 **139** 粗品,再用酰胺柱色谱法纯化得白色固体产物 0.26 g 化合物 **139**,收率为 19%。

步骤 9: 在 0 °C, 向溶有化合物 **139** (160 mg, 0.32 mmol)的水(12 mL)溶液中(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K_3PO_4 , 1010 mg, 4.76 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 343 mg, 1.58 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液 C18 制备纯化(乙腈:水=1:20-1:4)得 140 mg 白色固体化合物 **G46**, 收率为 91%。

ESI-MS calc. for $C_{16}H_{25}N_8O_{10}$ $[M+H]^+$ m/z = 489.1, found m/z = 489.1. 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 6.18 (dd, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 4.65 - 4.59 (m, 1H), 4.46 (dt, J = 2.8, 1.3 Hz, 1H), 4.27 (dp, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 4.23 - 4.09 (m, 2H), 4.05 (t, J = 1.2 Hz, 2H), 3.95 - 3.86 (m, 1H), 3.78 - 3.54 (m, 6H), 3.50 - 3.39 (m, 2H), 3.36 - 3.29 (m, 1H).

实施例 32: 化合物 **G47** 的合成



步骤 1: 向溶有 **Ac5Glc** (45 g, 0.115 mol) 和 **TolSH** (21.5 g, 0.173 mol)的 DCM (250 mL)溶液中(500 mL 单口反应瓶)加入 $BF_3 \cdot Et_2O$ (43 mL, 0.348 mol), 室温搅拌 3 小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完全。用 DCM (600 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠(1.0 L)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯 =7:1-3:1)得 47 g 白色固体化合物 **51**, 收率为 90%。

步骤 2: 向溶有化合物 **51** (47 g, 0.103 mol), 的甲醇 (500 mL)溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入甲醇钠(10 mL, 5 M)的甲醇溶液, 室温搅拌 2 小时。TLC(二氯甲烷:甲醇=10:1)显示反应完成, 加入阳离子树脂(H⁺)中和, 调 pH=6-7。过滤, 滤液减压浓缩得 28 g 白色固体化合物 **140**, 收率为 95%, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 3: 向溶有化合物 **140** (8 g, 0.028 mol)和苯甲醛二甲基缩醛 (8.4 mL)的 DMF (100 mL)溶液中(250 mL 单口反应瓶)加入右旋樟脑磺酸(CAS: 3144-16-99, 1.62 g, 0.007 mol), 室温搅拌反应过夜。加入三乙胺(3 mL)淬灭反应, 减压浓缩, 残余物用二氯甲烷(150 mL), 饱和碳酸氢钠 (50 mL)和水(50 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物用二氯甲烷:正己烷=1:3 (100 mL)打浆, 得 9 g 白色固体化合物 **141**, 产率 86%。

步骤 4: 氮气保护下, 向溶有化合物 **141** (9 g, 0.024 mol)的甲苯(75 mL)溶液中(250 mL 单口反应瓶)加入 Bu_2SnO (6.9 g, 0.028 mol), 125 °C回流反应 4 小时移除水分。冷却到室温, 减压浓缩, 向残余物加入 DMF (50 mL), Bu_4NBr (8.5 g, 0.026 mol), CsF (4.0 g, 0.026 mol)和 **PMBCl** (4.1 g, 0.015 mol), 氮气保护下, 室温反应过夜。减压浓缩, 向残余物加入乙酸乙酯 (200 mL), 用饱和碳酸氢钠(100 mL)洗涤, 水(100 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯:二氯甲烷=2:1:1)得 10 g 白色固体化合物 **142**, 产率 84%。

步骤 5: 向溶有化合物 **142** (10 g, 0.02 mol)和 DMAP (0.12 g, 0.001 mol)的吡啶(100 mL)溶液中(500 mL 单口反

应瓶)加入苯甲酰氯(BzCl, 3.98 g, 0.028 mol), 室温搅拌过夜。TLC(石油醚:乙酸乙酯=2:1)显示反应完全。将反应液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=5:1-1:1)得 11.5 g 类白色固体化合物 **143**, 收率为 95%。

步骤 6: 氮气保护下, 向溶有化合物 **143** (11.5 g, 0.019 mol)和化合物 **46** (7.6 g, 0.016 mol)的 DCM (400 mL)溶液中(1000 mL 三口反应瓶)加入干燥的 4Å 分子筛(30 g), 室温搅拌 2 小时。降温到-10 °C, 向反应液中加入 NIS (5.4 g, 0.024 mol)和 TMSOTf (2.1 g, 0.009 mol)。加料完毕升温至室温, 在室温搅拌过夜。TLC (石油醚:乙酸乙酯=5:1)显示反应完全。反应液过滤并用 DCM (400 mL)淋洗滤渣, 向滤液加入水(400 mL), 剧烈搅拌下缓慢加入硫代硫酸钠至有机相褪色, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=15:1-7:1)得 12 g 无色胶状化合物 **144**, 收率为 79%。

步骤 7: 向溶有化合物 **144** (12 g, 0.013 mol)的 MeOH (200 mL)溶液中(500 mL 单口反应瓶)加入 MeONa (1.26 mL, 5 M)的甲醇溶液, 室温搅拌 2 小时。TLC(石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完成, 加入阳离子树脂(H⁺)中和, 调 pH=6-7。过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1-3:1)得 10 g 白色固体化合物 **145**, 收率为 94%, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 8: 再氮气保护和 0 °C 下, 向溶有化合物 **145** (10 g, 0.012 mol)的二氯甲烷(100 mL)和吡啶(3 mL)溶液中(250 mL 三口反应瓶)加入三氟甲磺酸酐(Tf₂O, 3 mL), 0 °C 搅拌反应 2 小时。TLC (石油醚:乙酸乙酯=3:1)显示反应完成, 加入二氯甲烷(100 mL)稀释, 再用稀盐酸 (1 M, 100 mL)洗涤, 饱和碳酸氢钠 (100 mL)洗涤, 有机相减压浓缩得 11 g 浅黄色固体化合物 **146**, 收率为 95%, 无需进一步纯化, 直接投下一步。

步骤 9: 向溶有化合物 **146** (11 g, 11.41 mmol)的 DMF (150 mL)溶液中(1.0 L 单口反应瓶)加入 NaN₃ (2.9 g, 44.61 mmol), 60 °C 搅拌反应过夜。TLC (石油醚:乙酸乙酯=4:1)显示反应完成, 加入水 (1000 mL)稀释, 乙酸乙酯(250 mLx2)萃取, 合并有机相, 用饱和碳酸钠 (100 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=10:1-8:1)得 7.2 g 白色固体化合物 **147**, 收率为 73%。

步骤 10: 在 0 °C 下, 向溶有化合物 **147** (3.2 g, 3.73 mmol)的 DCM (45 mL)和 H₂O (2.5 mL)混合物中(250 mL 单口反应瓶)加入 DDQ (1.92 g, 8.46 mmol), 搅拌反应 0.5 小时, 然后升至室温继续搅拌 1 小时。反应液用二氯甲烷 (200 mL)稀释, 饱和碳酸氢钠(200 mL)洗涤, 有机相减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=5:1-3:1)得 2.1 g 浅黄色胶状化合物 **148**, 产率 76%。

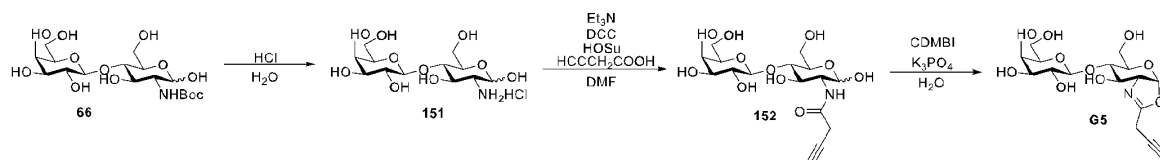
步骤 11: 向溶有化合物 **148** (2.1 g, 2.85 mmol)的 THF (180 mL)和 H₂O (60 mL)混合溶液中(500 mL 单口反应瓶)加入 Pd/C (2 g, 10wt%, 1.88 mmol)和 HCl (1.12 mL, 10 M)水溶液, 充入 H₂ (15 psi), 室温搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=4:2:1)显示反应完成, 反应液过滤, 滤液减压浓缩, 得浅黄色固体化合物 **149**, 无需纯化, 直接用于下一步(以 1.1 g (95%收率)投下一步)。

步骤 12: 氮气保护下, 向溶有化合物 **149** (1.1 g, 2.66 mmol), N₃CH₂COOH (807 mg, 7.98 mmol), HOSu (1.1 g, 9.56 mmol)和 Et₃N (3 mL)的 DMF (15 mL)溶液中(100 mL 单口瓶)加入 DCC (2.2 g, 10.66 mmol), 室温反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成。反应液过滤, 滤液减压浓缩, 残余物过硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=5:1-4:1)得化合物 **150** 粗品, 再用酰胺柱色谱法纯化得白色固体产物 0.3 g 化合物 **150**, 收率 22%。

步骤 13: 在 0 °C, 向溶有化合物 **150** (150 mg, 0.30 mmol)的水(8 mL)溶液中(50 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾(K₃PO₄, 943 mg, 4.44 mmol)和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 321 mg, 1.48 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液用 C18 制备纯化(乙腈:水=1:20-1:5)得 98 mg 白色固体化合物 **G47**, 收率为 67%。

ESI-MS calc. for C₁₆H₂₅N₈O₁₀ [M+H]⁺ m/z = 489.1, found m/z = 489.1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.17 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.47 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 4.43-4.38 (m, 1H), 4.25 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.13 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.92-3.66 (m, 5H), 3.64-3.55 (m, 1H), 3.53-3.44 (m, 1H), 3.42-3.34 (m, 1H), 3.34-3.29 (m, 1H).

实施例 33: 化合物 **G5** 的合成



步骤 1: 化合物 **66** (0.8 g, 1.81 mmol) 溶于 HCl (10 mL, 1.5 M) 水溶液中(100 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3)显示反应完成。反应液减压浓缩, 得白色固体化合物 **151**, 无需纯化, 直接用于下

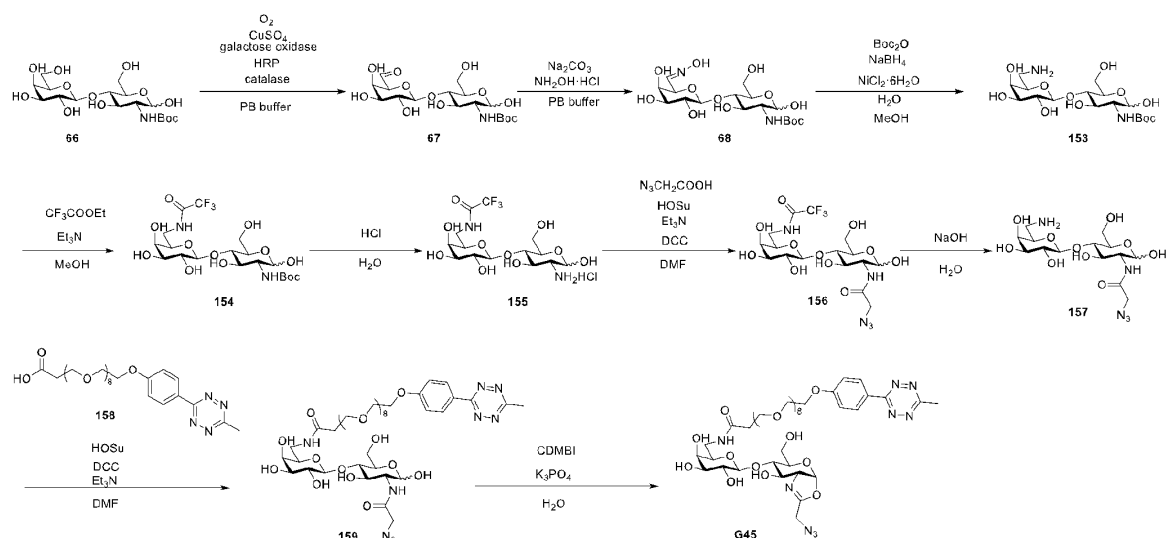
一步(以产量 0.65 g 投下一步)。

步骤 2: 氮气保护下, 向溶有化合物 **151** (650 mg, 1.72 mmol), 3-炔基丁酸 (217 mg, 2.58 mmol), HOSu (356 mg, 3.09 mmol) 和 Et₃N (0.6 mL) 的 DMF (10 mL) 溶液(100 mL 单口瓶)加入 DCC (710 mg, 3.44 mmol), 室温反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成。过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用酰胺柱色谱法纯化得 0.12 g 白色固体化合物 **152**, 产率 17%。

步骤 3: 在 0 °C, 向溶有化合物 **152** (120 mg, 0.29 mmol) 的水(16 mL)溶液(100 mL 三口反应瓶)加入磷酸钾 (K₃PO₄, 750 mg, 3.53 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物(CDMBI, 256 mg, 1.18 mmol), 然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。过滤除去沉淀, 滤液用 C18 柱色谱法纯化(乙腈:水=1:20-1:5)得 82 mg 白色固体化合物 **G5**, 收率为 71%。

ESI-MS calc. for C₁₆H₂₄NO₁₀ [M+H]⁺ m/z = 390.1, found m/z = 390.1. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 6.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 6.7, 1.8 Hz, 2H), 4.43 (dd, *J* = 3.2, 1.8 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.28 (dq, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 1H), 3.89 (dd, *J* = 3.4, 0.9 Hz, 1H), 3.85 - 3.71 (m, 4H), 3.71 - 3.58 (m, 3H), 3.54 - 3.41 (m, 2H)。

实施例 34: 化合物 **G45** 的合成



步骤 1: 向磷酸缓冲液(phosphate buffer, 30 mL)中依次加入半乳糖氧化酶(galactose oxidase, 9.5 mL), 硫酸铜 (CuSO₄, 2 mM, 5 mL), 辣根过氧化物酶(HRP, horseradish peroxidase, 150 mg)和过氧化氢酶(catalase, 4.5 mL), 然后在 30 °C 水浴活化 30 分钟。30 °C 下, 向 1.0 L 三口反应瓶中分别加入磷酸缓冲液(phosphate buffer, 120 mL)和化合物 **66** (6 g, 13.59 mmol), 入氧气(O₂) 15-30 分钟, 然后将混合酶加入到反应体系中, 30 °C 水浴反应 6 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 停止通入氧气, 反应液不做进一步处理, 直接用于下一步。

步骤 2: 向反应液中加入 Na₂CO₃ (0.72 g, 6.79 mmol) 和盐酸羟胺(NH₂OH·HCl, 1.04 g, 14.97 mmol), 室温反应 3 小时, TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成。加入甲醇 200 mL, 用硅藻土过滤除去沉淀, 沉淀用甲醇 200 mL 淋洗, 所得滤液直接用于投下一步反应(其中的化合物 **68**, 以 5 g, 收率 81%)。

步骤 3: 在 0 °C 下, 向溶有化合物 **68** (5.0 g, 11.00 mmol) 和 NiCl₂·6H₂O (8.25 g, 34.71 mmol) 的 MeOH (400 mL) 和磷酸缓冲液(PB, 170 mL) 混合溶液(2000 mL 单口反应瓶) 加入 NaBH₄ (2.08 g, 55.03 mmol), 0 °C 反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 过滤除去沉淀, 滤液减压浓缩, 残余物过 C18 柱色谱法纯化(甲醇:水=1:20, 盐酸体系)得 2.95 g 白色固体化合物 **153**, 收率为 56%。

步骤 4: 它到溶有化合物 **153** (1.8 g, 3.77 mmol), Et₃N (1 mL) 的 MeOH (40 mL) 溶液(100 mL 单口瓶) 加入 CF₃COOEt (2 mL), 反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 制备纯化(甲醇:水=1:3-1:1)得 1.2 g 白色固体化合物 **154**, 收率为 54%。

步骤 5: 将化合物 **154** (0.6 g, 1.12 mmol) 溶于 HCl (10 mL, 1.5 M) 水溶液(100 mL 单口反应瓶), 室温搅拌 2 小时。然后减压浓缩得化合物 **155** 粗品, 直接投下一步(以 500 mg 产量计算)。

步骤 6: 向溶有化合物 **155** (500 mg, 1.06 mmol), Et₃N (0.3 mL), N₃CH₂COOH (128 mg, 1.27 mmol), HOSu (182 mg, 1.58 mmol) 的 DMF (10 mL) 溶液(100 mL 单口瓶)加入 DCC (393 mg, 1.90 mmol), 室温反应过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成, 过滤, 滤液减压浓缩, 残余物用 C18 制备纯化(甲醇:水=1:20-1:10)得 400 mg

白色固体化合物 **156**，收率为 49%。

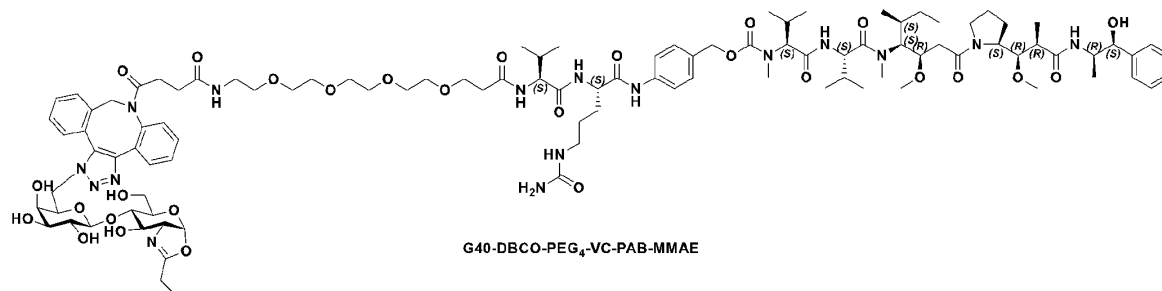
步骤 7: 向溶有 NaOH (50 mg, 1.25 mmol) 的 H₂O (2.5 mL) 溶液 (10 mL 单口反应瓶) 加入化合物 **156** (200 mg, 0.39 mmol)，室温搅拌 2 小时。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成，然后用稀盐酸调 pH=3-4，减压浓缩得化合物 **157** 粗品，直接投下一步 (以 150 mg 产量计算)。

步骤 8: 向溶有化合物 **158** (1-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenoxy)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oic acid, 325 mg, 0.53 mmol)，HOSu (73 mg, 0.63 mmol) 的 DMF (5 mL) 溶液 (25 mL 单口瓶) 加入 DCC (132 mg, 0.64 mmol)，室温反应过夜。再加入化合物 **157** (150 mg, 0.35 mmol) 的 DMF (5 mL) 溶液和 Et₃N (0.1 mL)，室温反应 5 小时，TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完成，滤液减压浓缩，残余物用 C18 制备纯化 (甲醇:水=1:4-1:1) 得 150 mg 红色固体化合物 **159**，收率为 41%。

步骤 9: 在 0 °C，向溶有化合物 **159** (150 mg, 0.15 mmol) 的水 (45 mL) 溶液 (250 mL 三口反应瓶) 加入磷酸钾 (K₃PO₄, 469 mg, 2.21 mmol) 和 2-氯-1,3-二甲基-1H-苯并咪唑-3-鎓氯化物 (CDMBI, 160 mg, 0.74 mmol)，然后在 0 °C 搅拌过夜。TLC (异丙醇:浓氨水:水=25:5:3) 显示反应完全。将反应液过滤，滤液直接用 C18 柱色谱法纯化 (乙腈:水=1:10-3:2，制备型高效液相色谱仪 (武汉睿合色谱技术，LC 2100)，得 108 mg 红色固体化合物 **G45**，收率为 73%。

ESI-MS calc. for C₄₂H₆₆N₉O₁₉ [M+H]⁺ m/z = 1000.4, found m/z = 1000.4; C₄₂H₆₅N₉O₁₉K [M+K]⁺ m/z = 1038.3, found m/z = 1038.3. ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 3.1, 1.6 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 5.7, 2.9 Hz, 2H), 4.23 - 4.05 (m, 3H), 3.94 - 3.87 (m, 2H), 3.80 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.77 - 3.49 (m, 35H), 3.48 - 3.29 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 2.48 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

实施例 35: 化合物 **G40-DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE** 的合成



将 G40 (8.1 mg, 0.02 mmol) 与 DBCO-VC-PEG₄-PAB-MMAE (16.58 mg, 0.01 mmol) 分别溶解于 1 mL PBS 7.4 与 1 mL DMSO 中，随后将二者混合，25 °C 反应过夜，LC-MS 检测反应完全，反应液 C18 制备纯化 (乙腈:水=1:50-5:1) 得 13 mg 白色固体化合物 **G40-DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE**，收率为 63%。核磁样品先用重水-氘代甲醇溶解随后冻干，再用氘代 DMSO 溶解送样。

ESI-MS calc. for C₁₀₃H₁₅₄N₁₆O₂₈ [M+2H]²⁺ m/z = 1031.2, found m/z = 1032.0. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.01 (s, 1H), 8.38 - 8.11 (m, 1H), 8.10 - 7.76 (m, 2H), 7.63 (dq, *J* = 28.4, 6.3, 4.0 Hz, 4H), 7.55 - 7.21 (m, 7H), 7.21 - 7.09 (m, 1H), 6.08 - 5.77 (m, 2H), 5.41 (s, 1H), 5.18 - 4.85 (m, 3H), 4.81 - 4.32 (m, 6H), 4.32 - 3.83 (m, 6H), 3.82 - 3.52 (m, 4H), 3.47 (d, *J* = 3.4 Hz, 9H), 3.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 3.19 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 3.11 (t, 3H), 3.07 - 2.56 (m, 6H), 2.44 - 1.90 (m, 8H), 1.70 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.63 - 1.25 (m, 5H), 1.13 - 0.95 (m, 6H), 0.93 - 0.61 (m, 16H).

2、酶的重组表达与纯化

实施例 36: 酶的重组表达与纯化

将以下四个酶的编码基因克隆到 pET22b 载体中 (金斯瑞)。所述四个酶分别是：来自 *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus Sz105 的 Endo Se2，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的 37-1011；来自 *Streptococcus iniae* 的 Endo Si，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 的 34-928；来自 *Streptococcus pyogenes* NZ131 (血清型 M49) 的 Endo S2，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 的 38-843；来自 *Streptococcus pyogenes* 的 Endo S，其氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 的 37-995。

将含有目的基因的质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，涂布在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素 (ampicillin) 的 2×YT 固体平板上，37 °C 过夜培养。挑取单克隆，接种到 4 mL 含有 100 μg/mL 氨苄青霉素 (ampicillin) 的 2×YT 液体培养基中，过夜培养。吸取 4 mL 菌液接种到 1 L 含有 100 μg/mL 氨苄青霉素 (ampicillin) 的 2×YT 肉汤培养基中，37 °C 培养直至 OD₆₀₀ 达到 0.8-1.0 为止。然后，将 0.4 mM 的异丙基 β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 添加到培养物中，20 °C 培养以诱导蛋白质过量表达。16 小时之后，离心收获菌体。通过 B-PER™ Bacterial Protein Extraction

Reagent (Thermo), 遵循制造商的说明书来裂解细胞沉淀物。用 cOmplete™ His-Tag Purification Column (Roche)、SDA030 蛋白纯化系统 (Sepure) 纯化 Endo S、Endo S2、Endo Si 和 Endo Se2 的重组蛋白。用 Amicon 离心过滤器 (30 kDa, Millipore) 浓缩, 并且进一步经过 HiLoad™ 26/600 Superdex™ 200 prep grade 色谱柱 (Cytiva) 通过尺寸排阻法进行纯化。含 Endo S、Endo S2、Endo Si 和 Endo Se2 融合蛋白的组分分别用 Amicon 离心过滤器 (30 kDa, Millipore) 浓缩, 保存在储存缓冲液 (20 mM PB, pH 7.5) 中。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳和凝胶成像仪 (Gel Doc EZ Imager, Bio-RAD)、Image Lab 扫描软件分析蛋白纯度, 并使用分光光度计 (Nano-300) 定量蛋白浓度。

3、二糖连接子的转移活性研究

实施例 37: Endo Se2、Endo Si 等糖苷内切酶对多种二糖连接子的转移活性研究

将包含 SEQ ID NO:5 的 Fc 段的野生型抗体溶解于 20 mM 磷酸盐, 150 mM NaCl, pH 7.4 的缓冲液中 (10 mg/mL), 加入终浓度为 0.4 mg/mL 的野生型 Endo S2 进行水解, 37°C 孵育过夜, 通过 Protein A 磁珠纯化得到含有一个 N-乙酰葡萄糖胺或核心岩藻糖化的 N-乙酰葡萄糖胺的去糖基化抗体。

制备得到的去糖基化抗体、二糖连接子(即化合物 G0-G2)、野生型糖苷内切酶(即 Endo S 或 Endo S2 或 Endo Si 或 Endo Se2), 使各项的浓度依次为 10 mg/mL、1.67 mM (抗体浓度的 25 倍当量)、0.4 mg/mL, 调节反应体系 pH 为 7.4, 反应温度为 25°C, 每 0.5、1、2、3、6 小时取出 4 μL 样品, 加入 36 μL 含 0.1% 的甲酸的 PBS 溶液终止反应, 通过还原 LC-MS 进行分析, 结果如图 1-3、表 1 所示。

对化合物 G0, 1 小时, Endo Se2 与 Endo Si 糖基转移效率相当, 显著优于 Endo S2 与 Endo S; 6 小时, Endo Se2、Endo Si 与 Endo S2 糖基转移效率相当, 显著优于 Endo S (图 1, 表 1)。

对化合物 G1, 1 小时, Endo Si 糖基转移效率优于 Endo Se2, 显著优于 Endo S2。Endo S 对化合物 G1 转移效率较弱; 6 小时, Endo Se2 与 Endo Si 糖基转移效率相当, 优于 Endo S2 (图 2, 表 1)。

对化合物 G2, 1 小时, Endo Si 与 Endo Se2 糖基转移效率相当, 显著优于 Endo S2。Endo S 对化合物 G2 转移效率较弱; 6 小时, Endo Se2 与 Endo Si 糖基转移效率相当, 优于 Endo S2 (图 3, 表 1)。

表 1 不同糖苷内切酶的转糖活性

二糖连接子	糖苷内切酶	糖基转移效率 (%)				
		0.5 小时	1 小时	2 小时	3 小时	6 小时
G0	Endo Se2	96.6	97.9	98.0	97.2	96.2
	Endo Si	89.3	97.1	97.8	97.8	97.6
	Endo S2	65.7	82.7	92.4	94.8	97.3
	Endo S	15.7	26.2	36.6	43.7	56.4
G1	Endo Se2	64.8	82.1	92.4	94.5	94.7
	Endo Si	93.2	95.2	95.5	95.5	95.5
	Endo S2	33.1	49.2	67.7	77.3	87.5
	Endo S	5.6	9.3	13.0	15.7	21.1
G2	Endo Se2	92.2	92.9	92.8	92.7	97.2
	Endo Si	93.4	93.4	93.3	93.1	93.8
	Endo S2	22.2	36.2	51.9	61.0	82.7
	Endo S	7.0	12.3	17.9	22.1	30.5

实施例 38: Endo Se2、Endo Si 等糖苷内切酶对多种二糖连接子的底物特异性研究

野生型帕妥珠单抗、二糖连接子、野生型糖苷内切酶(即 Endo S 或 Endo S2 或 Endo Si 或 Endo Se2), 使各项的浓度依次为 10 mg/mL、1.67 mM (抗体浓度的 25 倍当量)、0.4 mg/mL, 调节反应体系 pH 为 7.4, 反应温度为 25°C, 6 小时后取出 4 μL 样品, 加入 36 μL 含 0.1% 的甲酸的 PBS 溶液终止反应, 通过 LC-MS 进行分析。

对二糖连接子类化合物, Endo Se2、Endo Si、Endo S2、Endo S 显示出有差异的底物特异性与糖基转移效率。Endo Se2 与 Endo Si 相较于 Endo S2 与 Endo S 具有更宽的底物特异性, 针对各底物的最适糖苷内切酶通常为 Endo Se2 或 Endo Si (表 2)。

