

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 3 月 14 日 (14.03.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/050809 A1

(51) 国际专利分类号:

C07H 1/00 (2006.01) *A01N 41/04* (2006.01)
C07H 5/10 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
C07H 9/04 (2006.01) *C07D 513/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/118051

(22) 国际申请日: 2022 年 9 月 9 日 (09.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 四川大学 (**SICHUAN UNIVERSITY**) [CN/
CN]; 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 钮大文 (**NIU, Dawen**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。张霞 (**ZHANG, Xia**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。张晨 (**ZHANG, Chen**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。左昊 (**ZUO, Hao**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。曾虹鑫 (**ZENG, Hongxin**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。李艳静 (**LI, Yanjing**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。王稼犀 (**WANG, Jiayi**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。任海燕 (**REN, Haiyan**); 中国四川省成都市武侯区一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。

(74) 代理人: 成都高远知识产权代理事务所 (普通合伙) (**GAOYUNG INTELLECTUAL PROPERTY**)

AGENCY (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国四川省成都市高新区衣冠庙邮局 A-42 号信箱, Sichuan 610041 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** METHOD FOR GLYCOSYLATION MODIFICATION OF PROTEINS AND/OR POLYPEPTIDES

(54) 发明名称: 一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法

(57) **Abstract:** Provided is a method for the glycosylation modification of proteins and/or polypeptides, belonging to the technical field of medicinal chemistry. Using glycosyl sulfinate as a raw material, a method for the glycosylation modification of proteins and/or polypeptides is provided. Reaction raw materials of the present method are easy to obtain, the reaction conditions are mild, the reaction time is short, and the reaction process is controllable. The obtained glycosylation-modified proteins and/or polypeptides have high yield and high purity. The method for glycosylation modification is applicable not only to proteins and/or peptides containing disulfide bonds, but also to proteins and/or peptides containing sulfhydryl groups. The method is even applicable to proteins and/or peptides containing both disulfide bonds and sulfhydryl groups. The application prospects are broad.

(57) 摘要: 提供了一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法, 属于药物化学技术领域。以糖基亚磺酸盐为原料, 提供了一种对蛋白质和/或多肽进行糖基化修饰的方法, 该方法反应原料易得, 反应条件温和, 反应耗时较短, 反应过程可控, 所得糖基化修饰的蛋白和/或多肽收率高, 纯度高。糖基化修饰方法不仅适用于含二硫键的蛋白质和/或多肽, 还适用于含巯基的蛋白质和/或多肽, 甚至适用于同时含二硫键和巯基的蛋白质和/或多肽, 应用前景广阔。



WO 2024/050809 A1

一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法

技术领域

本发明属于药物化学技术领域，具体涉及一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法。

背景技术

糖基化是蛋白质的一种重要的翻译后修饰。所有生物的细胞表面都由许多不同类型的糖链所包被，而且在细胞内也存在各种类型的糖基化。糖蛋白是许多生物过程的基本物质，这些过程包括细胞生长、细胞与细胞的粘着、免疫应答、受精、凝血块的降解、病毒增殖、寄生虫感染和炎症反应等。随着人类基因组计划的完成以及蛋白质组技术的不断发展，糖基化蛋白质组的研究受到了越来越受到广泛的重视。

目前，蛋白质糖基化工程的研究多集中于药物方面和食品方面，研究发现，蛋白质糖基化可增加重组蛋白药物的半衰期及靶向性；对鱼肉蛋白质、卵清蛋白、 β -乳球蛋白、牛血清蛋白、谷蛋白等蛋白质进行糖基化，结果表明，新合成的糖蛋白在乳化性、溶解性、热稳定性、抗菌性、抗氧化性等功能特性方面都有不同程度的提高；对改性后糖蛋白的营养学和毒理学进行的研究结果表明，糖基化反应在一定程度上能抑制 β -乳球蛋白的过敏反应特性，蛋白质中的必需氨基酸除赖氨酸有少量损失外，对其他氨基酸基本没有影响。因此，对蛋白质糖基化改性的方法进行研究具有重要意义。

目前蛋白质糖基化方法主要包括干热法和湿热法。其中，干热法糖基化是最先使用的蛋白质糖基化方法，也是蛋白质糖基化处理的最主要方法。通常，先将蛋白质和多糖按一定比例在水溶液中进行混合，经干燥得到两者的混合粉末，然后在一定的温度、湿度和时间条件下诱导糖基化反应，反应完毕后迅速冷却以终止糖基化反应。干热法糖基化具有操作简单，反应条件容易控制，无需加入其他试剂，反应产物接枝度高等优点，但反应时间较长，反应时间通常为几天到几周。而蛋白质湿热法糖基化是基于液相对蛋白和糖进行热处理从而使蛋白质糖基化改性的一种方法，多用于蛋白质与小分子糖之间的接枝反应。湿热法糖基化具有反应时间短，反应迅速等优点，但是，一方面，由于美拉德反应的初级反应为可逆反应，水作为初级反应的反应产物在体系中大量存在，抑制了糖基化反应的进行；另一方面，蛋白质在水中高温处理容易发生变性聚集，加速反应向高级阶段进行，甚至生成有毒有害物质，如丙烯酰胺和4-甲基咪唑等。因此湿热法糖基化存在反应不完全，接枝度低，产物复杂，反应难控制的问题。