表 2 不同糖苷内切酶的转糖活性

糖基转移效率 (%)	酶			
	Endo Se2	Endo Si	Endo S2	Endo S

G0	>95	>95	>95	56.4
G1	94.7	>95	87.5	21.1
G2	>95	93.8	82.7	30.5
G4	94.8	>95	30	24
G4b	16.1	38.4	13.9	17.8
G5	10	34	0	0
G7	76.3	90.6	36.3	13
G9	36.3	>95	4.7	7.6
G10	13.1	10.1	8.1	17.4
G13	75.3	51.8	6.9	0
G20	89	77.7	89.8	56.7
G21	>95	>95	72.6	29.4
G22	>95	68.2	7.7	0
G23	56.7	93.7	6.0	2.6
G24	88.4	60.8	29.9	11.7
G25	22.5	21.2	23.6	15.9
G27	34.4	>95	10.2	5.8
G28b	94.9	>95	55	13.6
G32	>95	>95	25	10.8
G33	>95	>95	35.3	24.1
G35	80.1	>95	7.8	6.6
G36	80.1	>95	>95	81.4
G37	94.2	51.3	11.7	11.0
G38	17.7	60.7	6.7	5.1
G39	34.1	>95	23.5	20.9
G40	>95	>95	79.9	33.2
G42	59.4	>95	13.1	9.7
G44	>95	>95	52.9	11.7
G45	53.1	15.1	6.9	0
G46	14.9	21.1	14.0	14.8

4、糖工程抗体

实施例 39: 糖工程抗体 Ab-G1 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G1 是化合物 G1 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G1 重链的 HRMS 去卷积实测值为 49893.48 Da。

实施例 40: 糖工程抗体 Ab-G2 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G2 是化合物 G2 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G2 重链的 HRMS 去卷积实测值为 49902.46 Da。

实施例 41: 糖工程抗体 Ab-G7 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G7 是化合物 G7 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G7 重链的 HRMS 去卷积后实测值为 49810.12 Da。

实施例 42: 糖工程抗体 Ab-G9 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G9 是化合物 G9 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G9 重链的 HRMS 去卷积后实测值为 50154.80 Da。

实施例 43: 糖工程抗体 Ab-G10 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G10 是化合物 G10 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G10 重链的 HRMS 去卷积后实测值为 50081.15 Da。

实施例 44: 糖工程抗体 Ab-G13 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G13 是化合物 G13 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G13 重链的 HRMS 去卷积后实测值为 49807.70 Da。

实施例 45: 糖工程抗体 Ab-G27 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G27 是化合物 G27 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G27 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50024.69 Da。

实施例 46: 糖工程抗体 Ab-G4 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G4 是化合物 G4 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G4 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49802.29 Da。

实施例 47: 糖工程抗体 Ab-G4b 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G4b 是化合物 G4b 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G4b 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49789.06 Da。

实施例 48: 糖工程抗体 Ab-G5 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G5 是化合物 G5 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G5 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49818.48 Da。

实施例 49: 糖工程抗体 Ab-G20 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G20 是化合物 G20 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G20 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49836.03 Da。

实施例 50: 糖工程抗体 Ab-G21 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G21 是化合物 G21 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G21 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49835.47 Da。

实施例 51: 糖工程抗体 Ab-G22 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G22 是化合物 G22 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G22 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49835.38 Da。

实施例 52: 糖工程抗体 Ab-G23 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G23 是化合物 G23 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G23 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49835.18 Da。

实施例 53: 糖工程抗体 Ab-G24 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G24 是化合物 G24 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G24 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50064.00 Da。

实施例 54: 糖工程抗体 Ab-G25 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G25 是化合物 G25 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G25 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49893.33 Da。

实施例 55: 糖工程抗体 Ab-G28b 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G28b 是化合物 G28b 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G28b 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50175.80 Da。

实施例 56: 糖工程抗体 Ab-G32 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G32 是化合物 G32 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G32 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49844.75 Da。

实施例 57: 糖工程抗体 Ab-G33 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G33 是化合物 G33 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G33 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50047.05 Da。

实施例 58: 糖工程抗体 Ab-G35 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G35 是化合物 G35 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G35 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49886.09 Da。

实施例 59: 糖工程抗体 Ab-G36 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G36 是化合物 G36 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G36 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49891.14 Da。

实施例 60: 糖工程抗体 Ab-G37 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G37 是化合物 G37 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G37 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49904.60 Da。

实施例 61: 糖工程抗体 Ab-G38 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G38 是化合物 G38 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G38 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50018.20 Da。

实施例 62: 糖工程抗体 Ab-G39 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G39 是化合物 G39 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G39 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50032.24 Da。

实施例 63: 糖工程抗体 Ab-G40 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G40 是化合物 G40 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G40 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49833.19 Da。

实施例 64: 糖工程抗体 Ab-G42 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G42 是化合物 G42 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G42 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50046.26 Da。

实施例 65: 糖工程抗体 Ab-G44 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G44 是化合物 G44 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G44 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50624.49 Da。

实施例 66: 糖工程抗体 Ab-G45 的制备

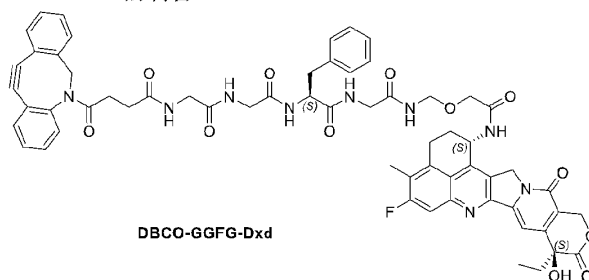
非天然糖工程抗体 Ab-G45 是化合物 G45 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G45 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50405.15 Da。

实施例 67: 糖工程抗体 Ab-G46 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G46 是化合物 G46 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G46 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49865.77 Da。

实施例 68: 糖工程抗体 Ab-G47 的制备

非天然糖工程抗体 Ab-G47 是化合物 G47 和野生型抗体帕妥珠单抗通过通用操作一得到。糖工程抗体 Ab-G47 重链 HRMS 去卷积后实测值为 49866.18 Da。

5、糖定点抗体-药物偶联物的制备**实施例 69: 糖定点 ADC Ab-G1-DXd 的制备**

Ab-G1-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G1 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51021.77 Da。

实施例 70: 糖定点 ADC Ab-G2-DXd 的制备

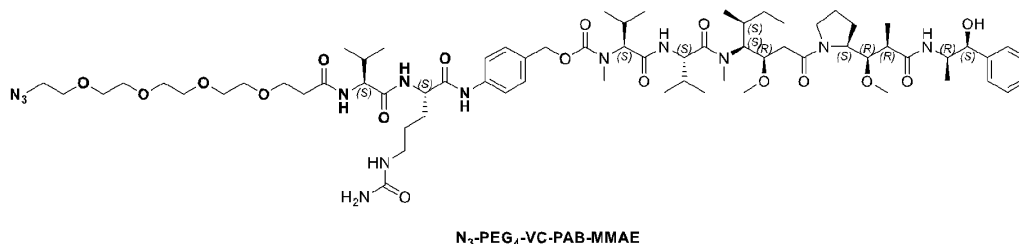
Ab-G2-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G2 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52158.93 Da。

实施例 71: 糖定点 ADC Ab-G7-DXd 的制备

Ab-G7-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G7 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷

积后实测值为 50964.74 Da。

实施例 72: 糖定点 ADC Ab-G9-MMAE 的制备



Ab-G9-MMAE 是化合物 N₃-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G9 通过通用操作三得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51551.58 Da。

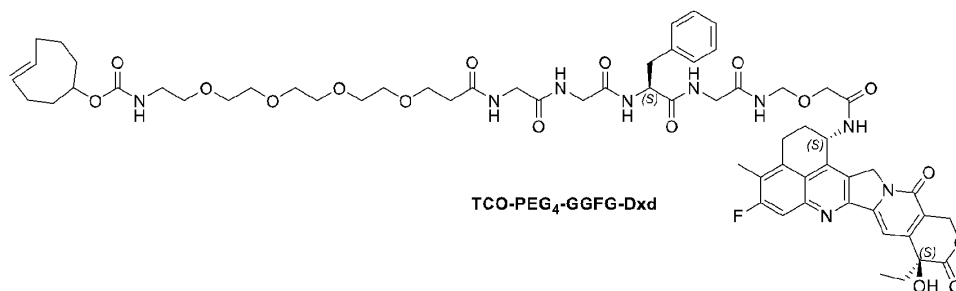
实施例 73: 糖定点 ADC Ab-G10-MMAE 的制备

Ab-G10-MMAE 是化合物 N₃-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G10 通过通用操作三得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51478.22 Da。

实施例 74: 糖定点 ADC Ab-G13-DXd 的制备

Ab-G13-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G13 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50978.76 Da。

实施例 75: 糖定点 ADC Ab-G27-DXd 的制备



Ab-G27-DXd 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G27 通过通用操作四得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51234.41 Da。

实施例 76: 糖定点 ADC Ab-G4b-MMAE 的制备

Ab-G4b-MMAE 是化合物 N₃-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G4b 通过通用操作七得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51185.38 Da。

实施例 77: 糖定点 ADC Ab-G20-DXd 的制备

Ab-G20-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G20 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50963.63 Da。

实施例 78: 糖定点 ADC Ab-G21-DXd 的制备

Ab-G21-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G21 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50963.46 Da。

实施例 79: 糖定点 ADC Ab-G22-DXd 的制备

Ab-G22-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G22 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52117.98 Da。

实施例 80: 糖定点 ADC Ab-G23-DXd 的制备

Ab-G23-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G23 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52116.81 Da。

实施例 81: 糖定点 ADC Ab-G24-DXd 的制备

Ab-G24-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-DXd 和非天然糖工程抗体 Ab-G24 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去

卷积后实测值为 52320.37 Da。

实施例 82: 糖定点 ADC Ab-G25-DXd 的制备

Ab-G25-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G25 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52174.43 Da。

实施例 83: 糖定点 ADC Ab-G28b-DXd 的制备

Ab-G28b-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G28b 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52432.16 Da。

实施例 84: 糖定点 ADC Ab-G32-DXd 的制备

Ab-G32-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G32 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52101.64 Da。

实施例 85: 糖定点 ADC Ab-G33-DXd 的制备

Ab-G33-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G33 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52304.05 Da。

实施例 86: 糖定点 ADC Ab-G35-DXd 的制备

Ab-G35-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G35 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 53271.19 Da。

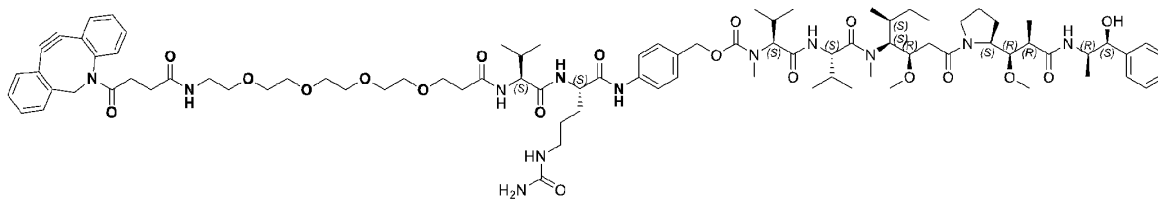
实施例 87: 糖定点 ADC Ab-G36-DXd 的制备

Ab-G36-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G36 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51018.64 Da。

实施例 88: 糖定点 ADC Ab-G37-DXd 的制备

Ab-G37-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G37 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 51032.43 Da。

实施例 89: 糖定点 ADC Ab-G38-DXd-MMAE 的制备:



DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE

Ab-G38-DXd-MMAE 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G38 通过通用操作六得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52887.29 Da。

实施例 90: 糖定点 ADC Ab-G39-DXd-MMAE 的制备

Ab-G39-DXd-MMAE 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G39 通过通用操作六得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52900.70 Da。

实施例 91: 糖定点 ADC Ab-G40-DXd 的制备

Ab-G40-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G40 通过通用操作二得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 50961.38 Da。

实施例 92: 糖定点 ADC Ab-G42-DXd-MMAE 的制备

Ab-G42-DXd-MMAE 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G42 通过通用操作六得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 52914.89 Da。

实施例 93: 糖定点 ADC Ab-G44-DXd-MMAE 的制备

Ab-G44-DXd-MMAE 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-G44 通过通用操作六得到, 重链 HRMS 去卷积后实测值为 53492.60 Da。

实施例 94: 糖定点 ADC Ab-G45-DXd-MMAE 的制备

Ab-G45-DXd-MMAE 是化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 和非天然糖工程抗体 Ab-

G45 通过通用操作六得到，重链 HRMS 去卷积后实测值为 53300.04 Da。

实施例 95: 糖定点 ADC Ab-G46-DXd 的制备

Ab-G46-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G46 通过通用操作二得到，重链 HRMS 去卷积后实测值为 52174.17 Da。

实施例 96: 糖定点 ADC Ab-G47-DXd 的制备

Ab-G47-DXd 是化合物 DBCO-GGFG-Dxd 和非天然糖工程抗体 Ab-G47 通过通用操作二得到，重链 HRMS 去卷积后实测值为 52173.90 Da。

实施例 97: 糖定点 ADC Ab-G40-DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 的制备

Ab-G40-DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 是野生型抗体帕妥珠单抗和载荷-二糖复合物 G40-DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 通过通用操作五得到，重链 HRMS 去卷积后实测值为 51491.63 Da。

6、基于无核心岩藻糖化抗体的糖定点 ADC 的制备

实施例 98: 基于无核心岩藻糖化抗体的糖定点 ADC 的制备

将野生型帕妥珠单抗溶解于 20 mM 磷酸盐，150 mM NaCl，pH 7.4 的缓冲液中，使其浓度为 10 mg/mL，加入终浓度为 0.5 mg/mL 的野生型 Alfc（来自于 *Lactacaseibacillus paracasei*，GENBANK 登录号为 WP_012492118.1）进行水解，37°C 孵育过夜，通过 Protein A 磁珠纯化得到含有一个 N-乙酰葡萄糖胺的去岩藻糖抗体（Ab-defuc）。

制备得到的去岩藻糖抗体、二糖连接子、野生型糖苷内切酶 Endo Se2 或 Endo Si，使各项的浓度依次为 10 mg/mL、1.67 mM（抗体浓度的 25 倍当量）、0.4 mg/mL，调节反应体系 pH 为 7.4，反应温度为 25°C，6 h 后取出 4 μL 样品，加入 36 μL 含 0.1% 的甲酸的 PBS 溶液终止反应，通过 LC-MS 进行分析。重链 HRMS 去卷积实测值见表 3。

去岩藻糖非天然糖工程抗体 Ab-defuc-G7、G20、G21、G23、G33、G35、G40、与化合物 DBCO-GGFG-Dxd 通过通用操作二分别得到相应的 ADC，重链 HRMS 去卷积实测值见表 3。

去岩藻糖非天然糖工程抗体 Ab-defuc-G38、G39、G42、G44、G45 与化合物 TCO-PEG₄-GGFG-Dxd、DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE 通过通用操作六分别得到相应的 ADC，重链 HRMS 去卷积实测值见表 3。

表 3 基于无核心岩藻糖化抗体的糖定点 ADC 的制备

抗体	二糖连接子	糖基转移抗体分子量(Da)	连接子-载荷	糖基定点 ADC 分子量(Da)
Ab-defuc	-	49283.84	-	-
Ab-defuc	G7	49664.23	DBCO-GGFG-Dxd	50818.78
Ab-defuc	G20	49690.03	DBCO-GGFG-Dxd	50817.53
Ab-defuc	G21	49689.14	DBCO-GGFG-Dxd	50817.49
Ab-defuc	G23	49663.11	DBCO-GGFG-Dxd	51969.36
Ab-defuc	G33	49901.12	DBCO-GGFG-Dxd	52157.45
Ab-defuc	G35	49646.46	DBCO-GGFG-Dxd	53124.32
Ab-defuc	G38	49872.52	TCO-PEG ₄ -GGFG-Dxd/ DBCO-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE	52740.79
Ab-defuc	G39	49885.94	TCO-PEG ₄ -GGFG-Dxd/ DBCO-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE	52754.62
Ab-defuc	G40	49687.05	DBCO-GGFG-Dxd	50815.49
Ab-defuc	G42	49900.29	TCO-PEG ₄ -GGFG-Dxd/ DBCO-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE	52768.25
Ab-defuc	G44	50477.69	TCO-PEG ₄ -GGFG-Dxd/ DBCO-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE	53346.16
Ab-defuc	G45	50258.23	TCO-PEG ₄ -GGFG-Dxd/ DBCO-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE	53152.98

结论：本公开的 ADC 制备方法可用于无核心岩藻糖化的 ADC 的制备。

7、糖定点抗体-药物偶联物的药效

实施例 99: HER2 靶向糖定点 ADC 的制备

(1) Tmab-G7、G9、G22、G23、G24、G28b 的合成

野生型抗体曲妥珠单抗（Tmab）、二糖噁唑啉(即化合物 G7、G9、G22、G23、G24、G28b)、野生型糖苷内切酶

Endo Si (针对化合物 G7、G9、G23、G28b) 和 Endo Se2 (针对化合物 G22、G24), 使各项的浓度依次为 10 mg/mL、1.67 mM (抗体浓度的 25 倍当量)、0.6 mg/mL, 调节反应体系 pH 为 7.4, 反应温度为 25°C, 800 rpm, 3 h。通过 protein A 纯化去除小分子化合物及糖苷水解酶得到相应的转糖抗体。

(2) 相应 ADC 的制备

制备得到的转糖抗体 Tmab-G7, DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE, 使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM, 调节反应体系 pH 为 7.4, 25°C 孵育过夜, 经超滤得到所需糖定点偶联 ADC Tmab-G7-MMAE, 通过 LC-MS、HIC、SEC 进行分析。

制备得到的转糖抗体 Tmab-G9, N₃-PEG₄-VC-PAB-MMAE, 使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM, 调节反应体系 pH 为 7.4, 25°C 孵育过夜, 经超滤得到所需糖定点偶联 ADC Tmab-G9-MMAE, 通过 LC-MS、HIC、SEC 进行分析。制备得到的转糖抗体 Tmab-G22、G23、G24、G28b, DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE, 使各项浓度依次为 5 mg/mL、0.33 mM, 调节反应体系 pH 为 7.4, 25°C 孵育过夜后补加 8 当量的 DBCO-PEG₄-VC-PAB-MMAE, 总反应时间为 24 h, 经超滤得到所需糖定点偶联 ADC Tmab-G22/G23/G24/G28b-MMAE, 通过 LC-MS、疏水色谱 (HIC)、分子组排色谱 (SEC) 进行分析。

(3) 检测方法

SEC: 色谱柱: TSKgel G3000SWXL (7.8 mm×30 cm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 0.2 M 磷酸缓冲液, 5-15% 异丙醇, pH 7.0; 流速: 0.5-1 mL/min; 检测波长: 280 nm & 248 nm & 360 nm; 柱温: 室温; 上样量: 30 μg; 洗脱方法: 等度洗脱。

HIC: 色谱柱: TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm×10 cm, 2.5 μm) 色谱柱; 流动相 A: 0.05 M 磷酸缓冲液, 1.2 M 硫酸铵, pH 7.0; 流动相 B: 0.05M 磷酸缓冲液, 20% 异丙醇, pH 7.0; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 280 nm & 248 nm & 360 nm; 柱温: 室温; 上样量: 30 μg; 洗脱方法: 流动相 B 20 分钟时间内从 0% 增加到 100%。

制备的 HER2 靶向糖定点 ADC 质控数据如表 4 所示。

表 4 HER2 靶向糖定点 ADC 质控数据

ADC 名称	靶标	载荷	分子量 (Da)	药物抗体比 (HIC)	SEC (%)
Tmab-G7-MMAE	HER2	MMAE	149926.45	1.95	99.29
Tmab-G9-MMAE	HER2	MMAE	150041.06	2	98.21
Tmab-G22-MMAE	HER2	MMAE	153293.84	3.64	99.61
Tmab-G23-MMAE	HER2	MMAE	153293.86	3.84	99.60
Tmab-G24-MMAE	HER2	MMAE	153699.92	3.71	99.86
Tmab-G28b-MMAE	HER2	MMAE	153922.45	3.7	99.77

实施例 100: HER2 靶向糖定点 ADC 的体外药效

本实验目的是为了检测本公开的 ADC 化合物对 SK-BR-3 (人乳腺癌细胞)、NCI-N87 (人胃癌细胞) 和 MDA-MB-468 (人乳腺癌细胞) 的体外抑制活性。

取对数生长期的肿瘤细胞 SK-BR-3 (来源: 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)、NCI-N87 (来源: 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心) 或 MDA-MB-468 (来源: 中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 按照 2000 细胞/孔的数量加入细胞板中, 将细胞板放于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 12-16 小时。每孔加入 100 μL 样品 (以 50 μg/ml 起始, 5 倍稀释, 9 个浓度), 轻轻摇匀后放入培养箱中孵育。孵育 144 小时后加入 70 μL CellTiter-Glo™ (Promega, 货号: G7572) 工作液, 轻轻摇晃以裂解细胞, 于酶标仪上读板。细胞增殖抑制率计算公式: 细胞增殖抑制率 = (1 - 样品孔/对照孔) × 100%。使用 GraphPad Prism 8.0 软件, 以样品浓度的 Log 值为横坐标, 以 Cytotoxicity% 为纵坐标作图, 并对数据进行 Nonlinear regression (curve fit) 分析, 获得各供试品的 IC₅₀ 值。具体结果见表 5。

表 5 本公开 ADC 化合物的体外抗肿瘤活性检测

ADC 化合物	SK-BR-3 (HER2+++)		NCI-N87 (HER2+++)		MDA-MB-468 (HER2-)	
	IC ₅₀ (μg/mL)	Max inhibition(%)	IC ₅₀ (μg/mL)	Max inhibition(%)	IC ₅₀ (μg/mL)	Max inhibition(%)
Tmab-G7-MMAE	0.004	92	0.005	81	44	60

WO 2025/148977			PCT/CN2025/071513			
Tmab-G9-MMAE	0.003	92	0.003	80	34	76
Tmab-G22-MMAE	0.002	92	0.003	82	35	77
Tmab-G23-MMAE	0.001	92	0.002	84	31	81
Tmab-G24-MMAE	0.001	92	0.002	82	19	84
Tmab-G28b-MMAE	0.002	92	0.003	81	15	86

结论:本公开的 ADC 药物对 HER2 阳性细胞 SK-BR-3 和 NCI-N87 具有明显的增殖抑制活性;同时它们对 HER2 阴性细胞 MDA-MB-468 增殖抑制活性弱, 展现出良好的选择性。

实施例 101: HER2 靶向糖定点 ADC 的体内药效

以 BALB/c Nude 小鼠(购自北京维通利华)为受试动物, 评价抗 HER2-ADC 尾静脉注射给药后, 对人胃癌细胞 NCI-N87 移植瘤裸小鼠的疗效。

小鼠右侧腋窝皮下接种 NCI-N87 细胞(来源: ATCC)(5×10^6 /只, 具有 50%Matrigel), 肿瘤生长 7 天, 长至平均肿瘤体积为 150 mm^3 左右时按照动物肿瘤体积随机分组(D7), 7 只/组。

采用尾静脉注射单次给药, 每周测量 2 次瘤体积和体重, 记录数据。抑瘤率 $\text{TGI}(\%) = [1 - (\text{T}_{28} - \text{T}_7) / (\text{V}_{28} - \text{V}_7)] \times 100$, T_{28} 和 T_7 分别为实验组在接种后第 28 天和第 7 天的肿瘤体积, V_{28} 和 V_7 分别为空白对照组(Vehicle, PBS)在接种后第 28 天和第 7 天的肿瘤体积。接种后第 28 天时结束实验时的具体实验结果见表 6 和图 4-5。

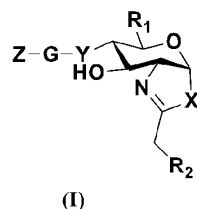
表 6 本公开 ADC 化合物的体内药效评价

ADC 化合物	给药剂量	抑瘤率
Tmab-G7-MMAE	4 mpk	68.6%
Tmab-G9-MMAE	4 mpk	62.4%
Tmab-G22-MMAE	2 mpk	85.3%
Tmab-G23-MMAE	2 mpk	82.2%
Tmab-G24-MMAE	2 mpk	74.1%
Tmab-G28b-MMAE	2 mpk	68.0%
Tmab-G7-MMAE	8 mpk	106.5%
Tmab-G9-MMAE	8 mpk	90.6%
Tmab-G22-MMAE	4 mpk	115.6%
Tmab-G23-MMAE	4 mpk	111.5%
Tmab-G24-MMAE	4 mpk	110.8%
Tmab-G28b-MMAE	4 mpk	96.4%

结论: 本公开的 ADC 药物对 HER2 高表达的 NCI-N87 移植瘤表现出优异的抗肿瘤活性。

权利要求书

1. 一种如式(I)表示的二糖连接子:

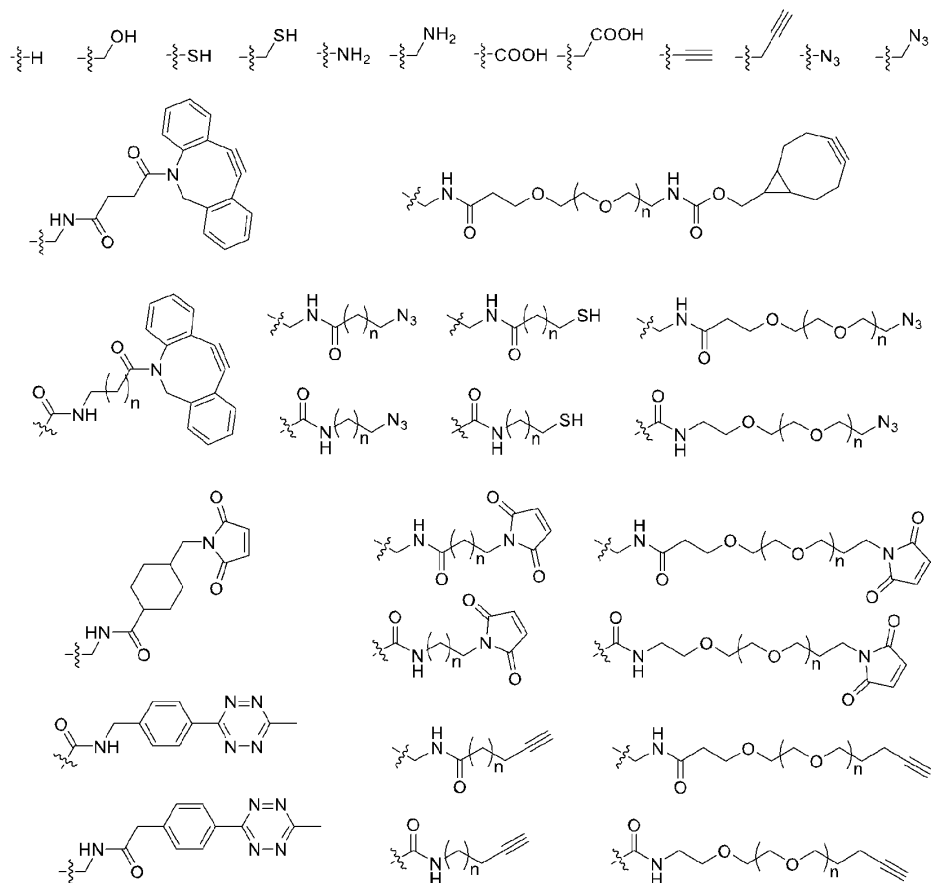


其中,

X 选自氧原子或硫原子;

Y 选自氧原子或硫原子;

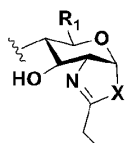
R₁选自以下基团:



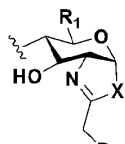
其中, n选自0-30的整数, 或者0-20的整数, 或者0-10的整数;

R₂ 选自以下基团: 氢、-N₃、C₁-C₆ 烷基-N₃、-C≡CH、C₁-C₆ 烷基-C≡CH、-SH、C₁-C₆ 烷基-SH 和 C₁-C₆ 烷基;