开发出一种反应原料易得，反应条件温和，反应耗时较短，反应过程可控的方法对蛋白质或多肽进行糖基化修饰具有重要意义。

发明内容

本发明的目的在于提供一种反应原料易得，反应条件温和，反应耗时较

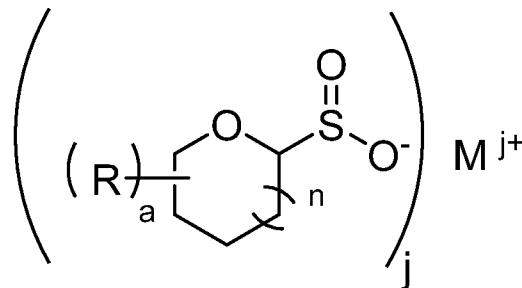
短，反应过程可控的对蛋白质和/或多肽进行糖基化修饰的新方法。

本发明提供了一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法，所述方法包括以下步骤：

以包括糖基亚磺酸盐、蛋白和/或多肽、氧化剂在内的物质为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；

其中，所述蛋白和/或多肽中含巯基和/或二硫键；

所述糖基亚磺酸盐的结构如式 W 所示：



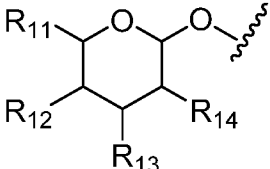
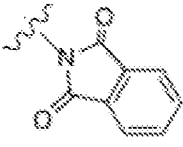
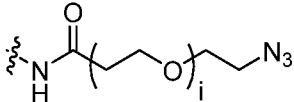
式 W

其中，n 选自 0 或 1；

a 选自 3 或 4；

R 各自独立地选自 L_1R_x ；或者两个相邻的 R 连接成环，另外的 R 各自独立地选自 L_1R_x ，所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的环；

L_1 选自无或 C_{1-2} 亚烷基， R_x 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、

NR_9R_{10} 、、Ph、氨基、、；i 选自 0-6 的整数；

R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立地选自 L_2R_y ； L_2 选自无或 C_{1-2} 亚烷基， R_y 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、 NR_9R_{10} ；

R_8 选自 C_{1-6} 烷基；

R_9 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn；

R_{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn；

j 为 1、2 或 3；

M^{j+} 为 j 价阳离子。

进一步地，所述氧化剂选自双氧水，过氧叔丁醇，过硫酸钾，氧气，叔丁基过氧化物中的一种或两种以上；

和/或，所述溶剂为水性溶液，优选为水或缓冲液；

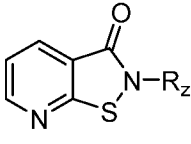
和/或，所述反应的温度为室温；

和/或，所述反应是在惰性气体氛围下进行的。

进一步地，所述蛋白和/或多肽中含巯基，蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 70-1000 个；

所述方法为方法 1 或方法 2；

方法 1 包括以下步骤：先以含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应，然后加入糖基亚磺酸盐、氧化剂，进行第二步反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；化合物 A 为 R_w-S-LG ，其中，LG 为离去基团， R_w 为烷基、芳基或杂芳基，或者 R_w 与 LG 连接成环；优选地，化合

物 A 为 ，其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基；

方法 2 包括以下步骤：以含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

进一步地，方法 1 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (10-300): (20-600): (20-600)，优选为 1:200:400:400；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μmol : 1mL，优选为 0.1 μmol : 1mL；和/或，所述第一步反应的时间为 1-20 分钟，优选为 10 分钟；所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时；

方法 2 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (20-600): (20-600)，优选为 1:400:400；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μmol : 1mL，优选为 0.1 μmol : 1mL；和/或，所述反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时。

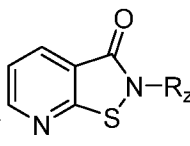
进一步地，所述含巯基的蛋白和/或多肽选自含巯基的 Affibody，Mucin 1 蛋白，GTP 酶，含巯基的非结构性蛋白，含巯基的淀粉样蛋白；

优选地，所述含巯基的 Affibody 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

进一步地，所述蛋白和/或多肽中含巯基，蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 1-100 个；

所述方法为方法 3 或方法 4；

方法 3 包括以下步骤：先以含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应，然后加入糖基亚磺酸盐、氧化剂，进行第二步反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；化合物 A 结构为 R_w-S-LG ，其中，LG 为离去基团， R_w 为烷基、芳基或杂芳基，或者 R_w 与 LG 连接成环；优选地，

化合物 A 为 ，其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基；

方法 4 包括以下步骤：以含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

进一步地，方法 3 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (3-10): (3-10)，优选为 1:3:6:6；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.01-0.2) mmol: 1mL，优选为 0.01mmol: 1mL；和/或，所述第一步反应的时间为 1-20 分钟，优选