G 环代表衍生自单糖分子的结构, 其可以通过硫醚键或糖苷键与另外的单糖连接, 其中所述单糖分子选自半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰甘露糖胺、甘露糖、岩藻糖和唾液酸糖; 当 Y 为硫原子时,



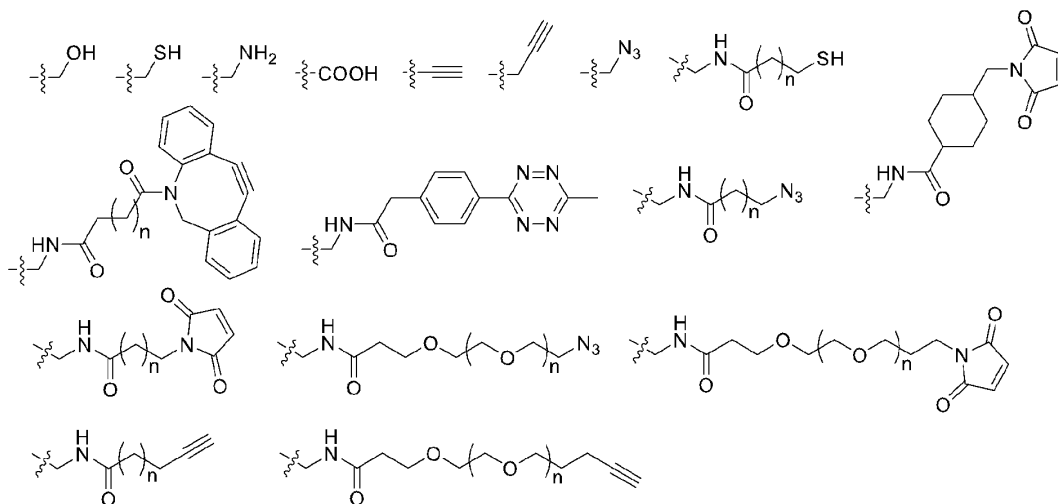
G 环通过硫醚键与 R_2 连接, 所述硫醚键为 1,4-硫醚键, 2,4-硫醚键或 3,4-硫醚键; 当 Y 为氧原子时, G 环



通过糖苷键与 R_2 连接, 所述糖苷键为 1,4-糖苷键, 2,4-糖苷键或 3,4-糖苷键;

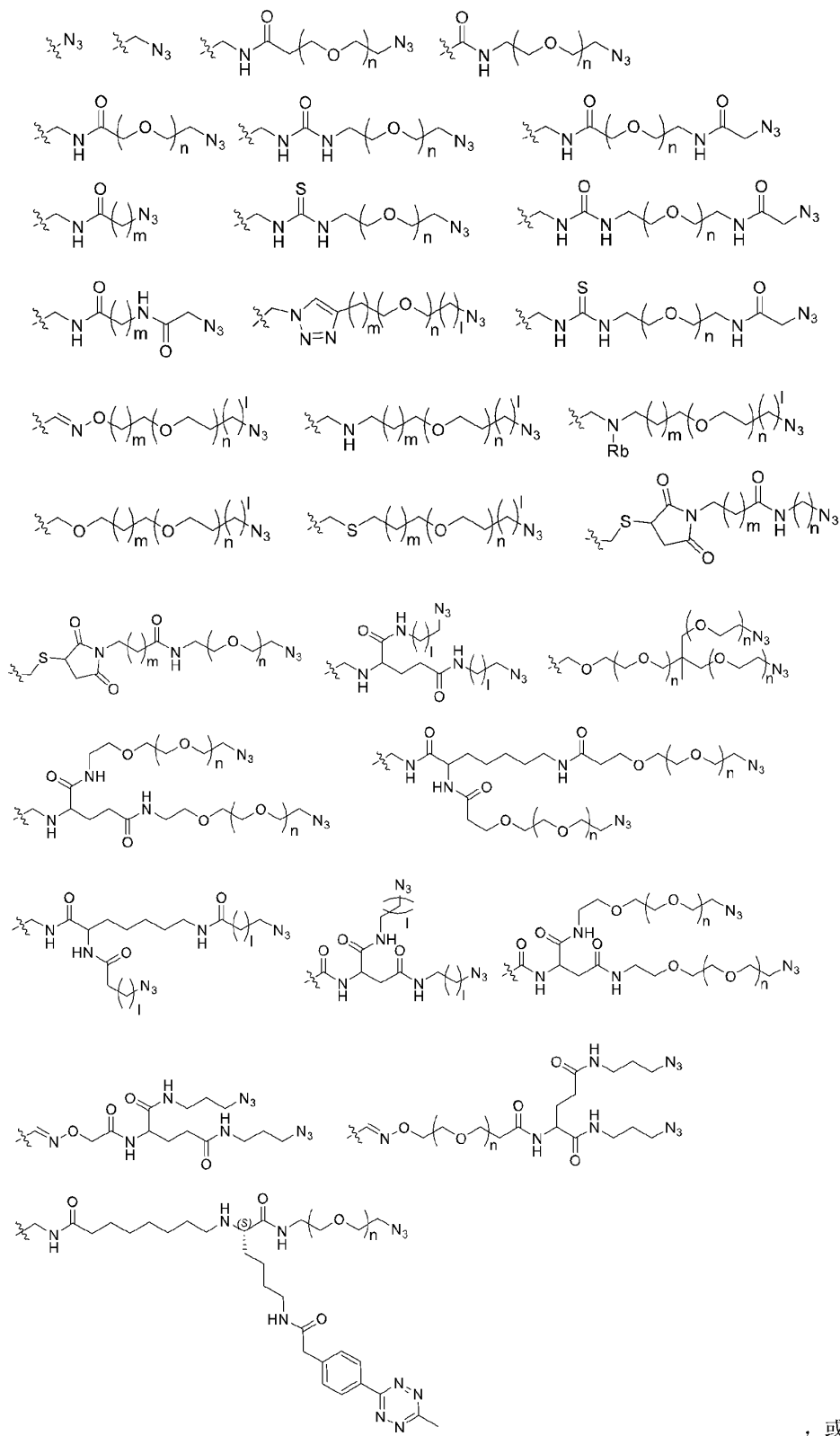
Z 选自氢、含叠氮残基的反应性基团、含环炔残基的反应性基团、含四嗪残基的反应性基团、含链炔残基的反应性基团、含环烯残基的反应性基团、或者含马来酰亚胺残基的反应基团。

2. 根据权利要求1所述的二糖连接子,其中所述糖苷键为1,4-糖苷键,或者所述硫醚键为1,4-硫醚键。
3. 根据权利要求1-2中任一项所述的二糖连接子,其中所述单糖分子选自半乳糖、葡萄糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺和N-乙酰甘露糖胺。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的二糖连接子,其中所述R₁选自如下结构:



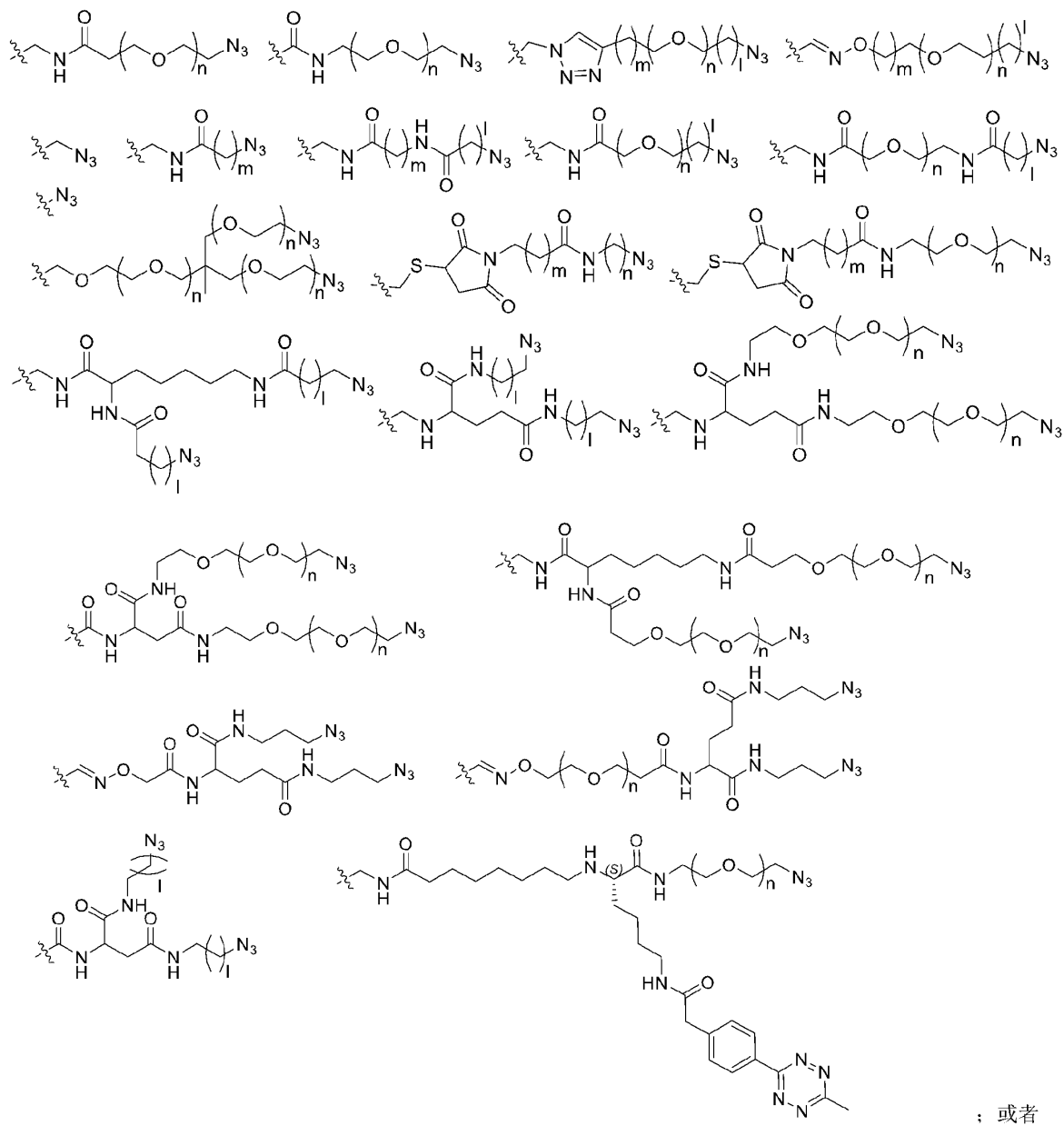
其中n选自0-30的整数, 或者0-20的整数、或者0-10的整数。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的二糖连接子, 其中 R_2 选自以下基团: 氢、 $-N_3$ 、 $-CH_2-N_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N_3$ 、 $-C\equiv CH$ 、 $-CH_2-C\equiv CH$ 、 $-CH_2-CH_2-C\equiv CH$ 、 $-SH$ 、 $-CH_2-SH$ 、 $-CH_2-CH_2-SH$ 、 C_1-C_6 烷基; 或者, R_2 选自氢、 $-N_3$ 、 $-CH_2-N_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N_3$ 、 $-C\equiv CH$ 、 $-SH$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-CH_3$ 。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的二糖连接子, 其中 Z 为含叠氮残基的反应性基团, 其选自以下基团:

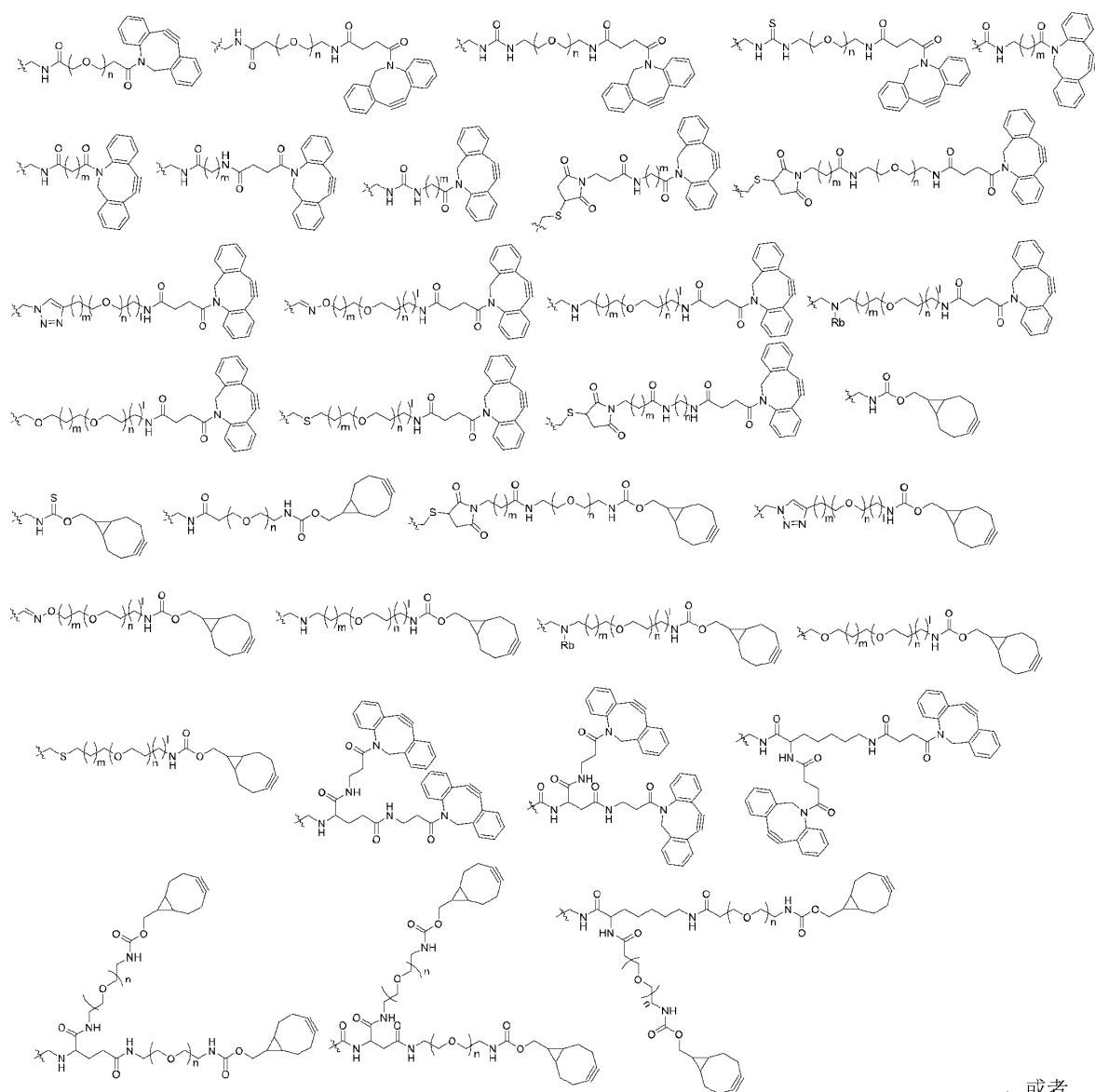


, 或者

所述含叠氮残基的反应性基团选自以下基团：

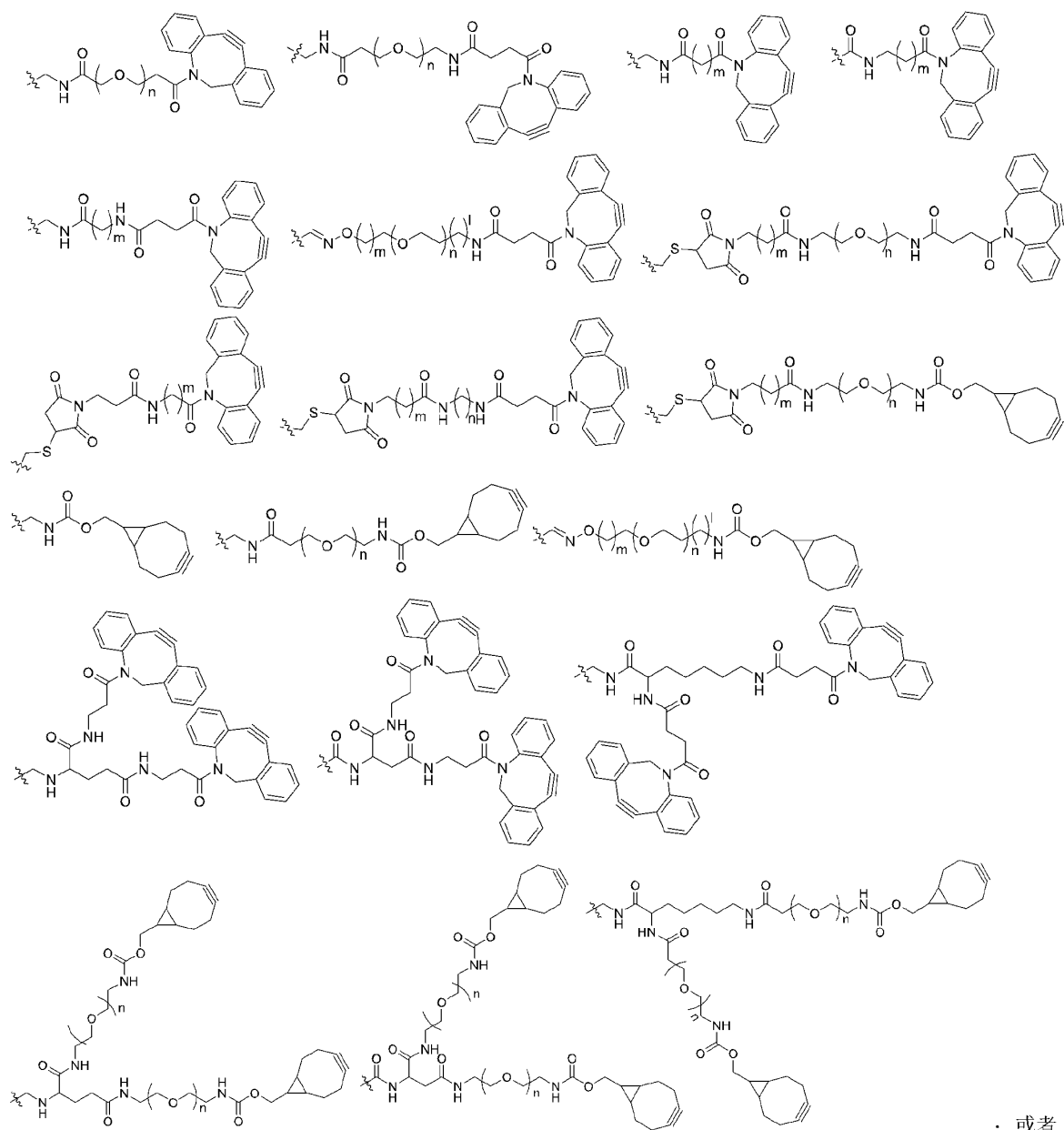


Z为含环炔残基的反应性基团，其选自以下基团：

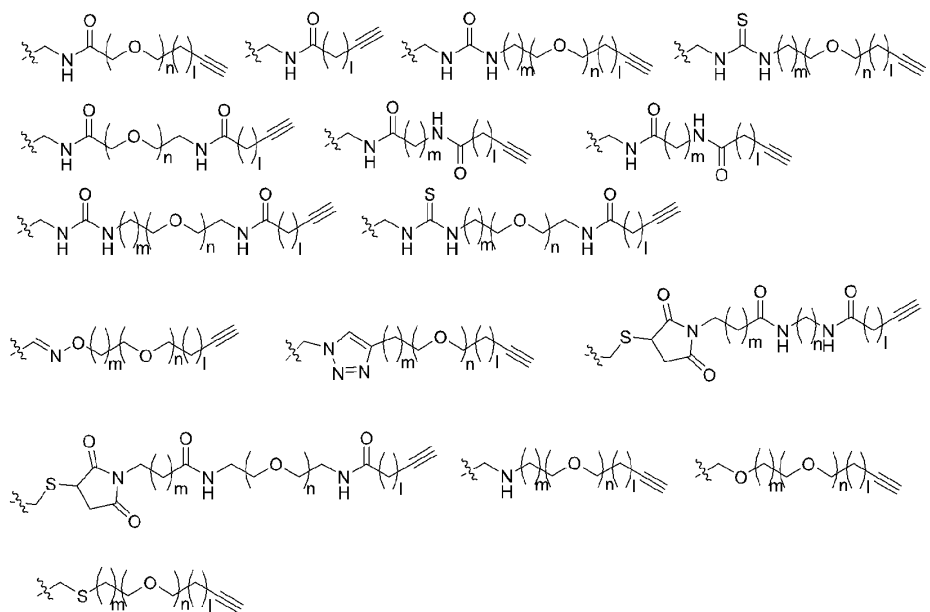


，或者

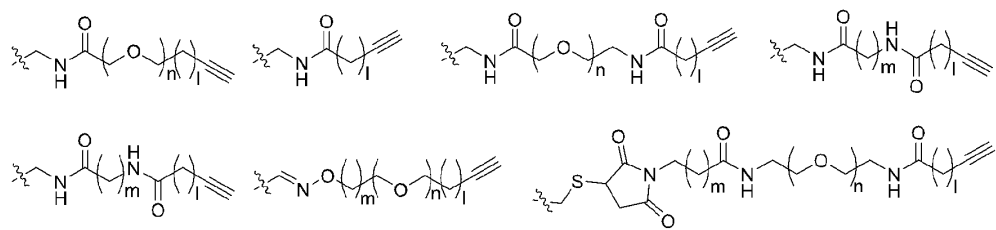
所述含环炔残基的反应性基团选自以下基团：



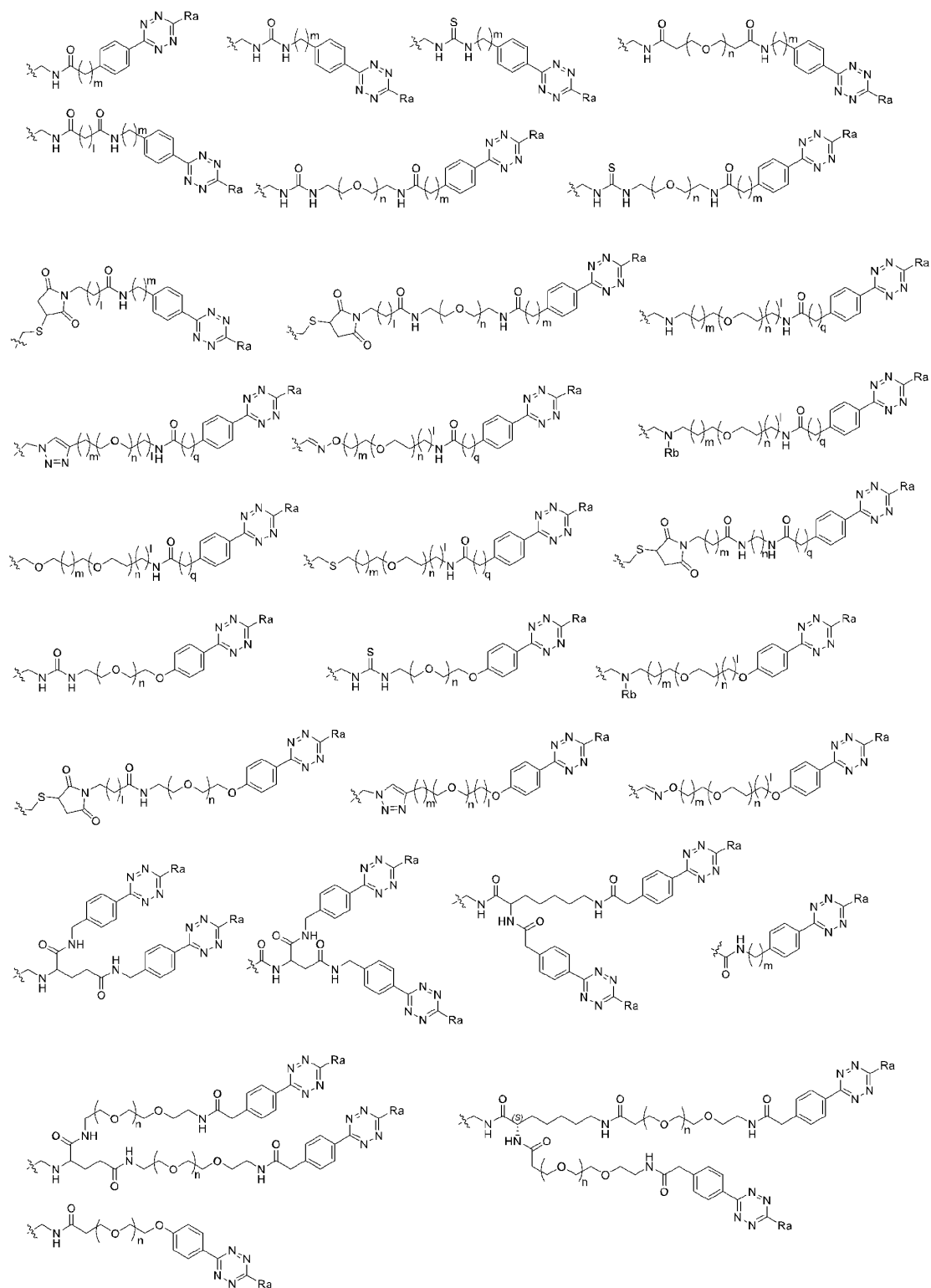
Z为含链炔残基的反应性基团，其选自以下基团：



所述含链炔残基的反应性基团选自以下基团:

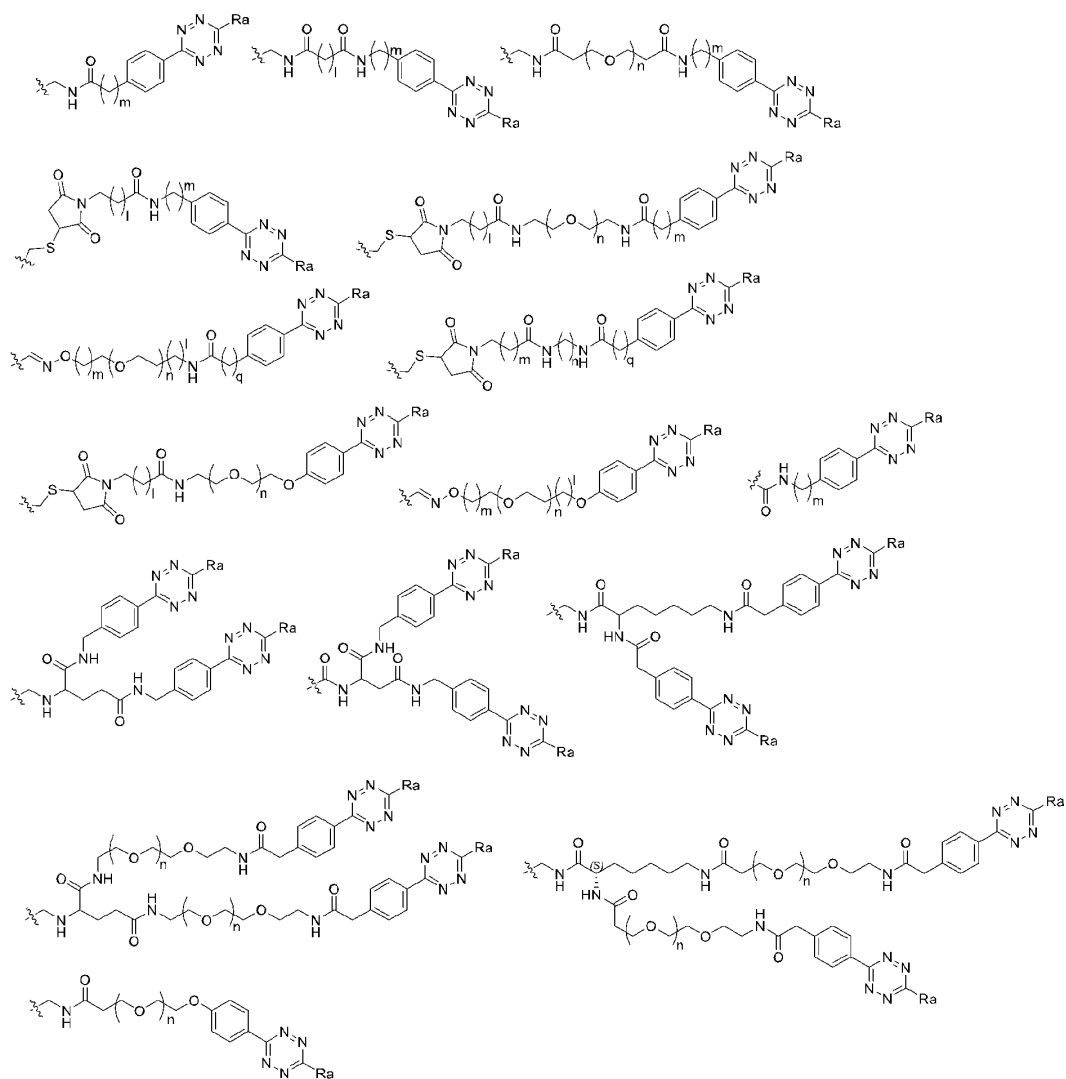


Z为含四嗪残基的反应性基团, 其选自以下基团:



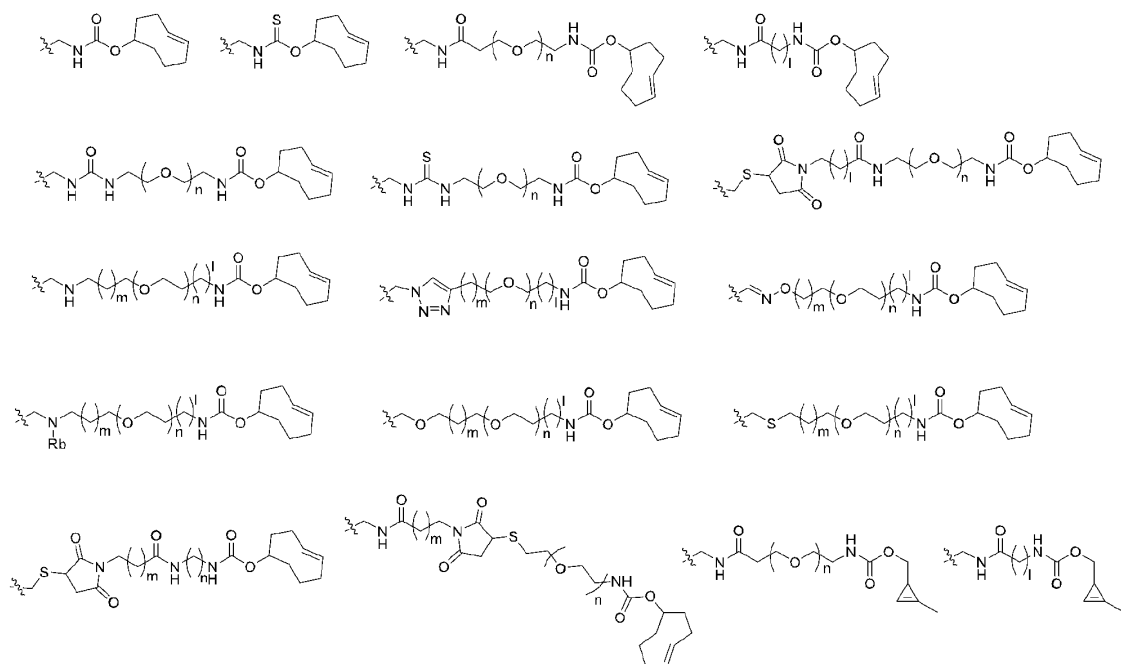
, 或者

所述含四嗪残基的反应性基团选自如下结构：



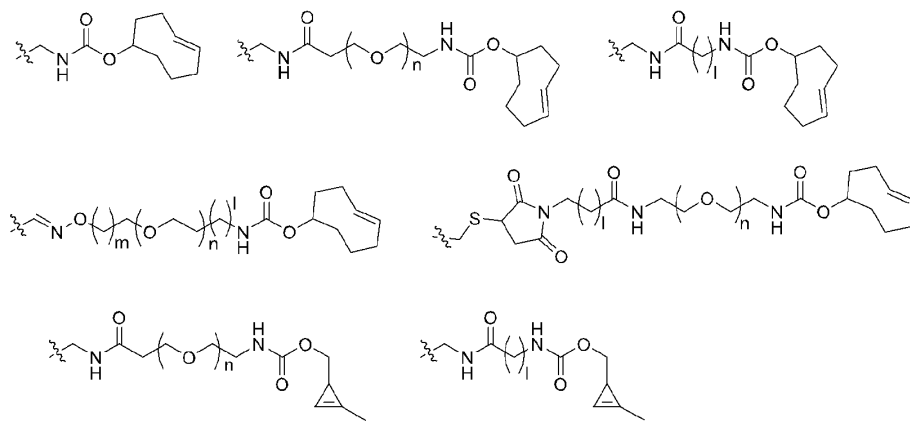
；或者

Z 为含环烯残基的反应性基团，其选自以下基团：



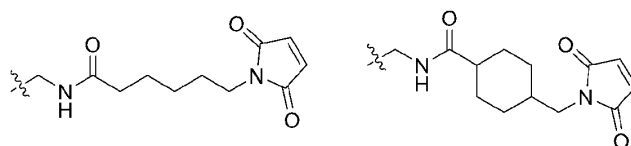
或者

所述含环烯残基的反应性基团选自如下结构：



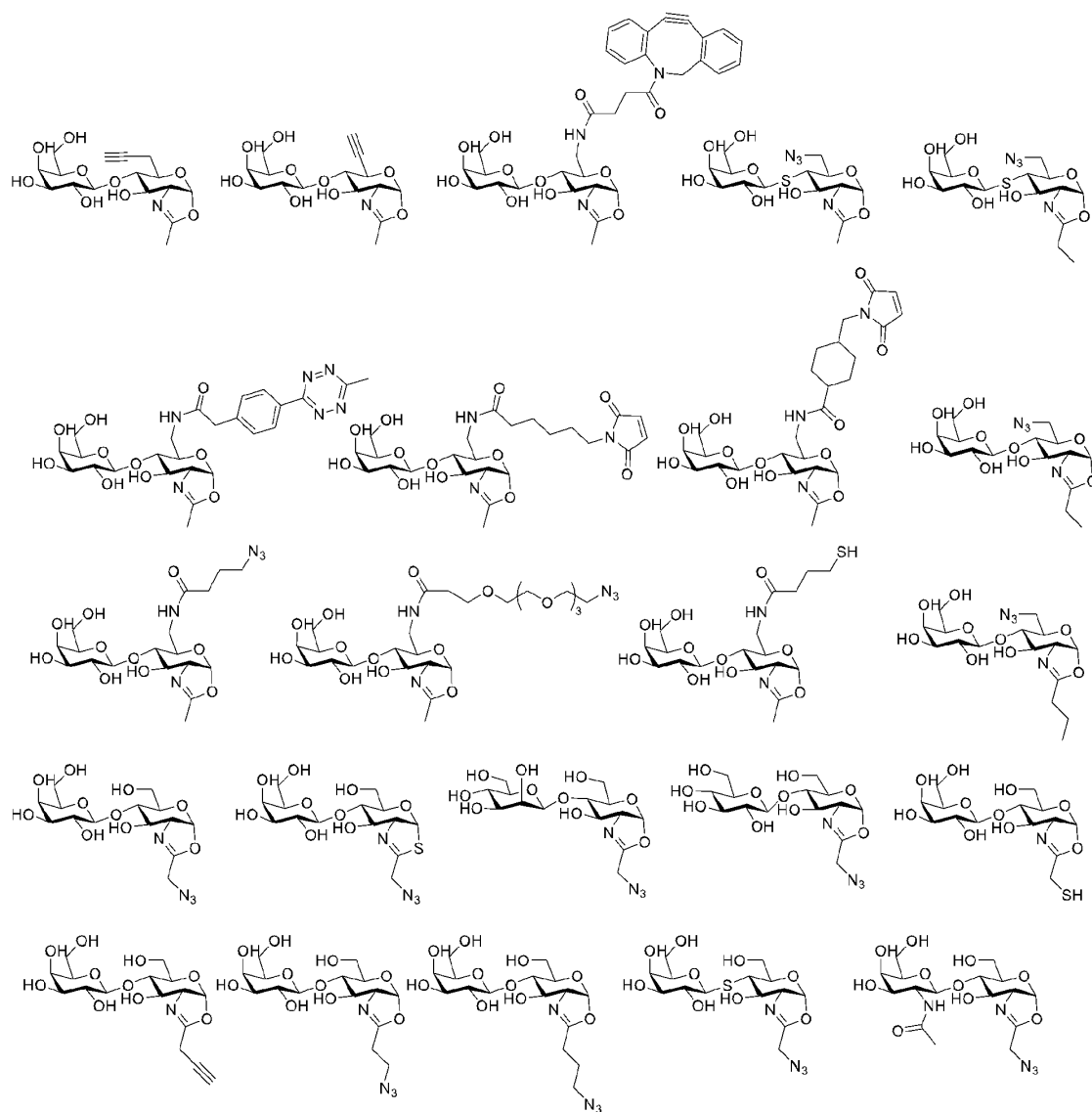
或者

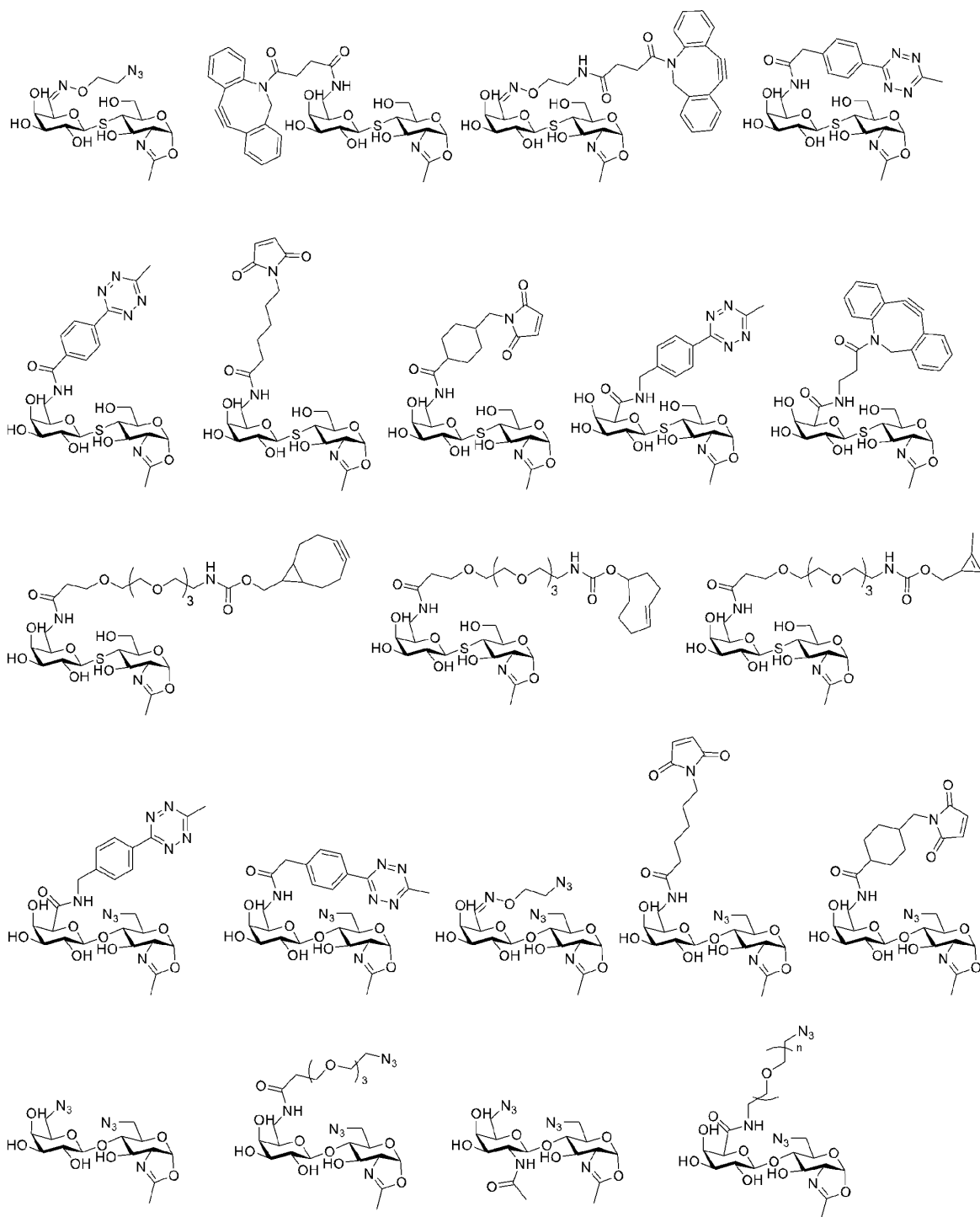
Z为含马来酰亚胺残基的反应性基团，其选自如下基团：

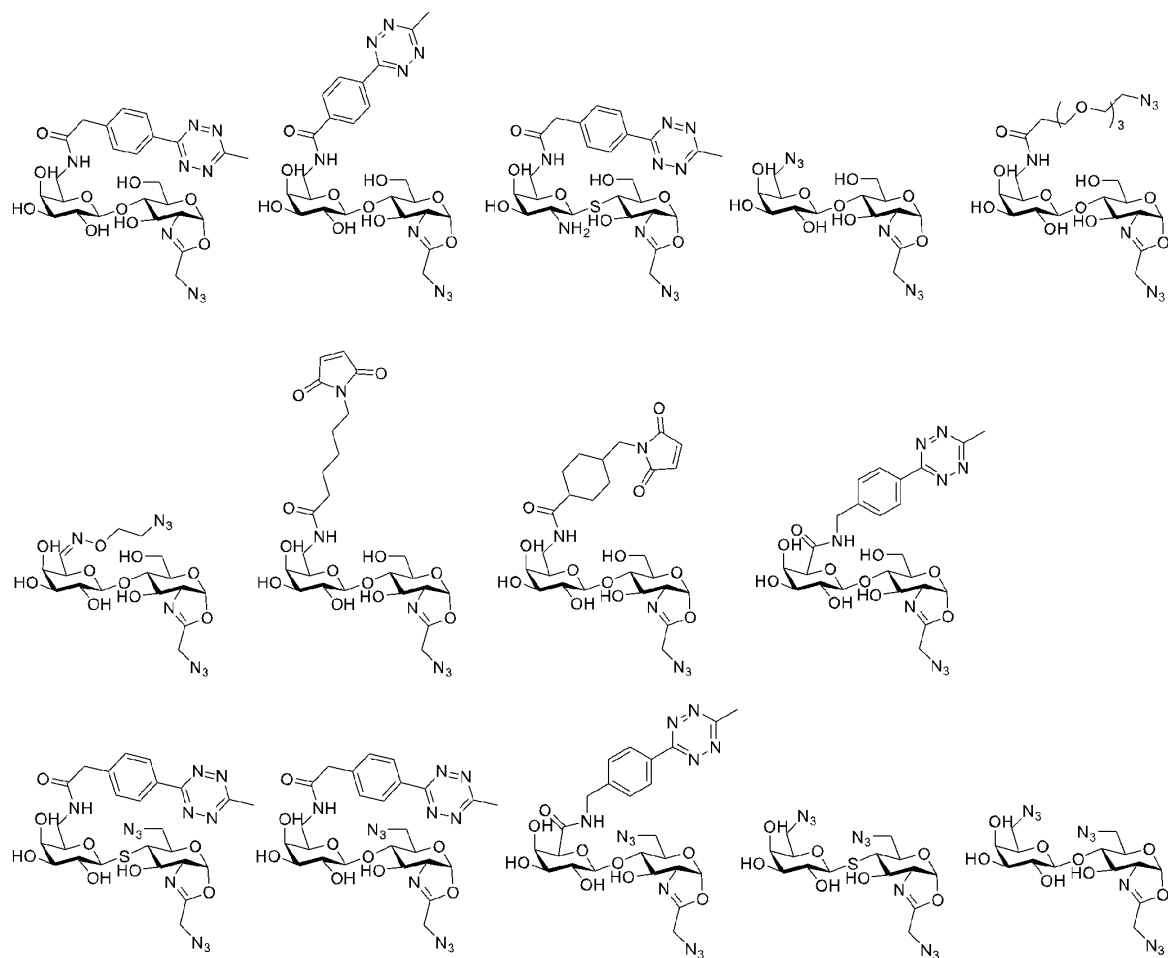


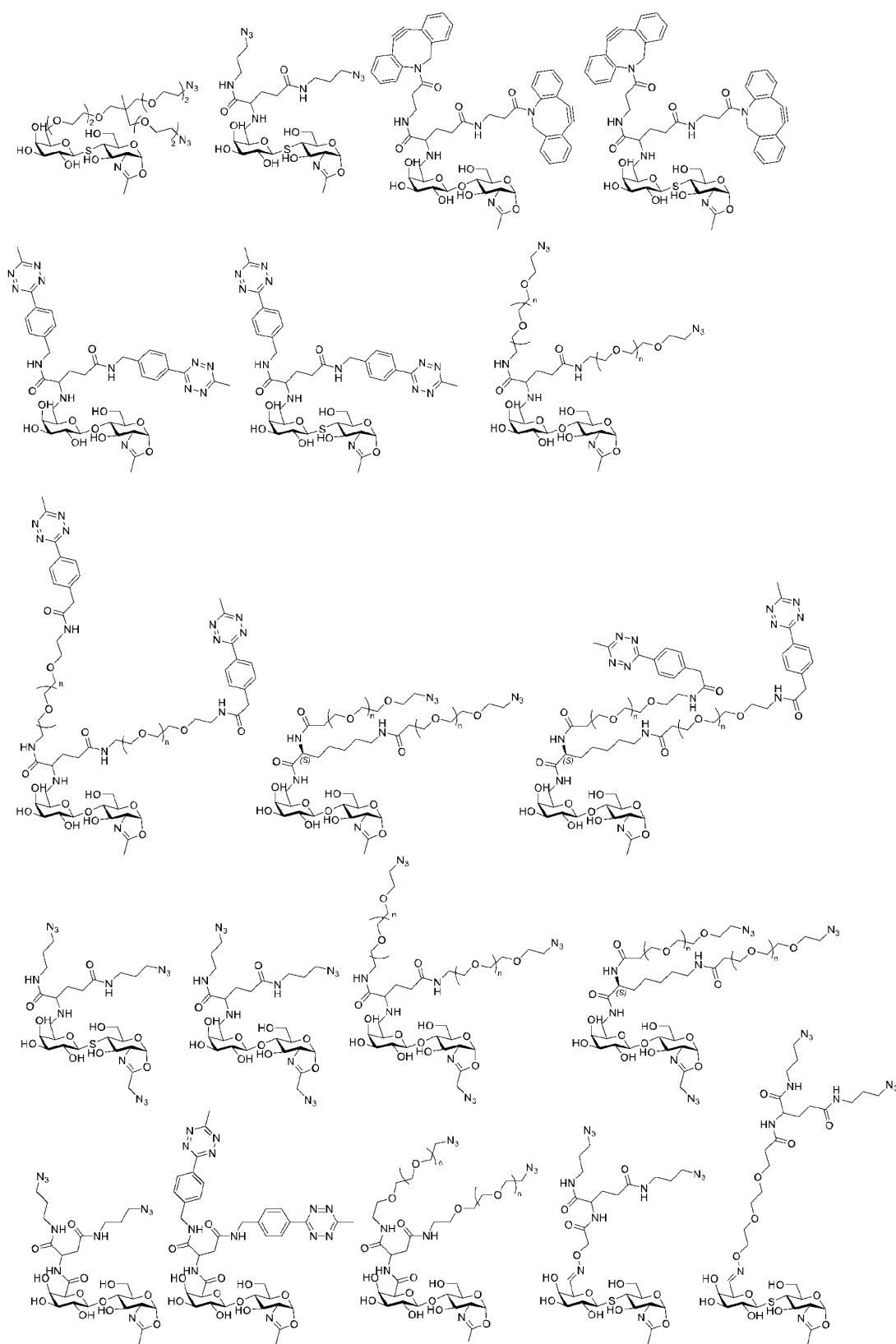
其中，各个n、各个m、各个I和各个q分别独立选自0-30的整数，或0-20的整数，或0-10的整数；各个Ra为氢或C₁-C₆烷基；Rb为氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基、C₅-C₁₀杂芳基。

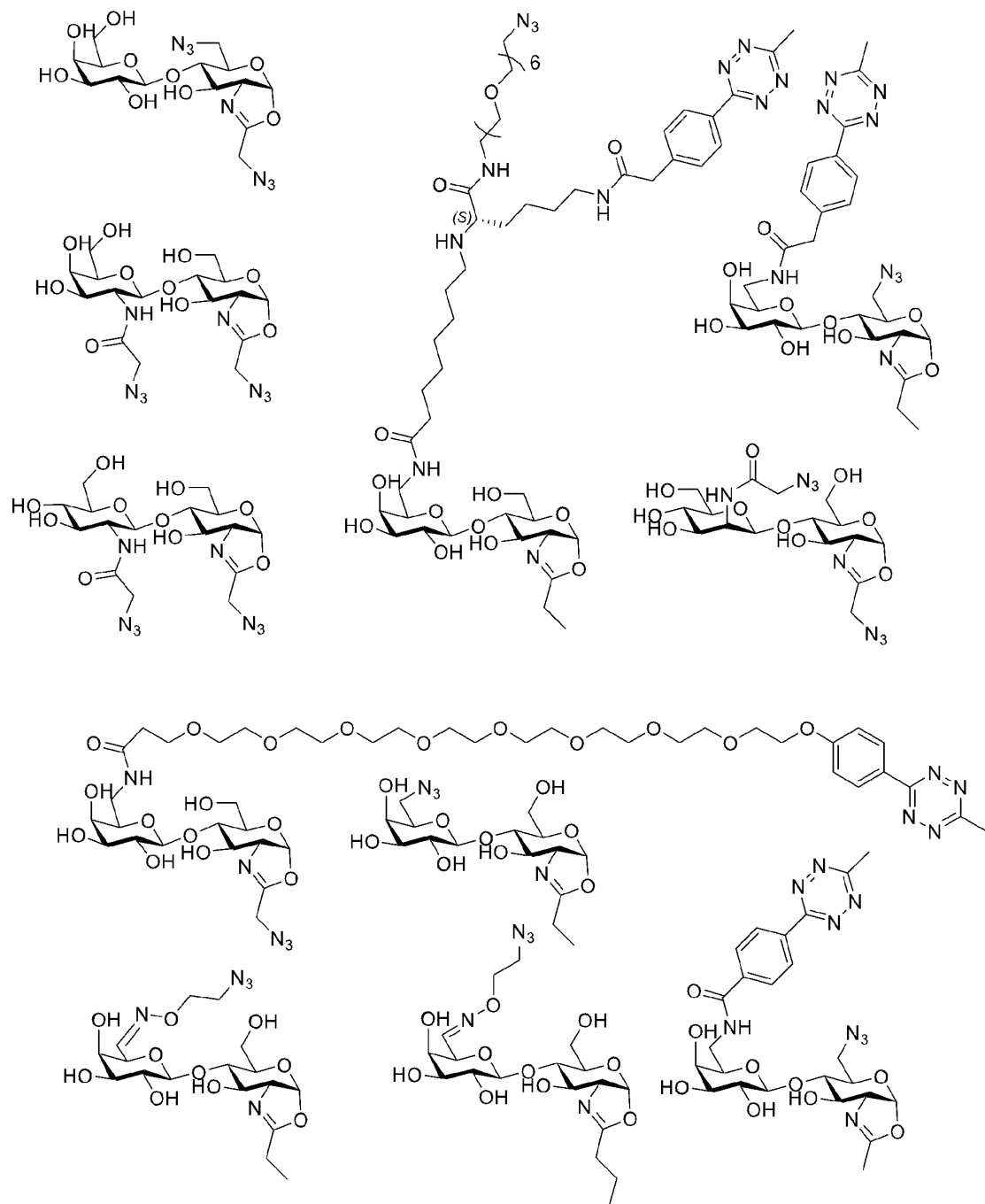
7. 根据权利要求1所述的二糖连接子，其选自以下具体化合物：





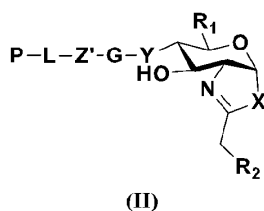






其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

8. 式(II)表示的二糖偶联物:



其中,

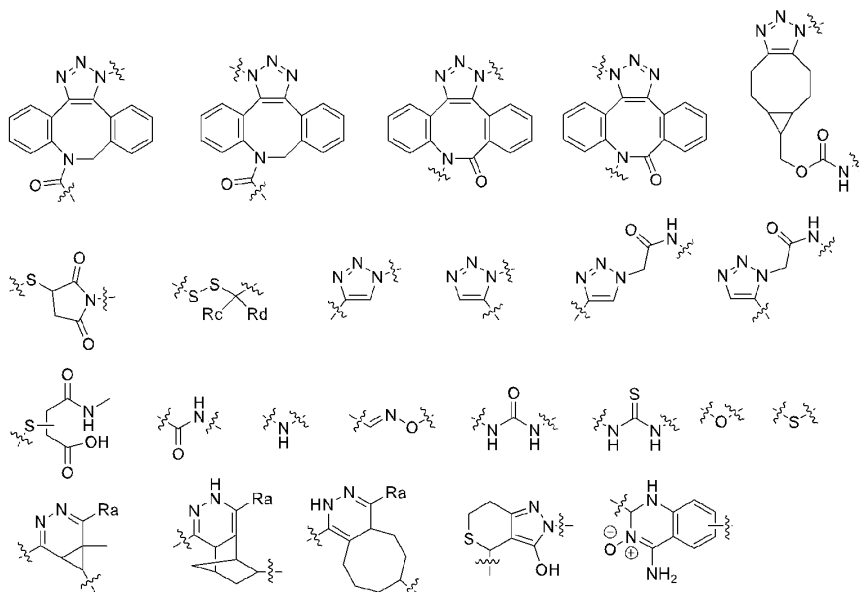
X、Y、R₁、R₂和G环如权利要求1-6中任一项所定义;

P-L-Z'-表示G环上的取代基, P-L-Z'-的取代位置是除了衍生自单糖分子的G环的一号位以外的任何位置;

L为连接Z'与P的二价连接子或多价连接子, 其选自可裂解连接子、不可裂解连接子或它们的组合;

P选自细胞毒素、小分子药物、近红外或荧光探针、多肽、RNA及相关药物、放射性同位素标记、造影剂及核磁共振成像剂; 所述小分子药物例如为美登素、DM-1、DM-4、MMAE、MMAF、Auristatin 0101、SN-38、Dxd、依喜替康、多卡霉素、鹅膏蕈碱、PBD类、VP-16、喜树碱、紫杉醇、多烯紫杉醇、蒽环类或它们的衍生物, 或者所述小分子药物例如为放射性治疗物;

Z'为连接L和G环的连接片段, 其独立地为不存在, 或选自自由-(CH₂)_p-、-(CH₂-CH₂-O)_p-、-(苯基)_p-和以下基团组成的群组中的一种或者两种或更多种的任意组合:

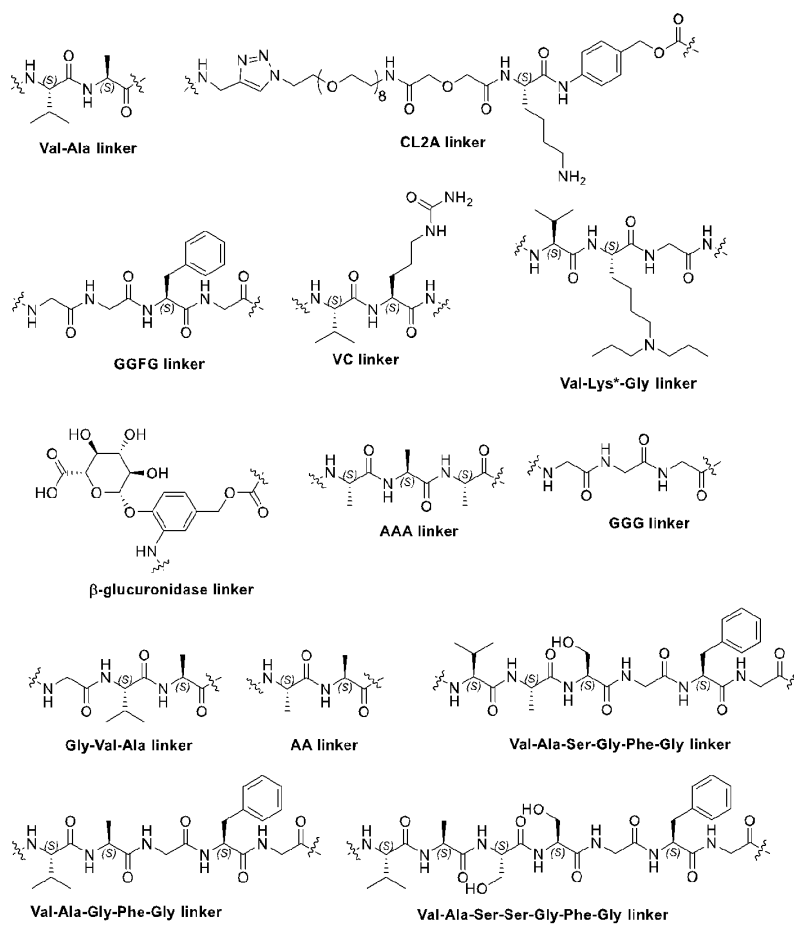


其中, Ra、Rc和Rd分别独立选自氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₀芳基和C₅-C₁₀杂芳基; 以及各个p为1至5的整数。

9. 根据权利要求8所述的二糖偶联物, 所述L选自或包含以下一个或多个的组合: Val、Cit、Phe、Lys、D-Val、Leu、Gly、Ala、Asn、Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Lys(Ac)、Phe-Lys、Phe-Lys(Ac)、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn、Ala-Ala-Ala、Val-Lys-Ala、Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; 或者,

所述L选自或包含以下一个或多个的组合: Val-Cit、Val-Ala、Ala-Ala和Gly-Gly-Phe-Gly; 或者

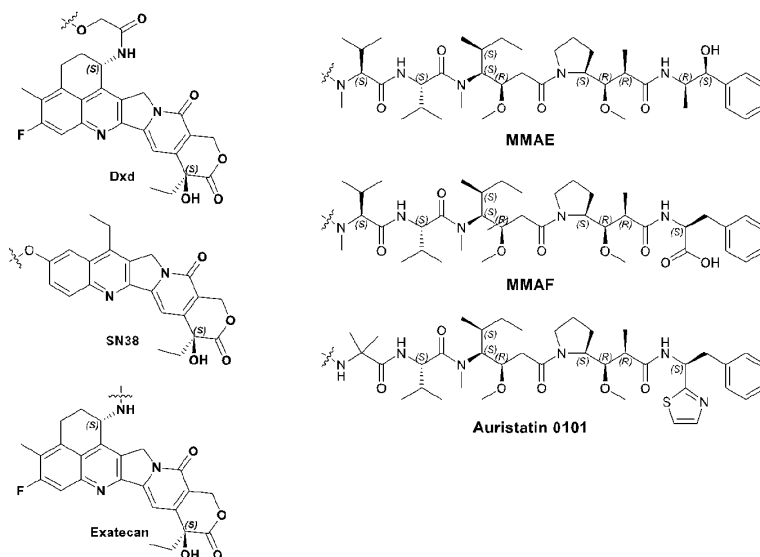
所述L选自或包含如下可裂解连接子中的一个或多个的组合:



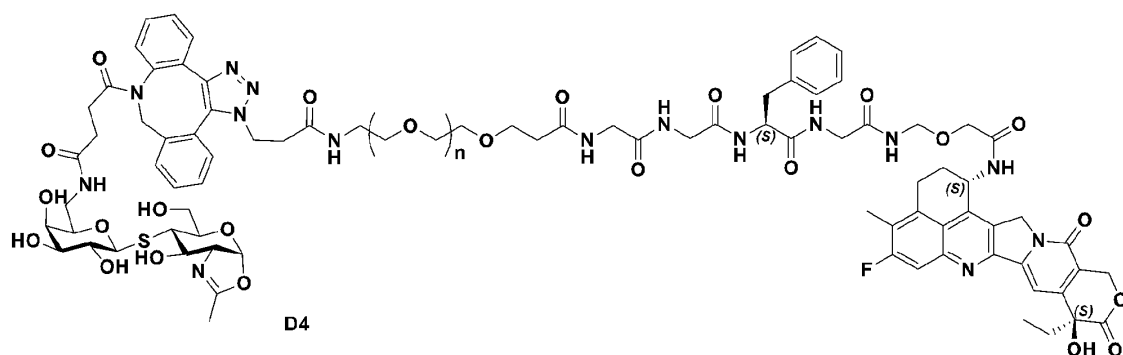
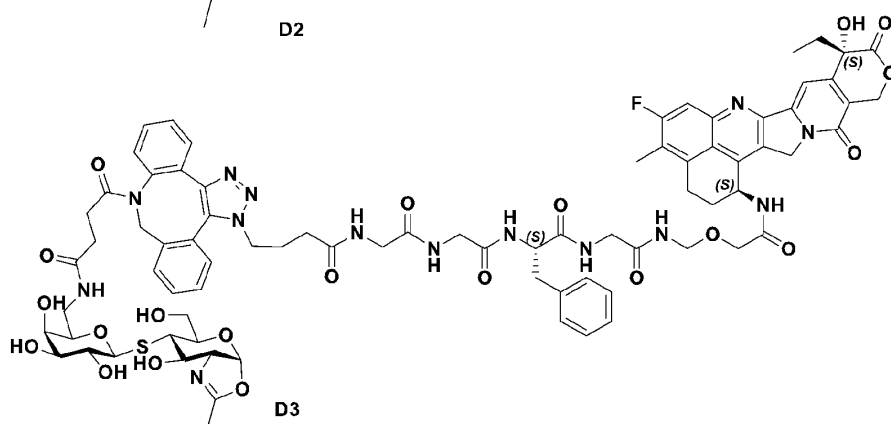
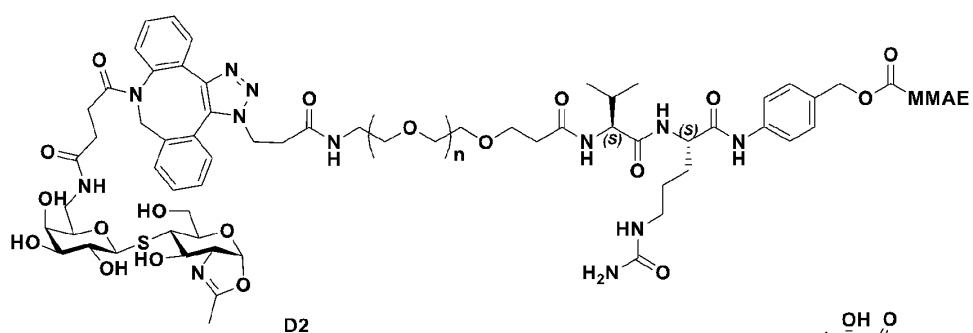
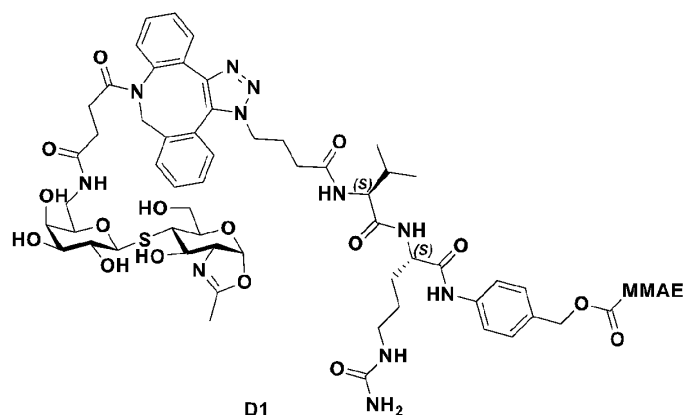
; 或者

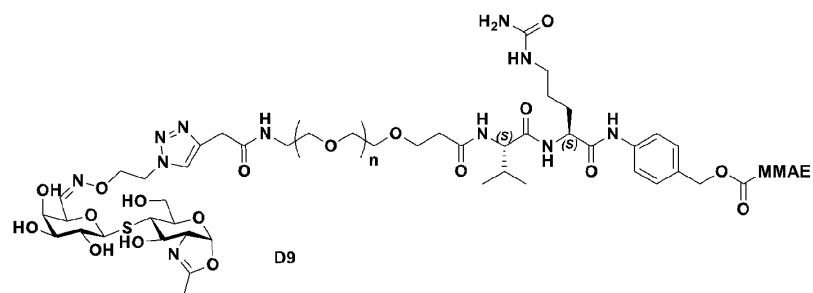
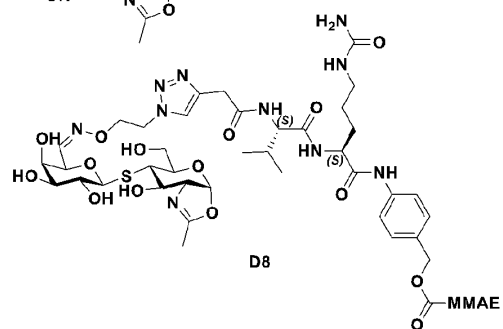
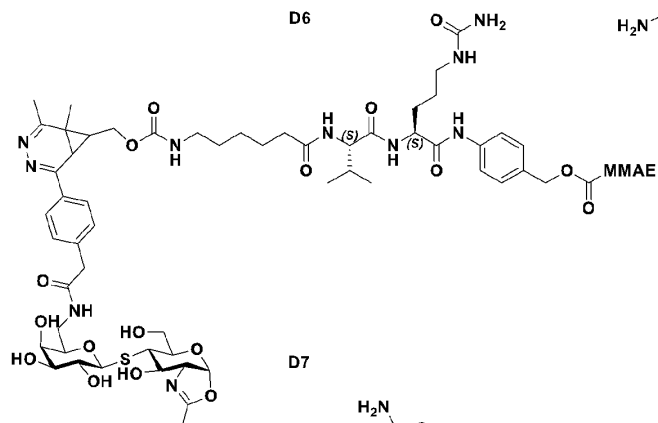
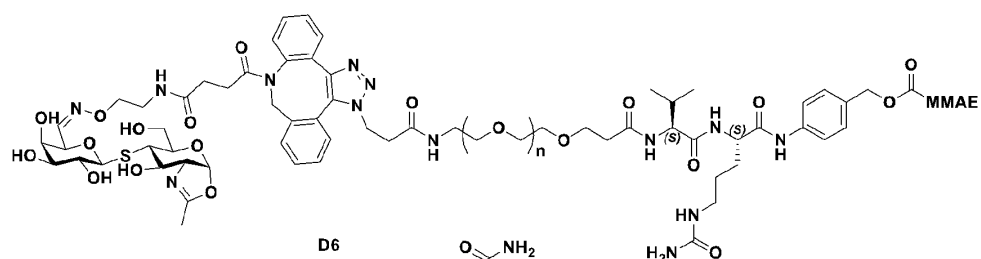
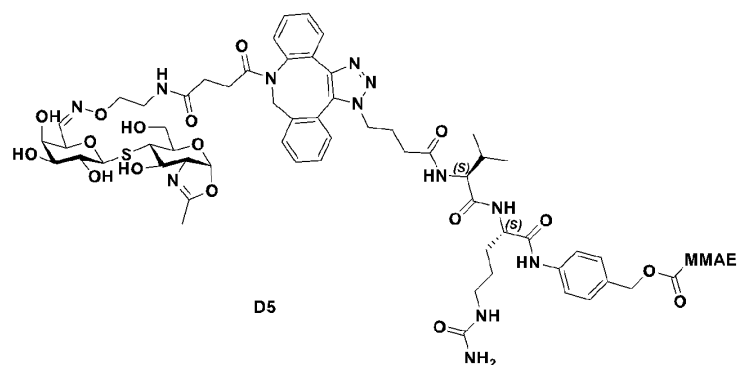
所述 L 选自或包含以下一个或多个不可裂解连接子的组合: $-(CH_2)_m-$ 、 $-(CH_2-CH_2-O)_m-$ 、 $-(PO_4)_n-$, 其中各个 m 和各个 n 分别独立地选自 0-30 的整数, 或 0-20 的整数, 或 0-10 的整数。

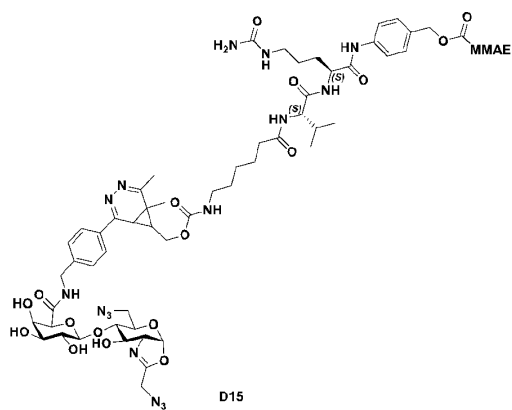
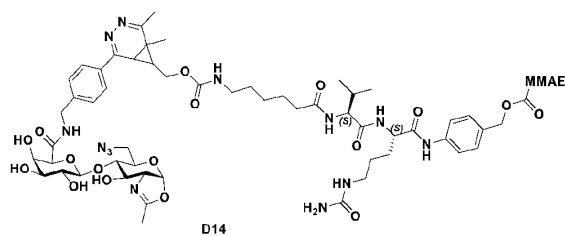
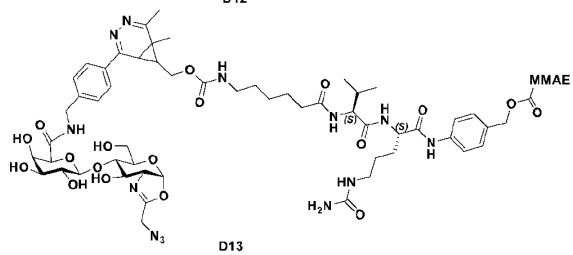
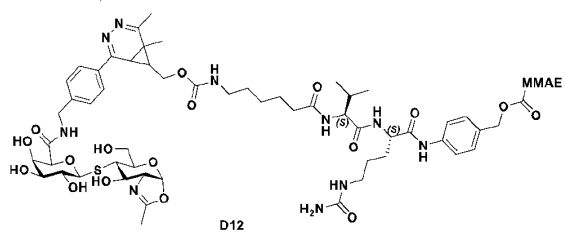
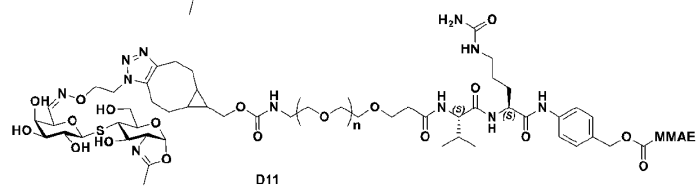
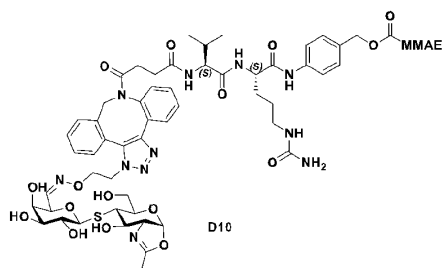
10. 根据权利要求 8-9 中任一项所述的二糖偶联物, 其中 P 为细胞毒素, 其选自以下基团:

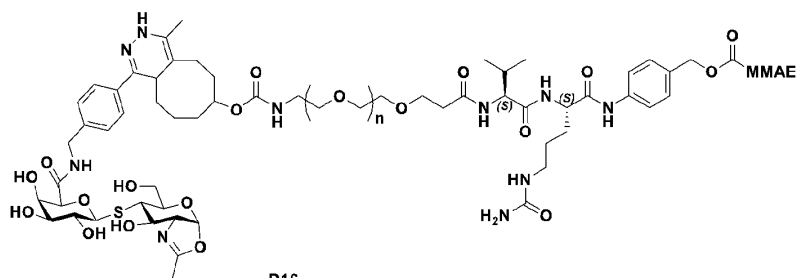


11. 根据权利要求 8 所述的二糖偶联物，其选自以下具体化合物：

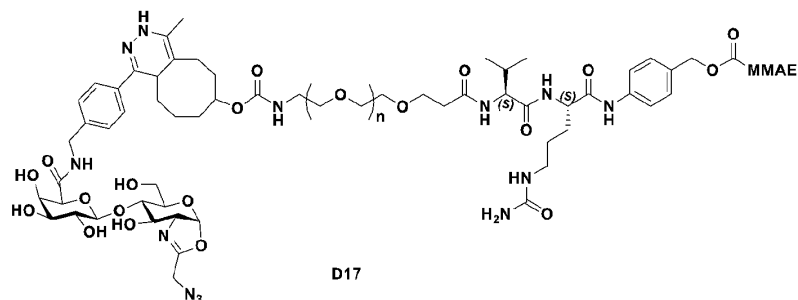




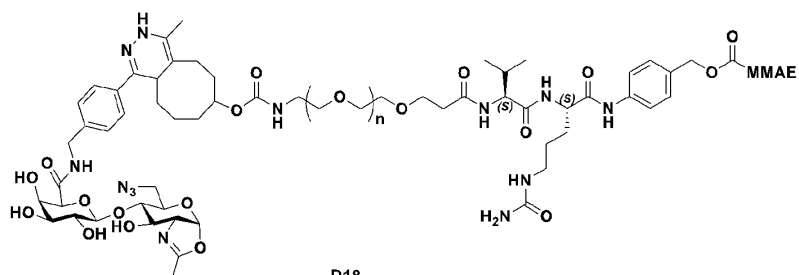




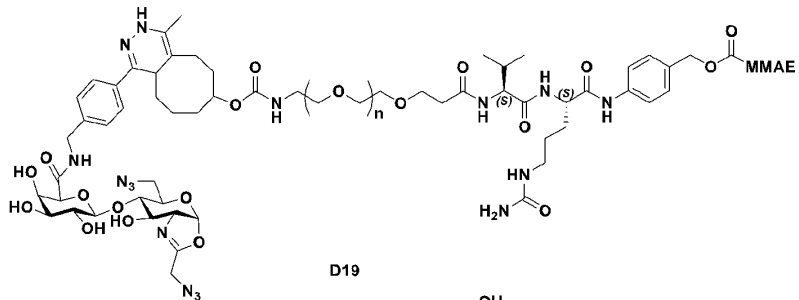
D16



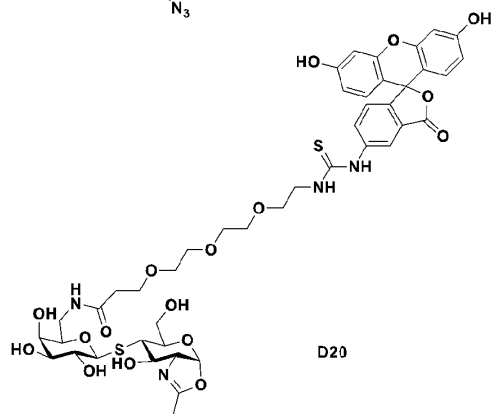
D17



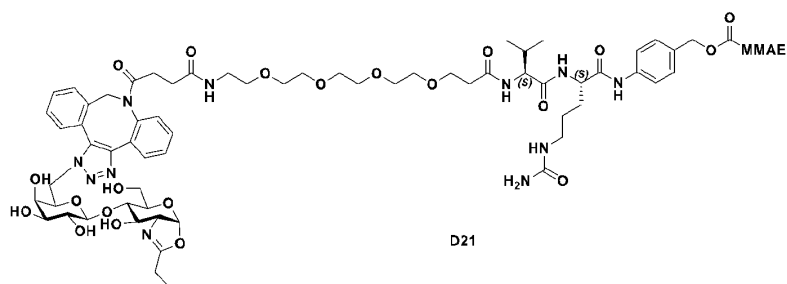
D18



D19

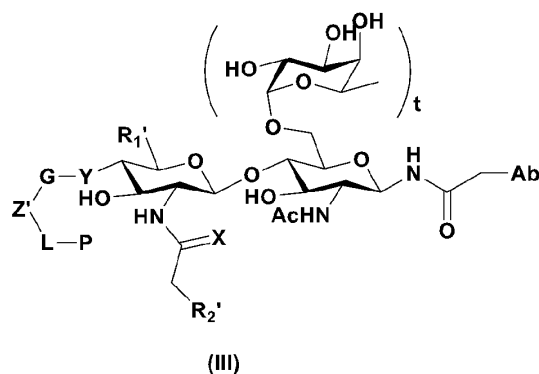


D20



其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

12. 式(III)所示的基于抗体的偶联药物:

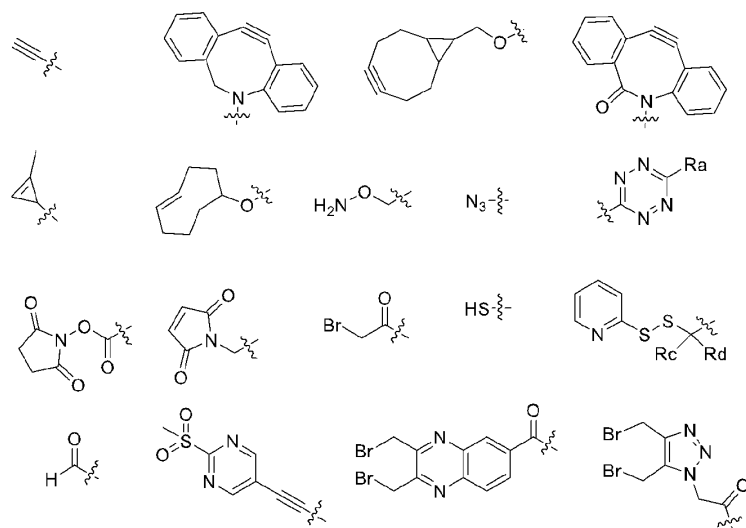


其中, X、Y 和 G 环如权利要求 1-6 中任一项所定义;

Z'、L 和 P 如权利要求 8-10 中任一项所定义; 或者 P-L-Z'-为氢;

t 选自 0 或 1;

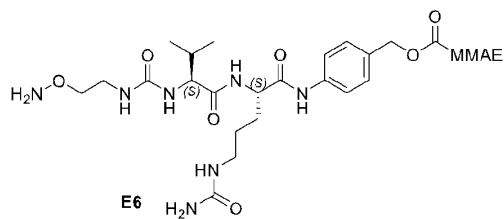
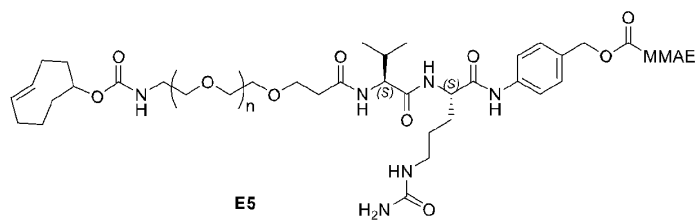
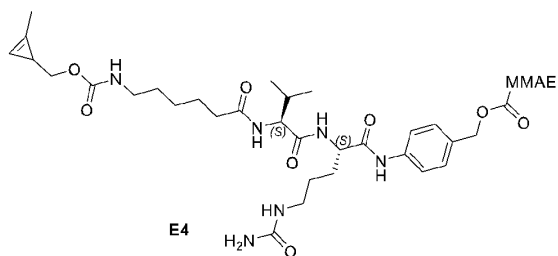
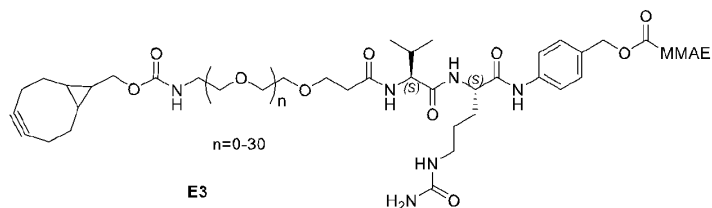
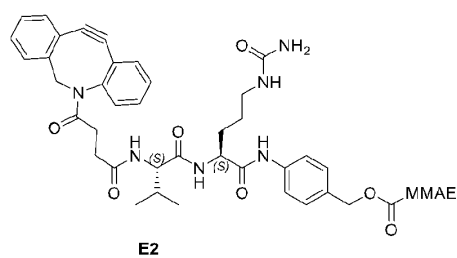
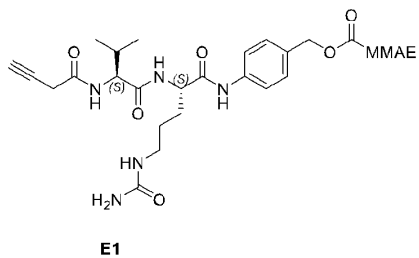
R_1' 选自 R_1 或 R_1 与药物连接器 E-L-P 反应后产生的基团, R_2' 选自 R_2 或 R_2 与药物连接器 E-L-P 反应后产生的基团; 其中所述 R_1 和 R_2 如权利要求 1 和 4-5 中任一项所定义; 所述药物连接器 E-L-P 中的 L 和 P 如权利要求 8-10 中任一项所定义以及 E 包含以下基团:

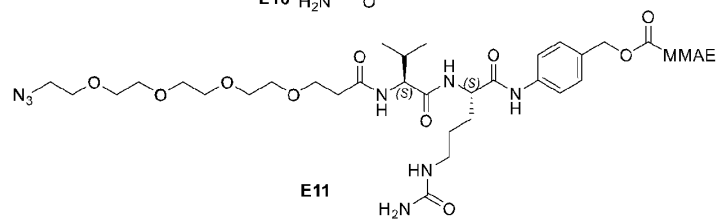
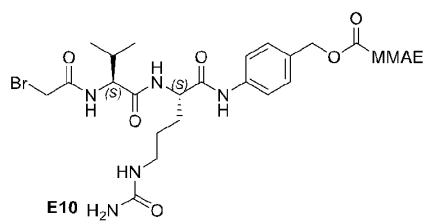
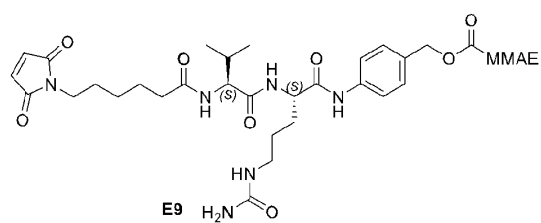
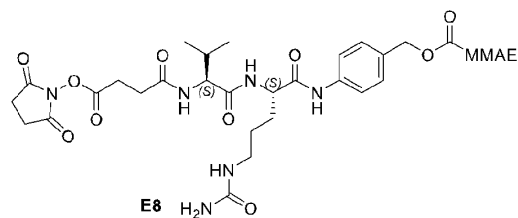
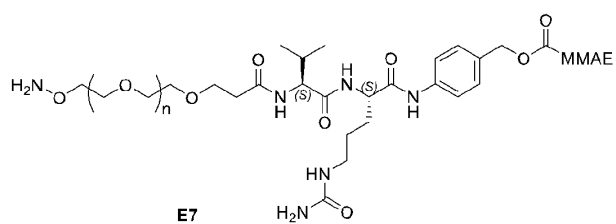


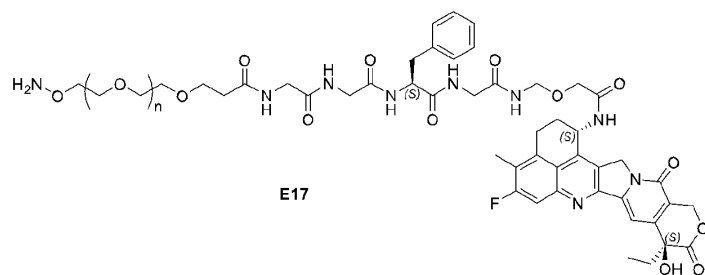
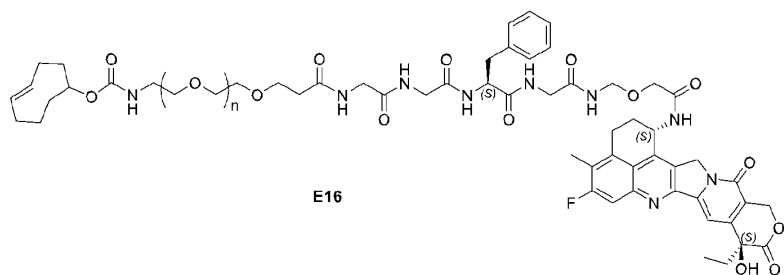
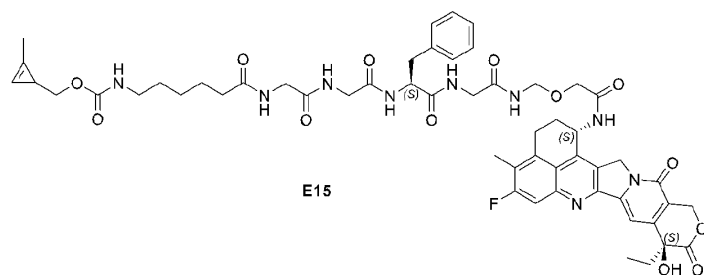
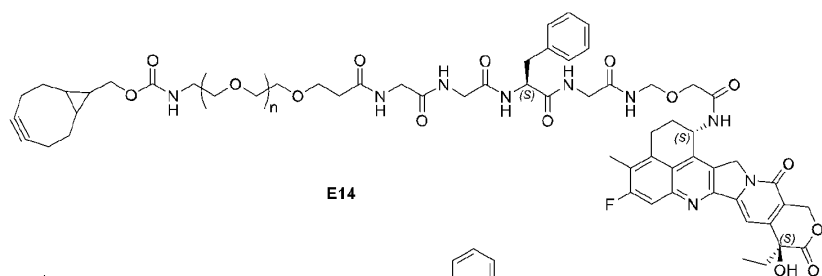
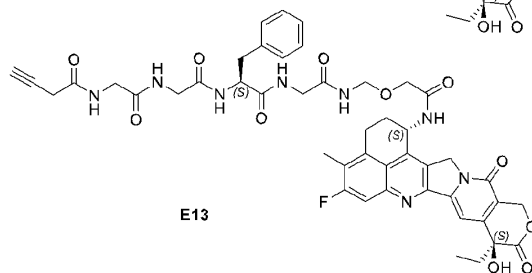
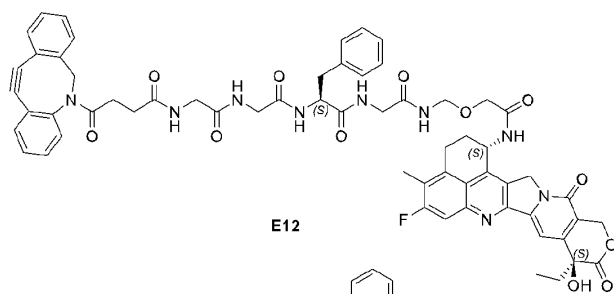
其中, R_a 、 R_c 、 R_d 分别为氢、 C_1 - C_6 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 C_5 - C_{10} 杂芳基;

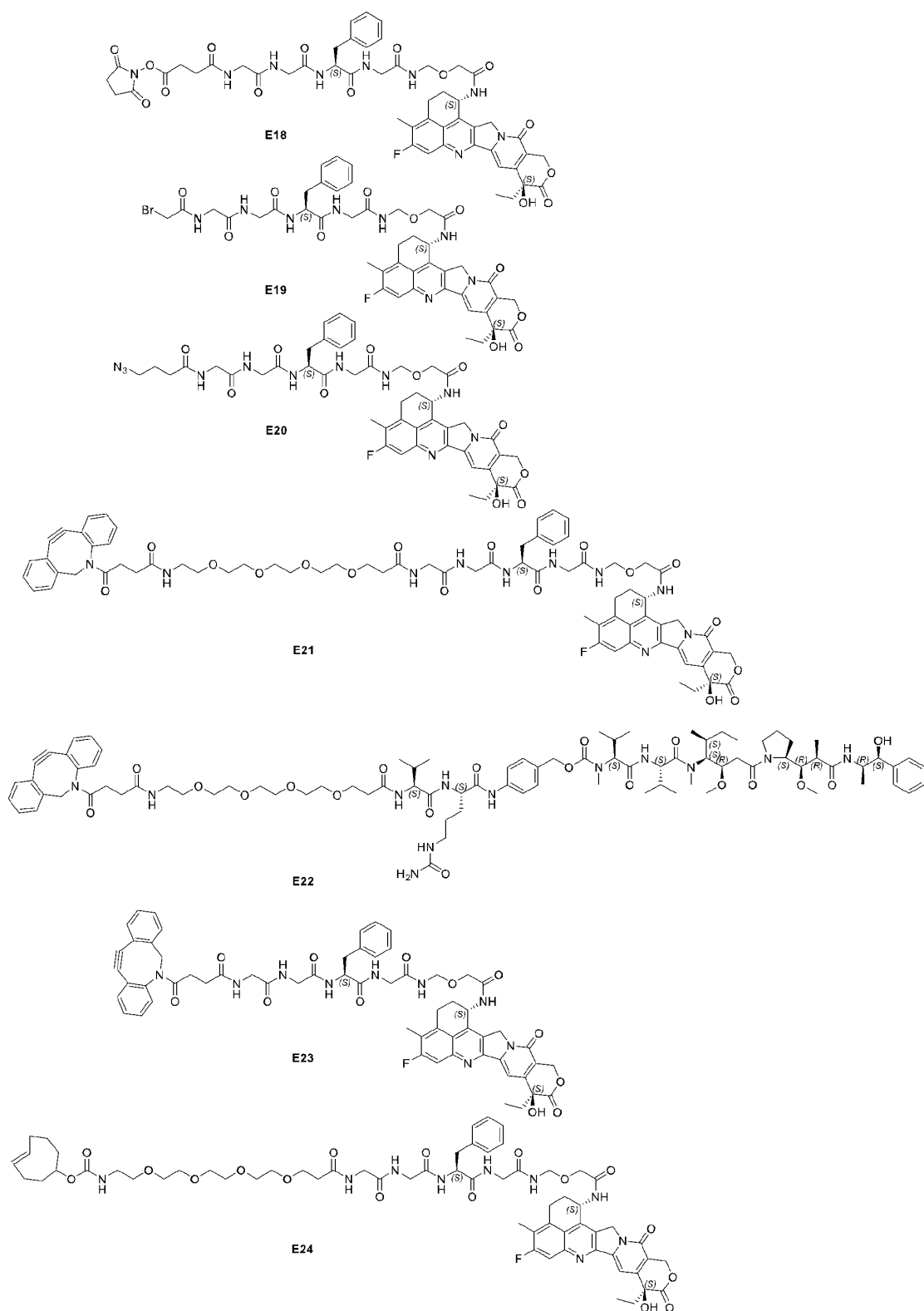
Ab 为抗体或抗原结合片段, 选自单抗、双抗或多抗。

13. 根据权利要求 12 所述的基于抗体的偶联药物, 其中所述药物连接子 E-L-P 选自以下具体化合物:





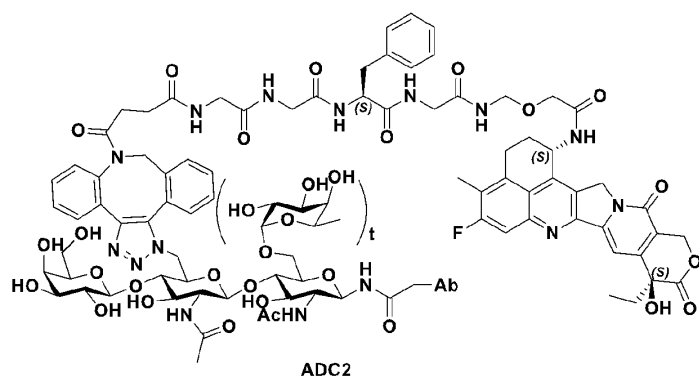
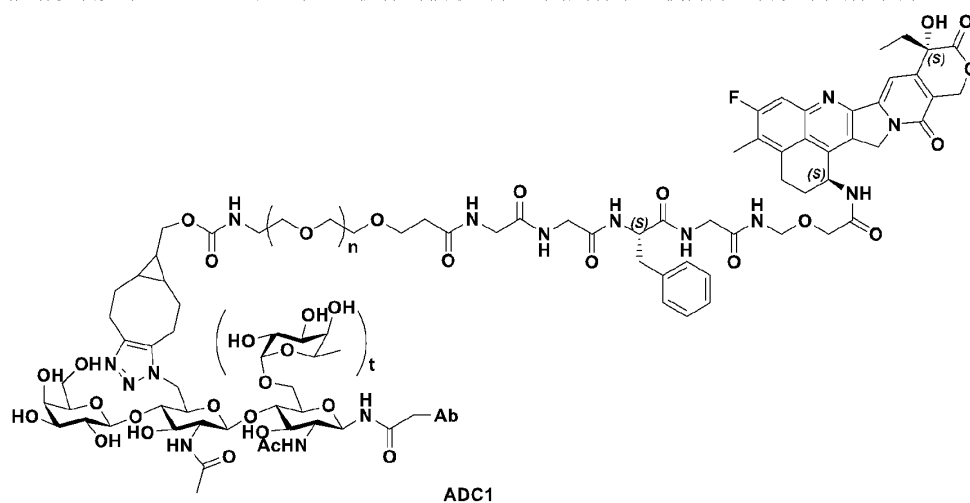


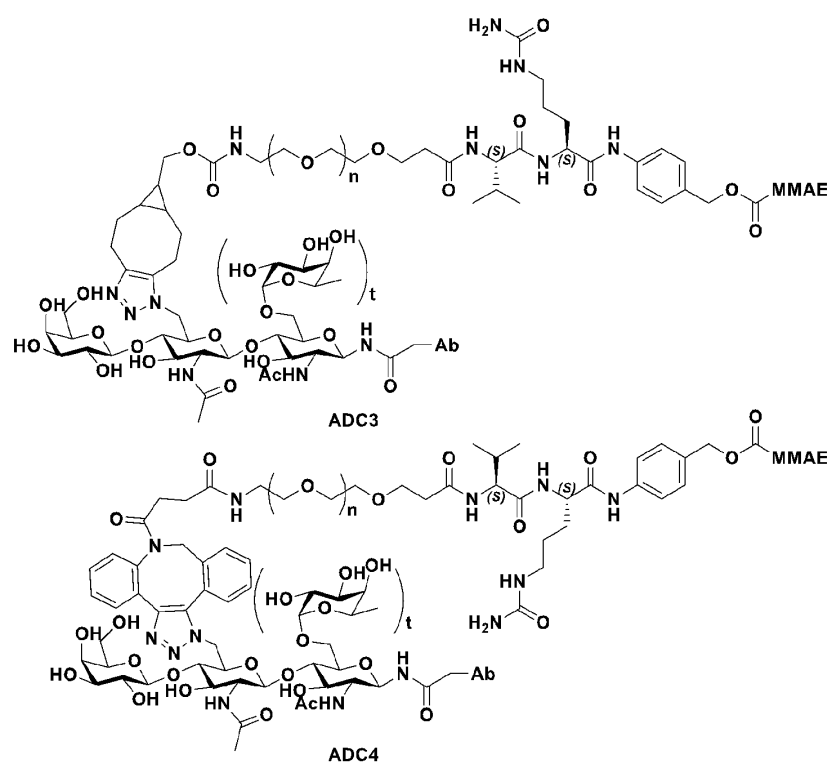


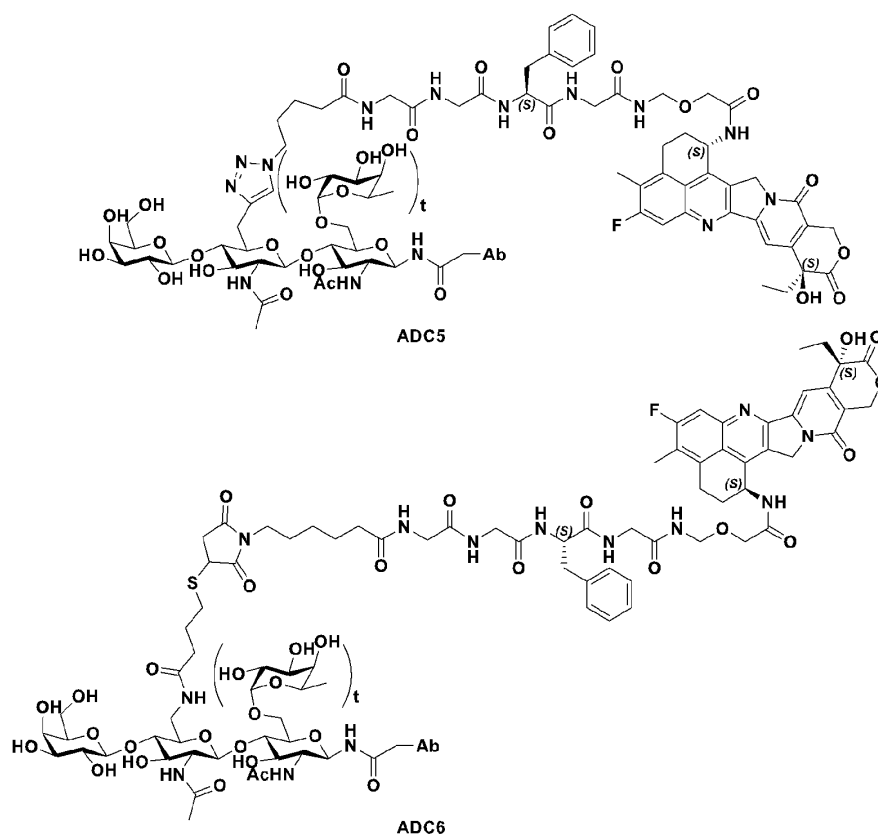
其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数。

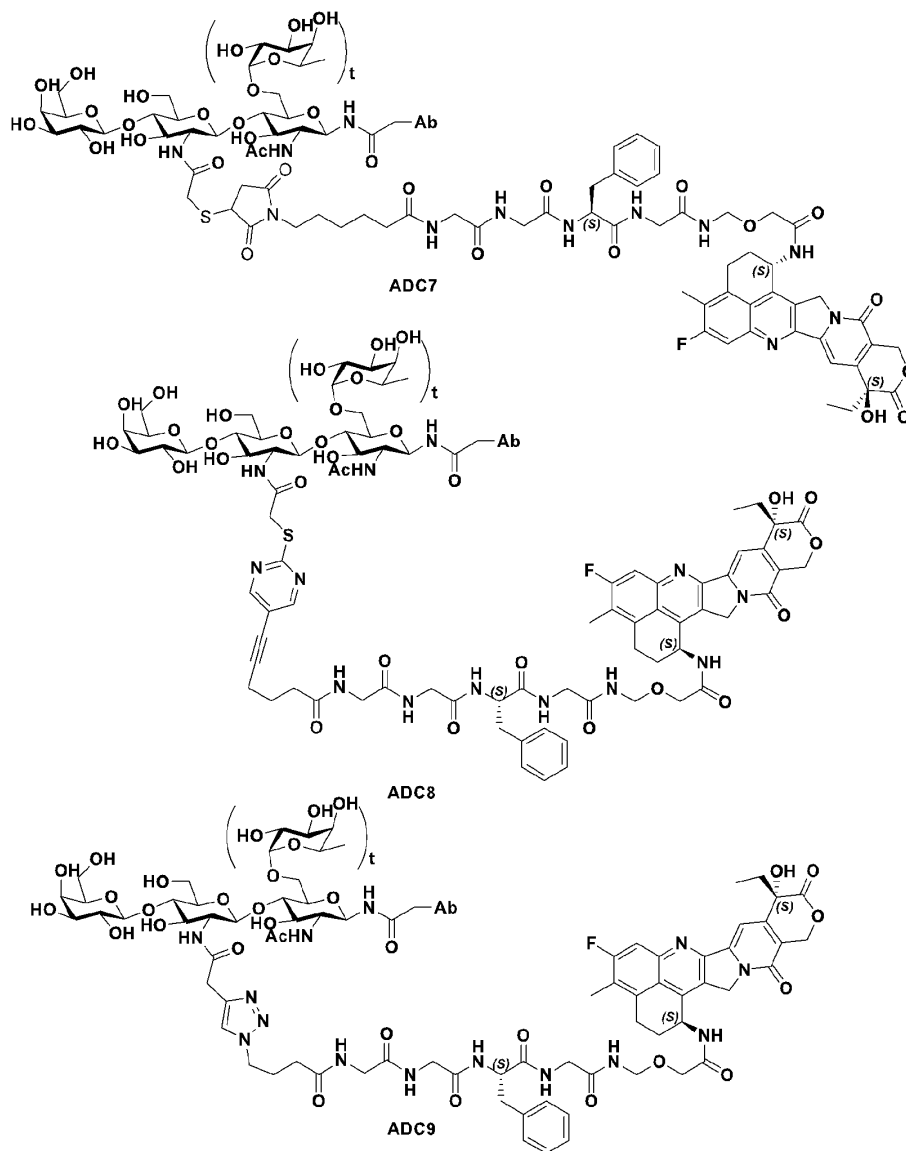
14. 根据权利要求12或13所述的基于抗体的偶联药物, 所述抗体选自: 帕妥珠单抗 (Pertuzumab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、西妥昔单抗 (Cetuximab)、马吉妥昔单抗 (Margetuximab)、阿昔单抗 (Abciximab)、达利珠单抗 (Daclizumab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、帕利韦单抗 (Palivizumab)、巴利昔单抗 (Basiliximab)、贝伐珠单抗 (Bevacizumab)、帕妥尤单抗 (Panitumumab)、尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)、地舒单抗 (Denosumab)、佐妥昔单抗 (Zolbetuximab)、雷莫西尤单抗 (Ramucirumab)、奈妥尤单抗 (Necitumumab)、伊匹木单抗 (Ipilimumab)、达雷妥尤单抗 (Daratumumab)、阿仑妥珠单抗 (Alemtuzumab)、依洛珠单抗 (Elotuzumab)、贝林妥欧单抗 (Blinatumomab)、纳武利尤单抗 (Nivolumab)、帕博利珠单抗 (Pembrolizumab)、阿替利珠单抗 (Atezolizumab)、阿维利尤单抗 (Avelumab)、度伐利尤单抗 (Durvalumab)、特瑞普利单抗 (Toripalimab)、卡妥欧单抗 (Catumaxomab)、艾美赛珠单抗 (Emicizumab)、埃万妥单抗 (Amivantamab)。

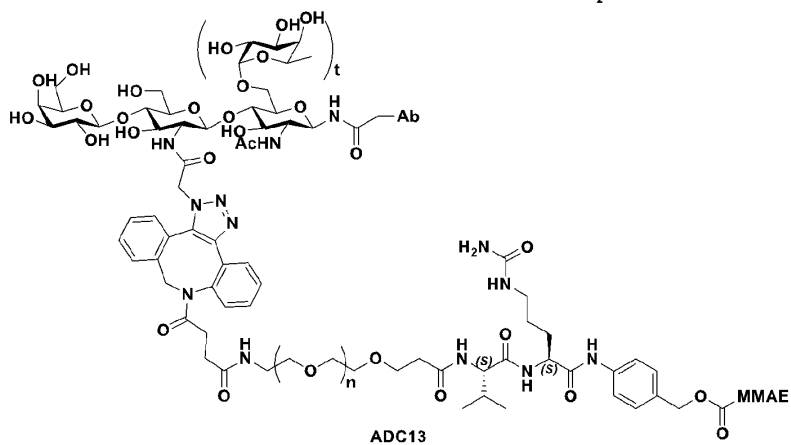
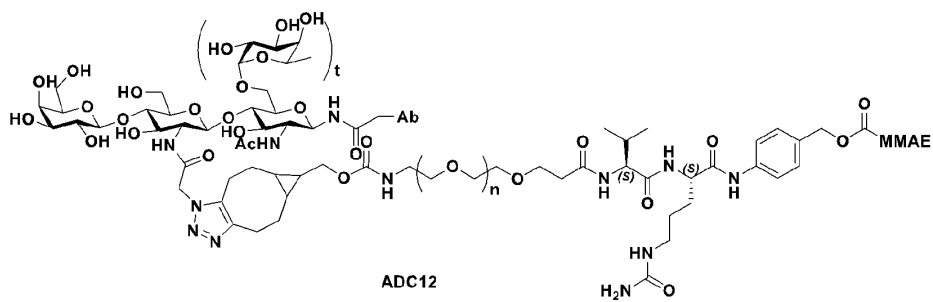
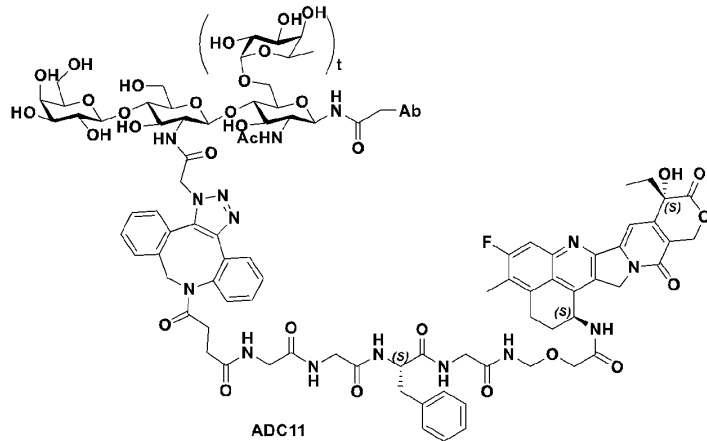
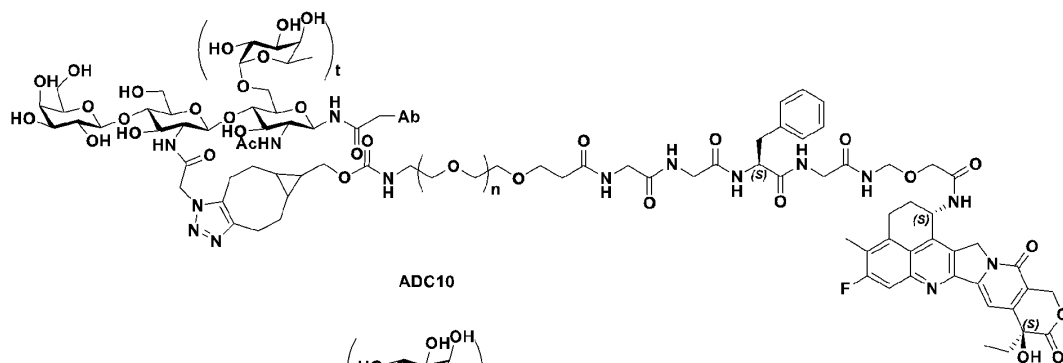
15. 根据权利要求 12 或 14 所述的基于抗体的偶联药物, 其具有单一载荷并选自以下具体结构:

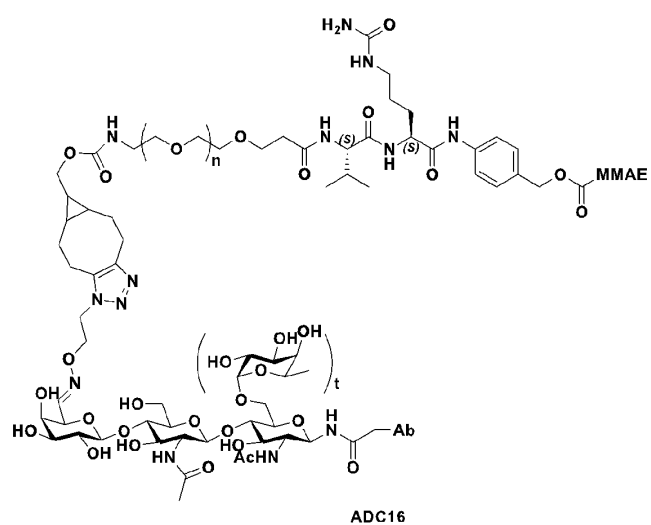
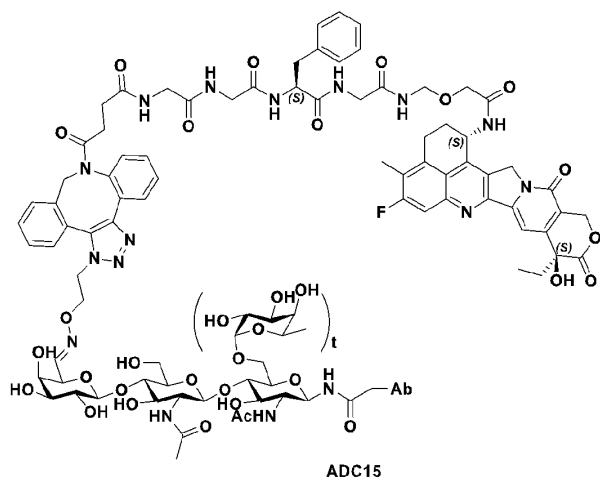
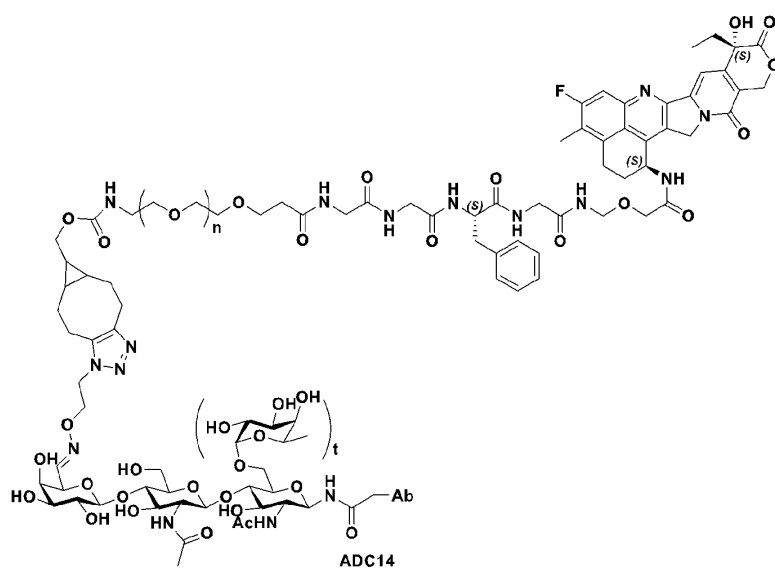


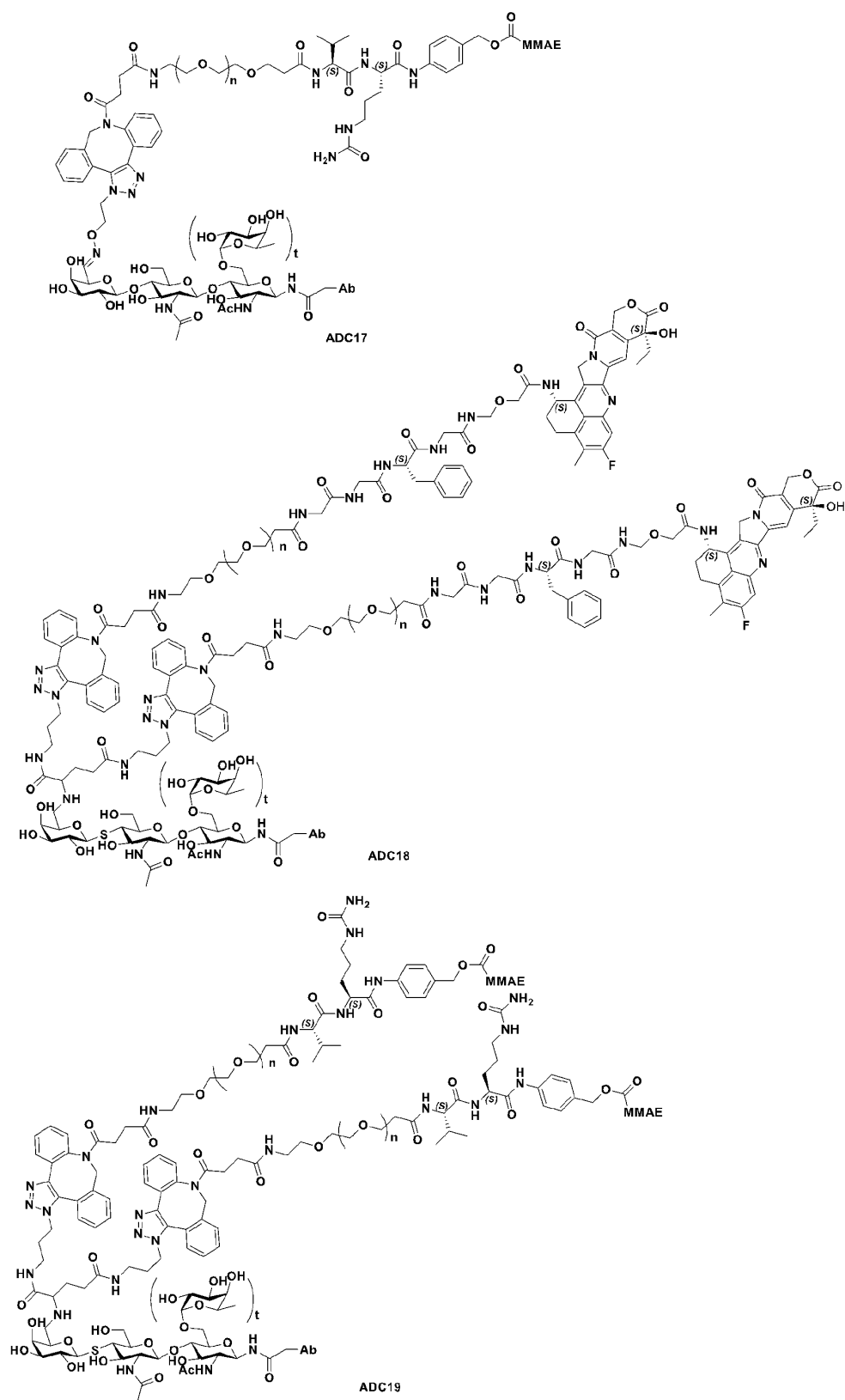


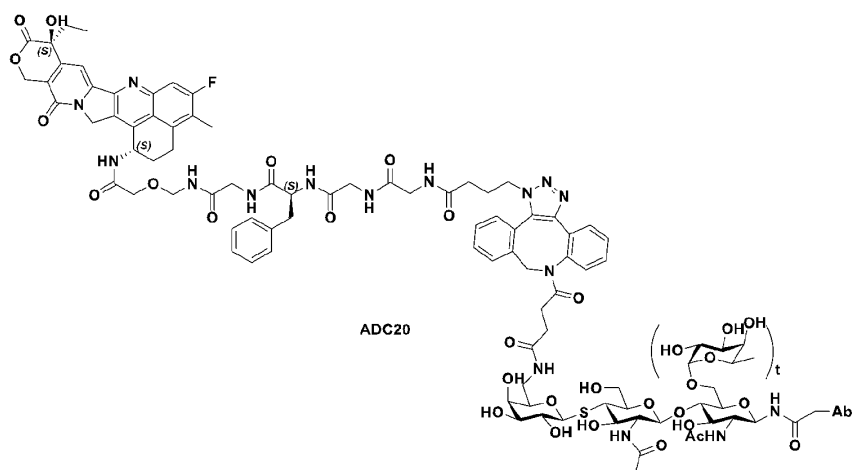




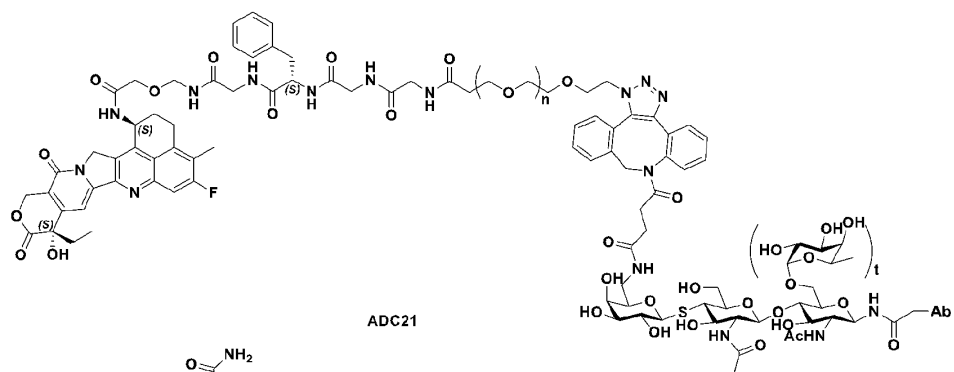




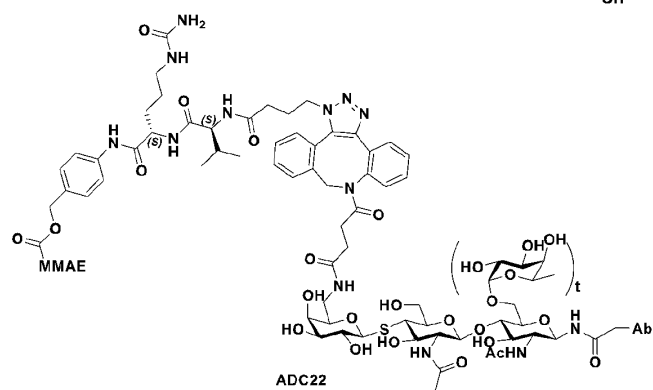




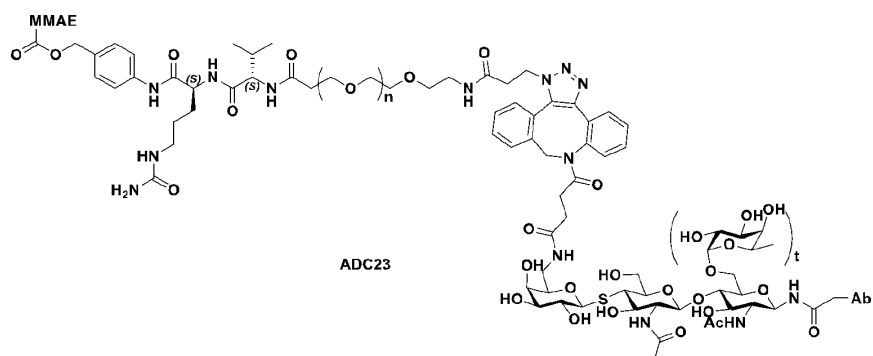
ADC20



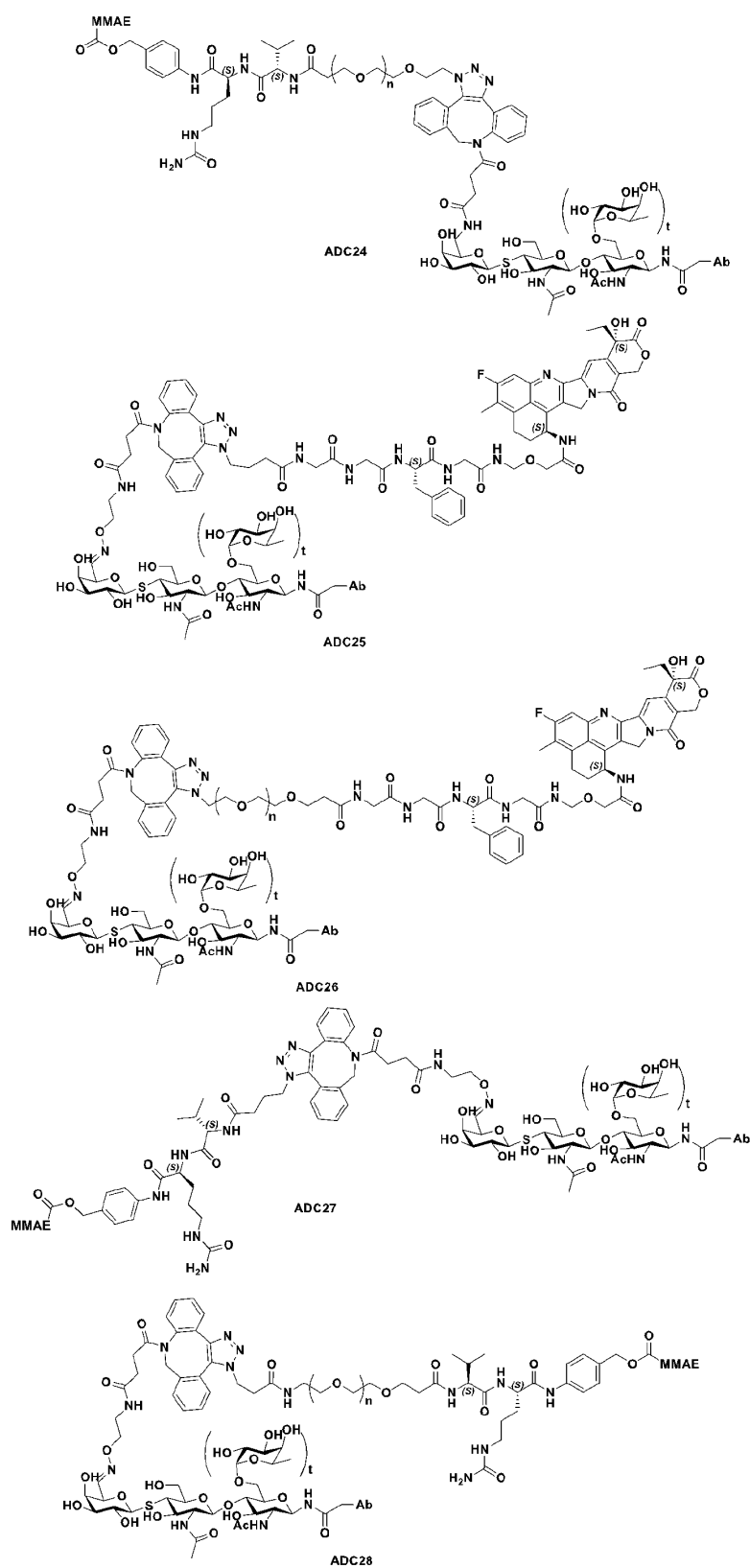
ADC21

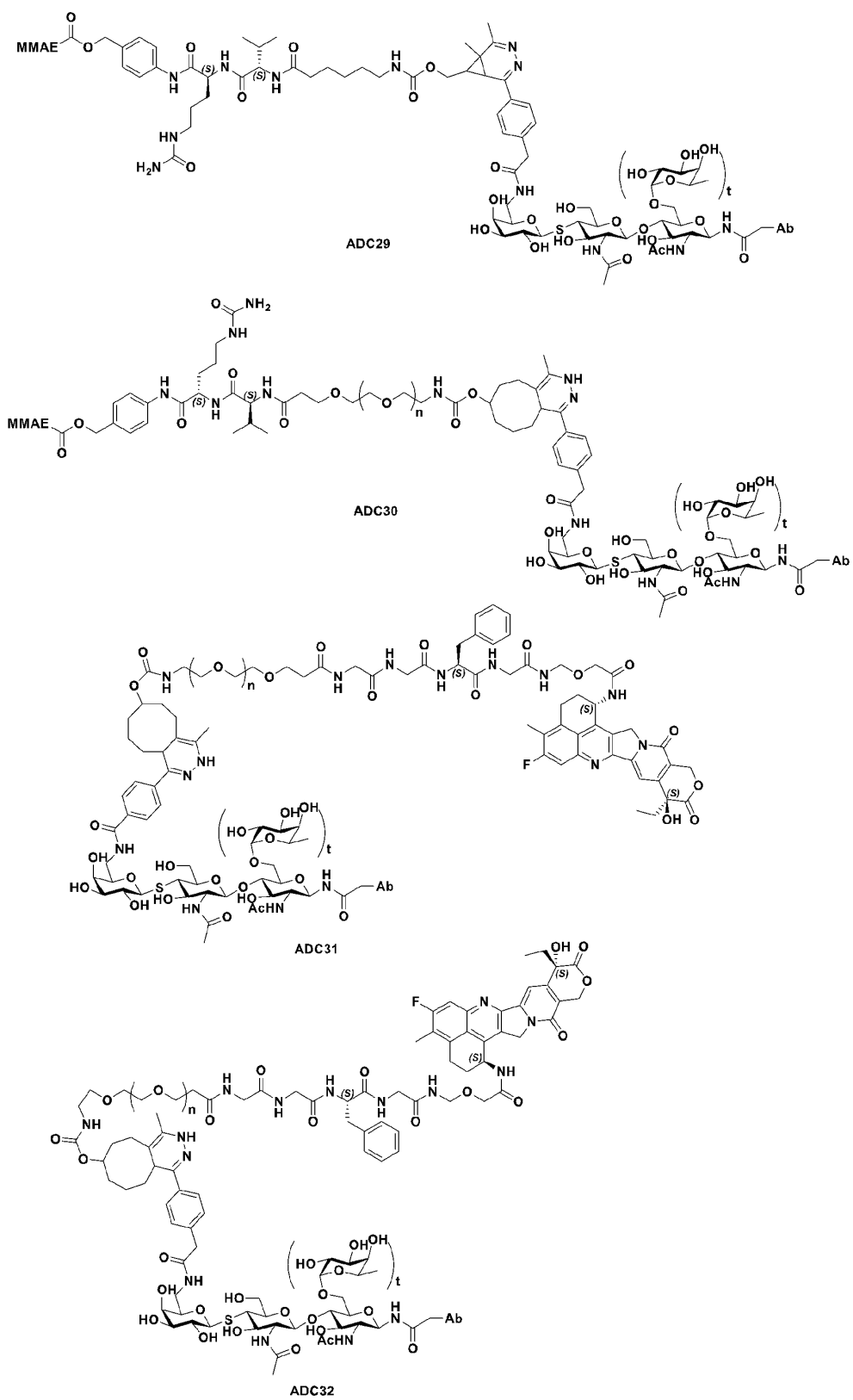


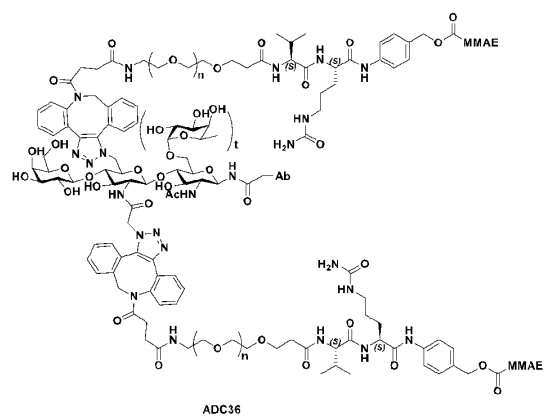
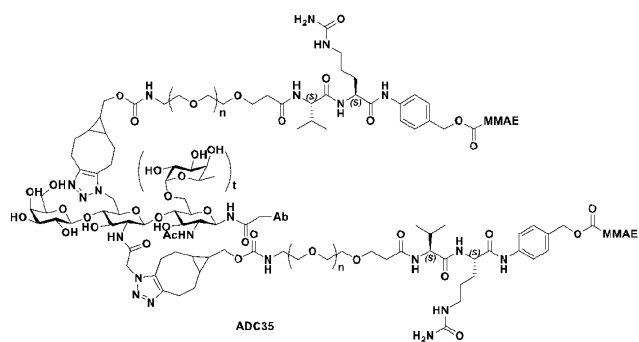
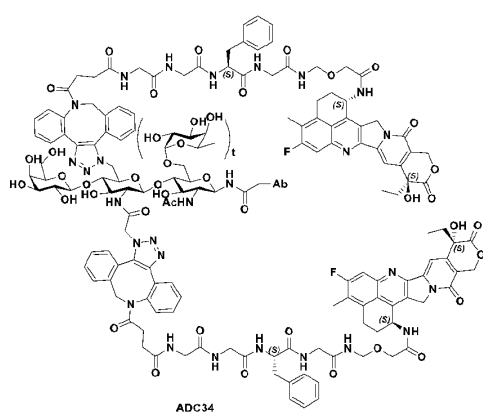
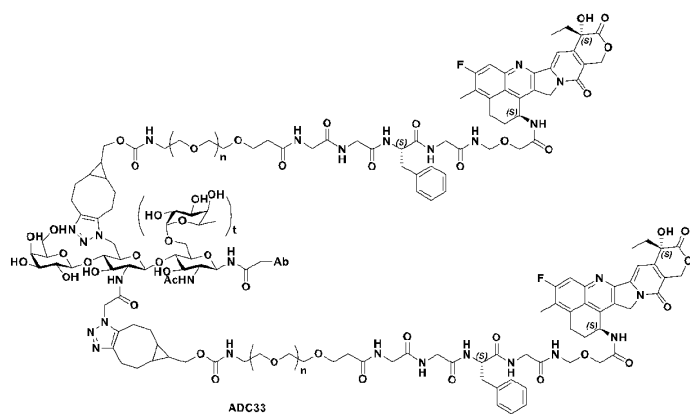
ADC22

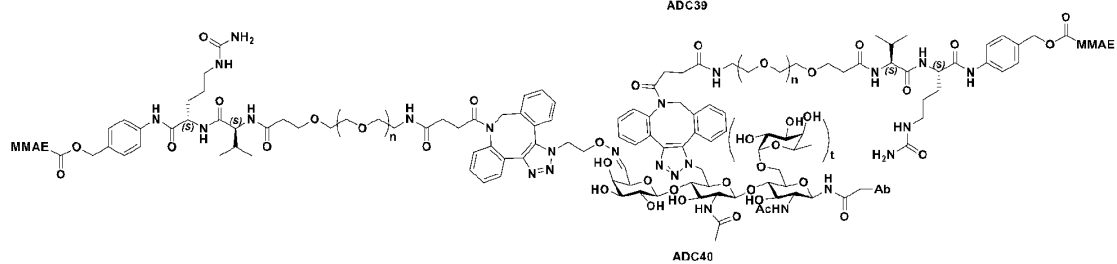
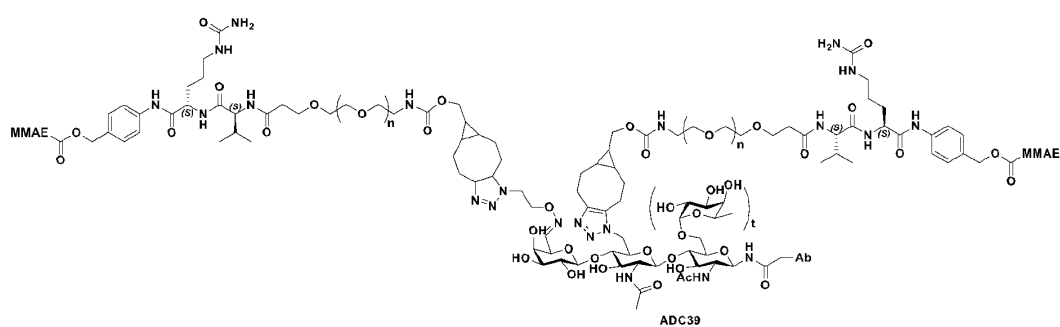
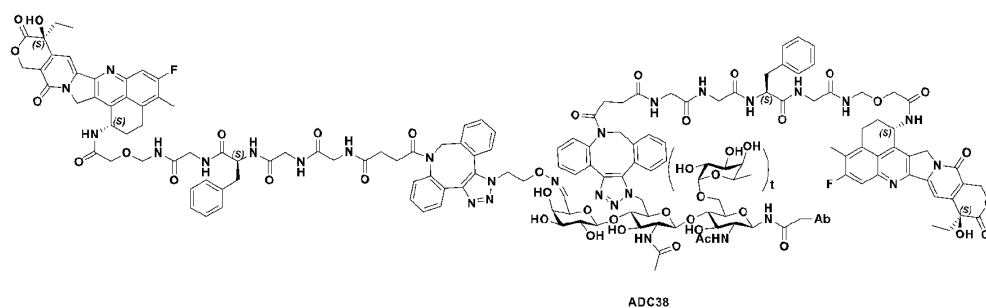
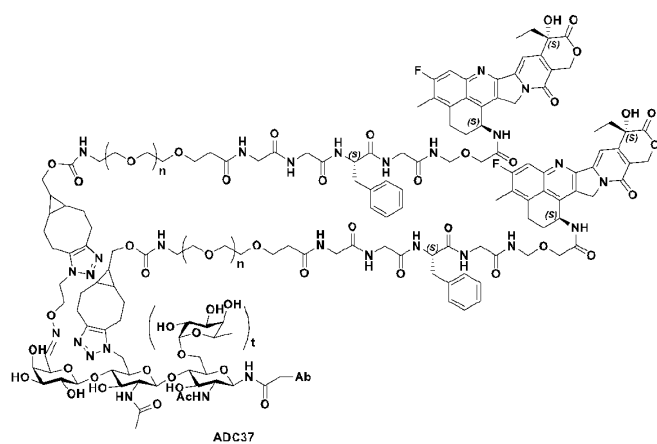


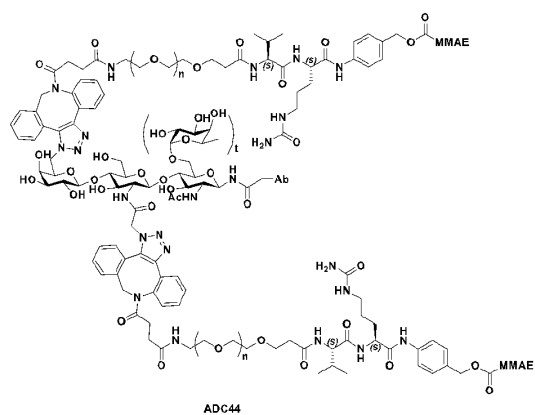
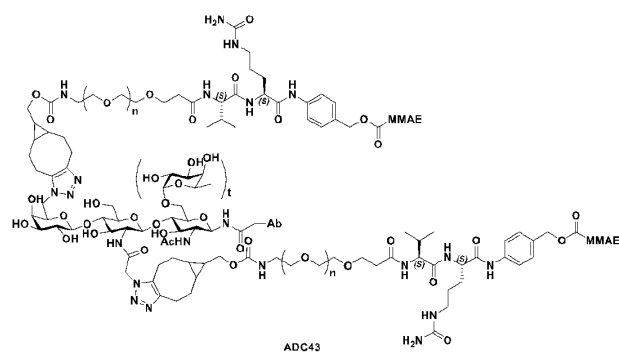
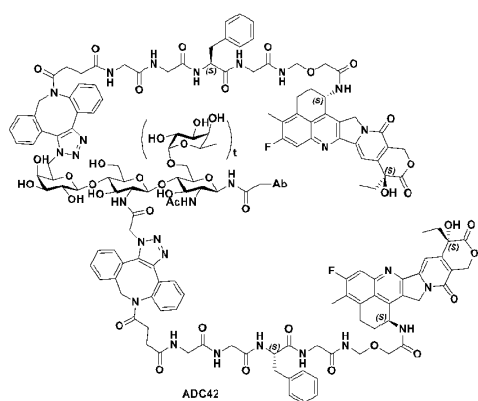
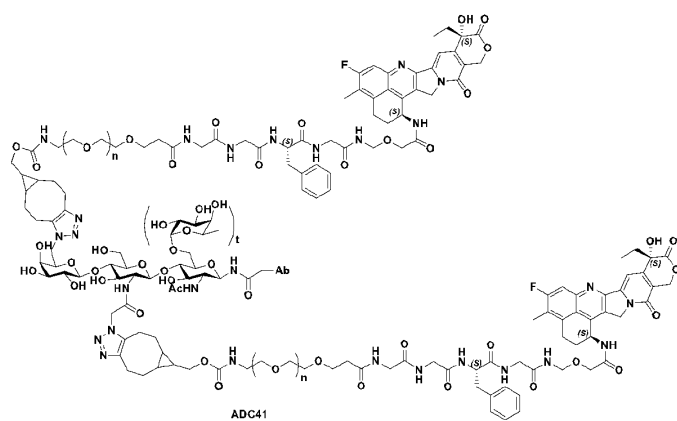
ADC23

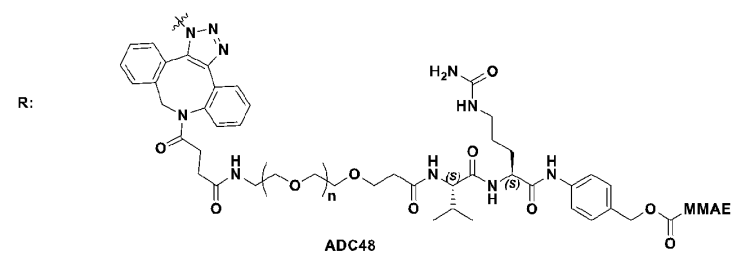
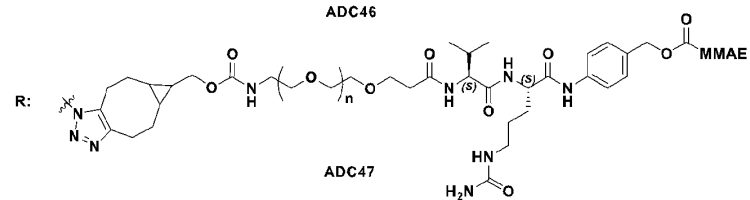
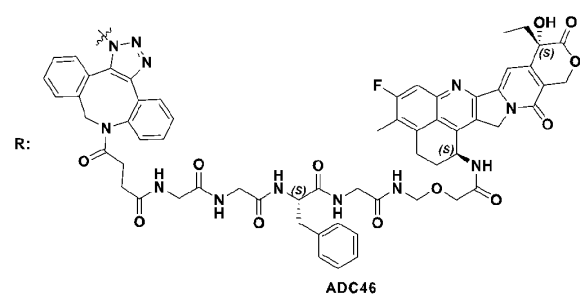
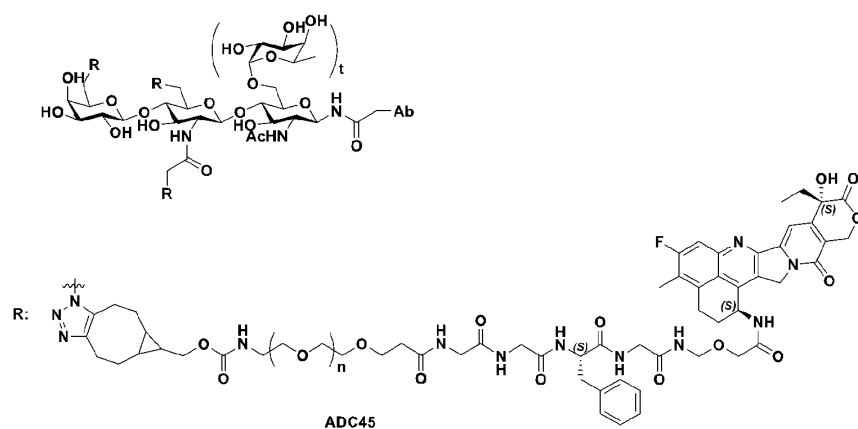


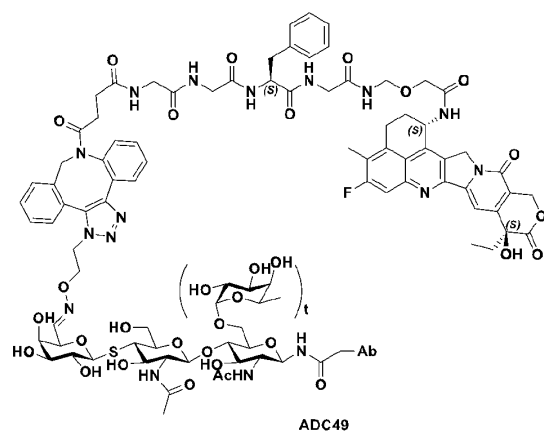




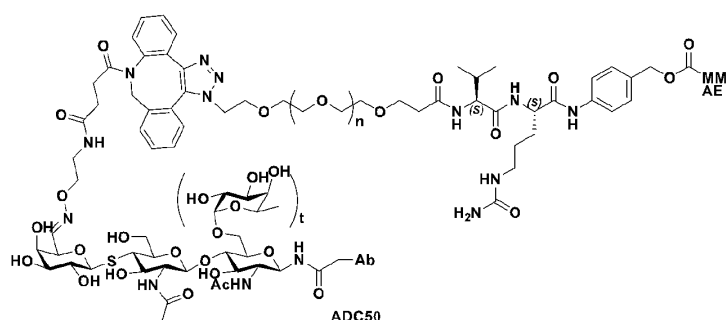




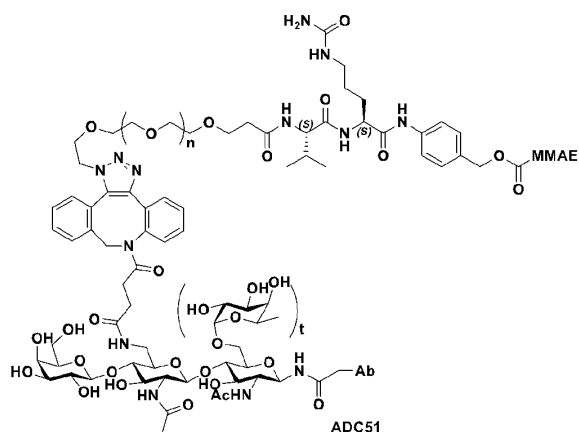




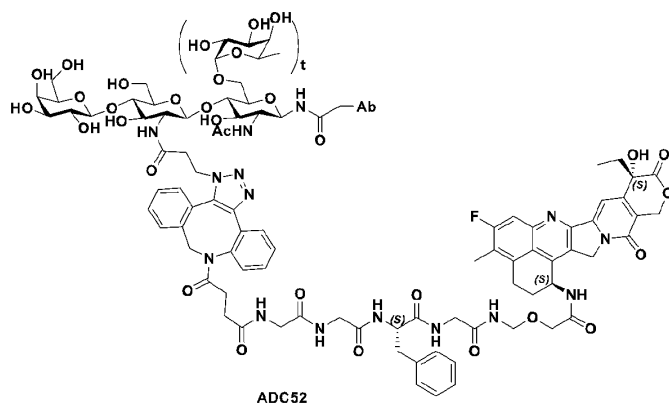
ADC49



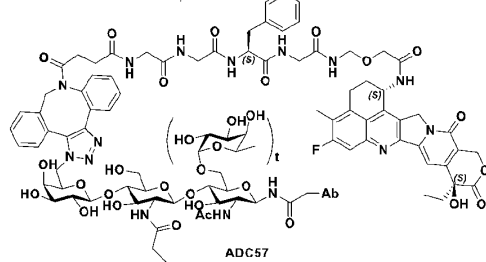
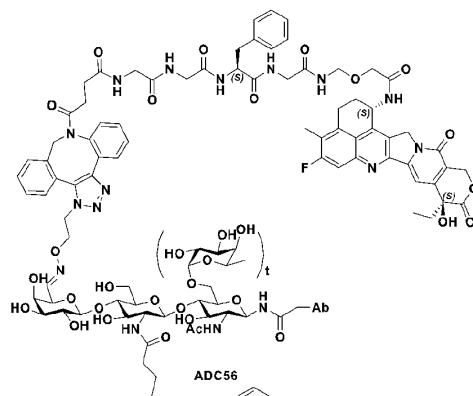
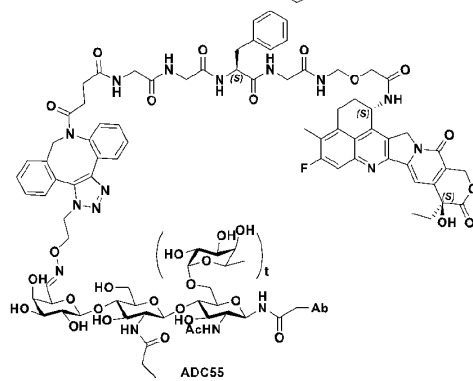
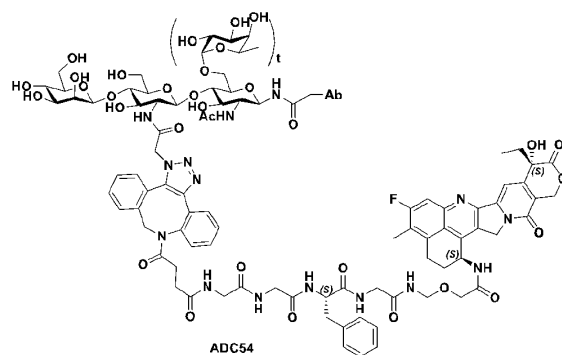
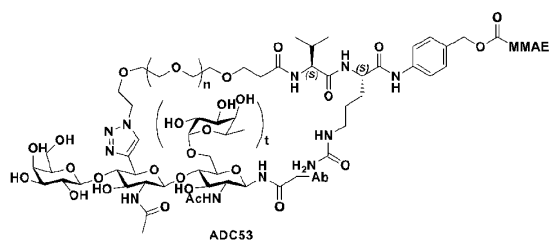
ADC50

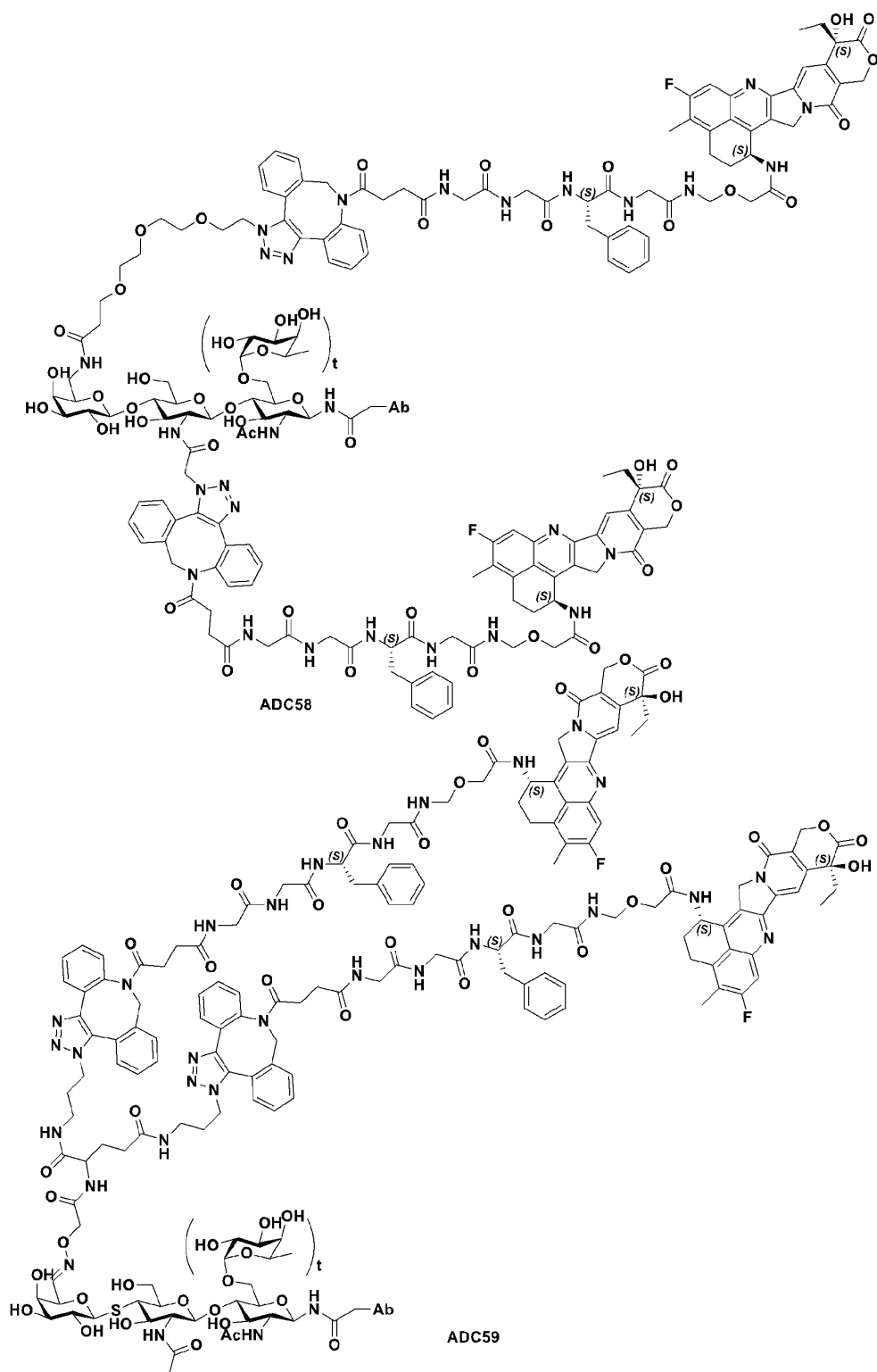


ADC51

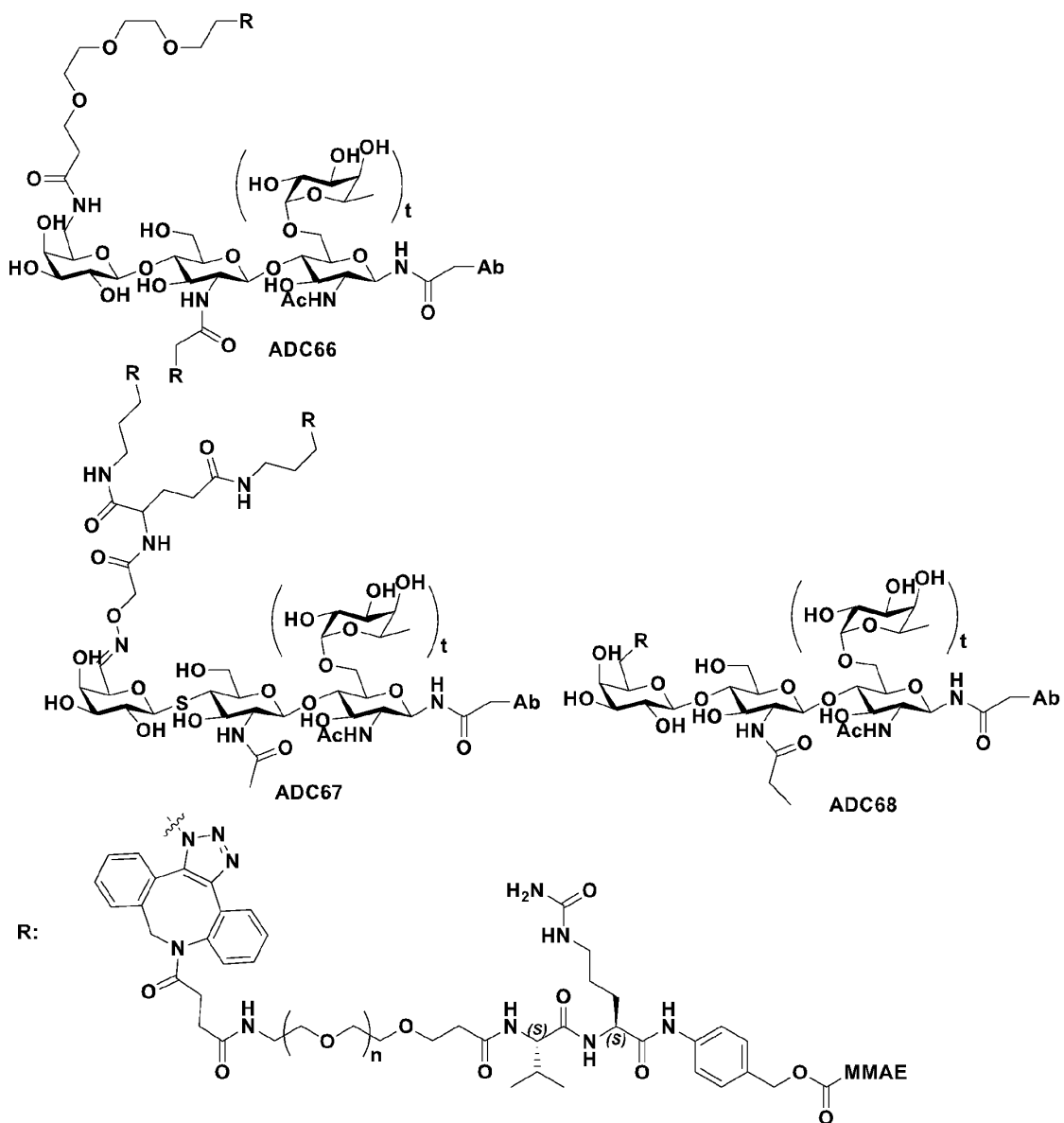


ADC52





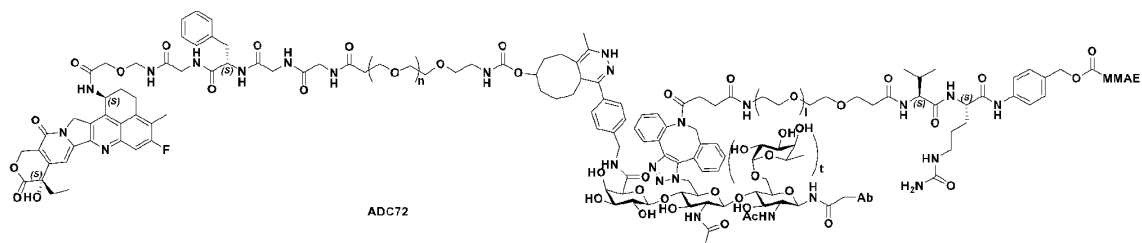
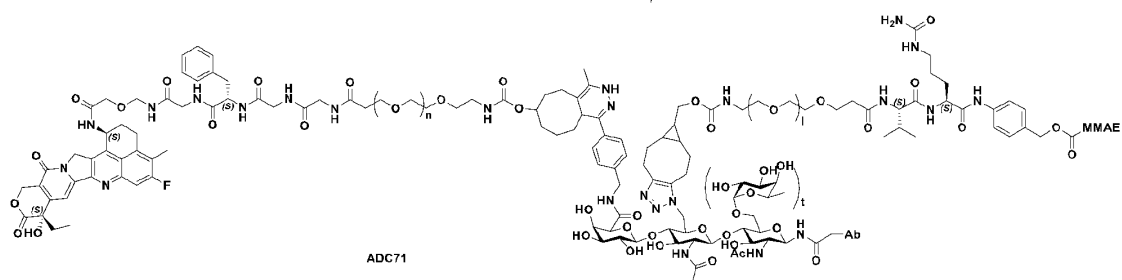
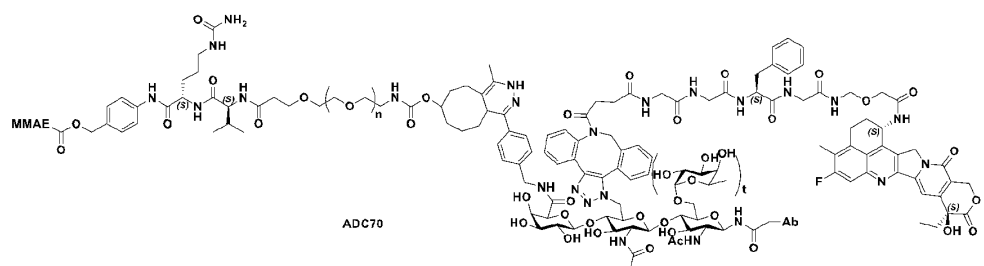
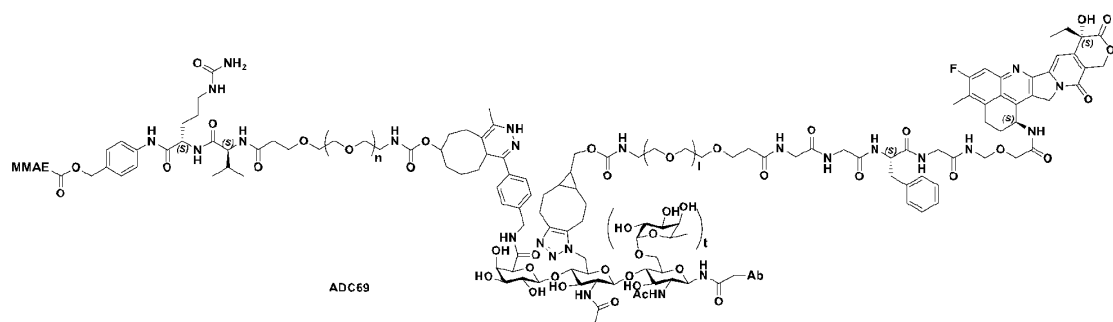


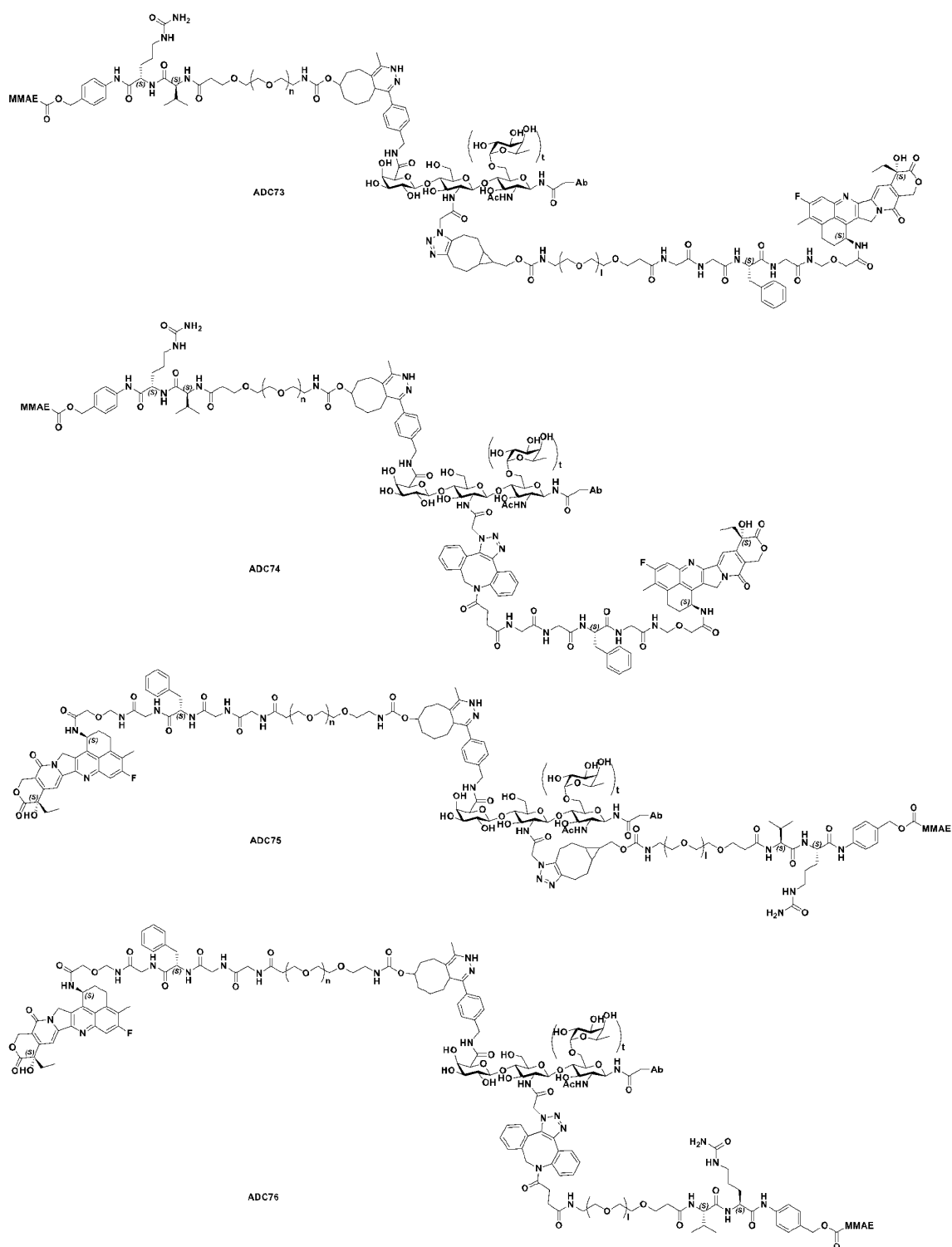


其中, n 选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数;

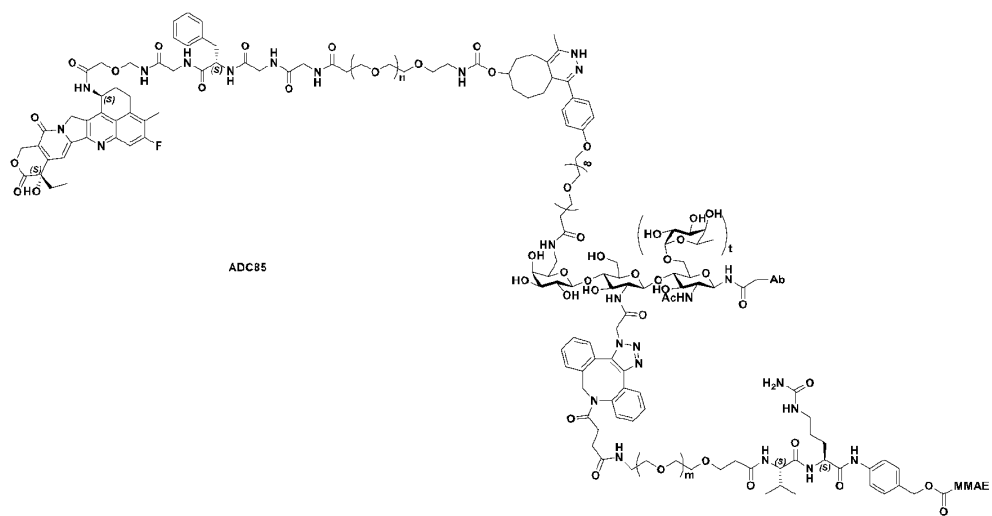
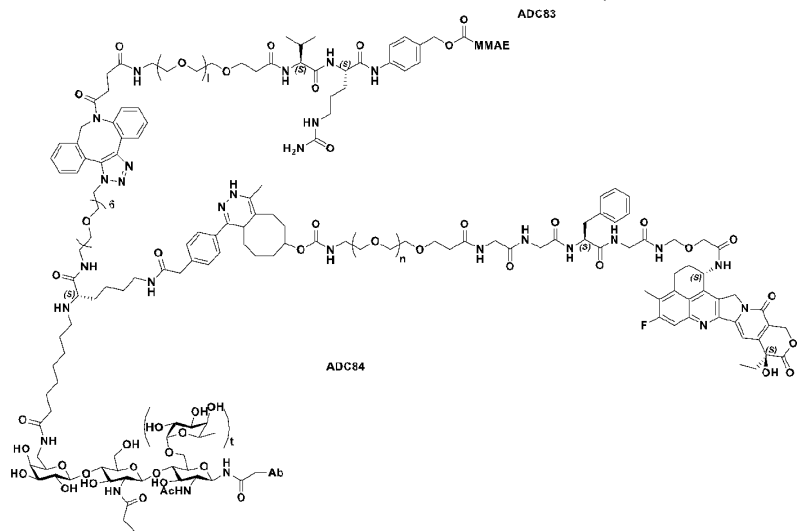
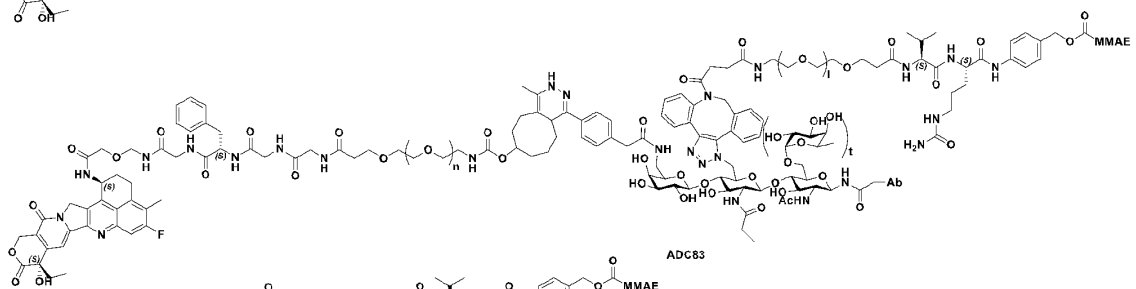
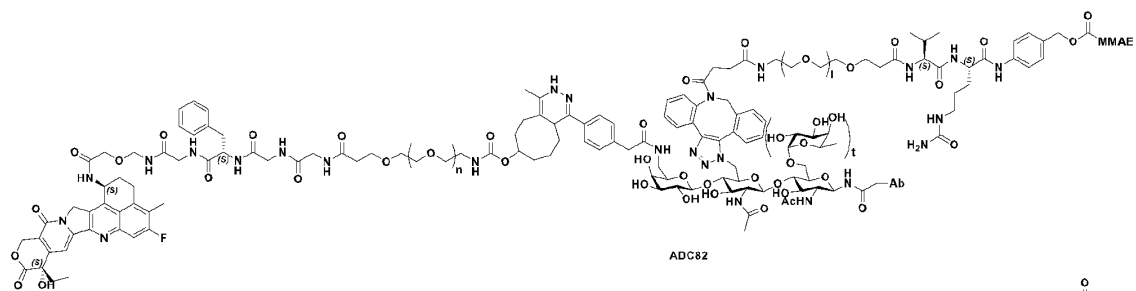
t 选自 0 或 1。

16. 根据权利要求 12 或 14 所述的基于抗体的偶联药物, 其具有双载荷并选自以下具体化合物:









其中, n 和 l 分别独立选自 0-30 的整数, 或者 0-20 的整数, 或者 0-10 的整数;

t 选自 0 或 1。

17. 基于抗体的偶联药物的制备方法, 所述方法包括以下三种方式:

方式一:

a) 在具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶或糖苷内切酶和岩藻糖水解酶的作用下, 野生型抗体被水解形成含有一个 N-乙酰葡萄糖胺或核心岩藻糖化的 N-乙酰葡萄糖胺的去糖基化抗体;

b) 步骤 a) 中得到的去糖基化抗体与权利要求 1-7 中任一项所述的二糖连接子在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下, 偶联得到糖工程抗体;

c) 将步骤 b) 中所得到的包含正交反应性基团的糖工程抗体与带有能与所述正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团修饰的权利要求 12 或 13 所述的药物连接子 E-L-P 进行偶联, 制备得到基于抗体的偶联药物;

方式二:

a) 在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下, 野生型抗体与权利要求 1-7 中任一项所述二糖连接子进行偶联, 得到糖工程抗体;

b) 将步骤 a) 中所得到的包含正交反应性基团的糖工程抗体与带有能与所述正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团修饰的权利要求 12 或 13 所述的药物连接子 E-L-P 进行偶联, 制备得到基于抗体的偶联药物;

方式三:

在具有糖基转移活性的糖苷内切酶或其突变体的催化下, 将野生型抗体和权利要求 8-11 中任一项所述的二糖-小分子药物偶联物共孵育, 或将去糖基化抗体和二糖-小分子药物偶联物共孵育, 制备得到基于抗体的偶联药物。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中, 在所述方式一和所述方式二中, 所述正交反应性基团和能与该正交反应性基团进行特异性偶联反应的对应基团选自以下任一组合: 叠氮基和炔基、四嗪基和反式环辛烯 (TCO)、巯基和马来酰亚胺、巯基与巯基或巯基活化形式、醛基与氨基、醛基与氨基或肼基。

19. 根据权利要求 17 或 18 所述的方法, 其中, 具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶选自 Endo Se2、Endo Si、Endo S、Endo S2、Endo F3、Endo A、Endo D、Endo CC 及它们的突变体; 以及/或者具有糖基转移活性的糖苷内切酶选自 Endo Se2、Endo Si、Endo S、Endo S2、Endo F3 及它们的突变体。

20. 根据权利要求 17 或 18 所述的方法, 当制备无核心岩藻糖化的去糖基化抗体、糖工程抗体、基于抗体的偶联药物时, 包括将具有 beta-N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶水解活性的糖苷内切酶与岩藻糖水解酶联用。

21. 权利要求 1-7 中任一项所述的二糖连接子或权利要求 8-11 中任一项所述的二糖偶联物在制备基于抗体的偶联药物中的用途。

22. 权利要求 12-16 中任一项所述的基于抗体的偶联药物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 and/或预防肿瘤、炎症、病毒、感染性疾病或其它免疫性疾病。