为 10 分钟；所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时；

方法 4 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (3-10): (3-10)，优选为 1: 6:6；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.01-0.2) mmol: 1mL，优选为 0.01mmol: 1mL；和/或，所述反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时。

进一步地，所述含巯基的蛋白和/或多肽选自 $\alpha V\beta 3$ 整合素结合肽，细胞穿透肽-R8，还原型谷胱甘肽。

进一步地，所述蛋白和/或多肽中含二硫键，蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 2-2000 个；

所述方法包括以下步骤：将糖基亚磺酸盐、含二硫键的蛋白和/或多肽、氧化剂在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

进一步地，所述含二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (60-600): (20-600)，优选为 1:400:400；

和/或，所述含二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μ mol: 1mL，优选为 0.1 μ mol: 1mL；

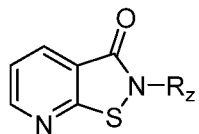
和/或，所述反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 0.5-1 小时。

进一步地，所述含二硫键的蛋白和/或多肽选自赫赛汀，伊诺珠单抗奥加明，TGuard 蛋白，布伦妥昔单抗维多汀，米维西单抗索拉维辛，Upifitamab 利索多汀，恩福单抗维多汀，塞托珠单抗格列宁，泰利苏单抗维多汀，图沙米单抗拉维坦辛，去甲状腺素瘤雷夫坦星，他卡西单抗泰德隆，淀粉样 $\beta/A4$ 蛋白，Jag1 蛋白，溶菌酶，iRGD 肽，胰岛素。

进一步地，所述蛋白和/或多肽中含巯基和二硫键；

所述方法为方法 5 或方法 6；

方法 5 包括以下步骤：先以含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应，然后加入糖基亚磺酸盐 a、氧化剂，进行第二步反应，得到糖基亚磺酸盐 a 修饰的蛋白和/或多肽；然后加入糖基亚磺酸盐 b、氧化剂，进行第三步反应，得到糖基亚磺酸盐 a 和糖基亚磺酸盐 b 修饰的蛋白和/或多肽；化合物 A 结构为 R_w-S-LG ，其中，LG 为离去基团， R_w 为烷基、芳基或杂芳基，或者 R_w 与 LG 连接成环；优选地，化合物 A 为



，其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基；

方法 6 包括以下步骤：先以含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐 a、氧化剂为原料在溶剂中进行第 (1) 步反应，得到糖基亚磺酸盐 a 修饰的蛋白和/或多肽；然后加入糖基亚磺酸盐 b、氧化剂，进行第 (2) 步反应，得到糖基亚磺酸盐 a 和糖基亚磺酸盐 b 修饰的蛋白和/或多肽；

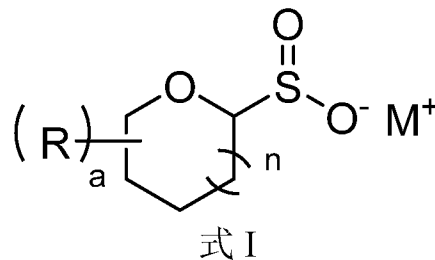
糖基亚磺酸盐 a 为上述的糖基亚磺酸盐，糖基亚磺酸盐 b 为上述的糖基亚磺酸盐，糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b 相同或不同；

进一步地, 方法 5 中, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b、第二步反应采用的氧化剂、第三步反应采用的氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (1-3): (1-3): (1-3): (1-3), 优选为 1:1.2:1.2:2:1.6:2; 和/或, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.001-0.01) mmol: 1mL, 优选为 0.005mmol: 1mL; 和/或, 所述第一步反应的时间为 5-20 分钟, 优选为 10 分钟; 所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时; 所述第三步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时;

方法 6 中, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b、第 (1) 步反应采用的氧化剂、第 (2) 步反应采用的氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (1-3): (1-3): (1-3), 优选为 1:1.2:2:1.6:2; 和/或, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.001-0.01) mmol: 1mL, 优选为 0.005mmol: 1mL; 和/或, 所述第 (1) 步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时; 所述第 (2) 步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时。

进一步地, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽选自氨基酸序列为 CCRGDKGPDC 的多肽、氨基酸序列为 SKDACIRTCVMCDEQ 的多肽、Sublancin 抗菌肽。

进一步地, 所述糖基亚磺酸盐的结构如式 I 所示:

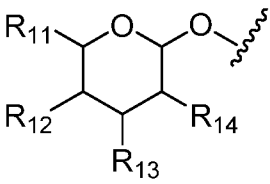
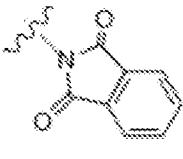
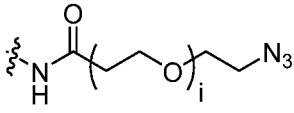


其中, n 选自 0 或 1;

a 选自 3 或 4;

R 各自独立地选自 L_1R_x ; 或者两个相邻的 R 连接成环, 另外的 R 各自独立地选自 L_1R_x , 所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的环;

L_1 选自无或 C_{1-2} 亚烷基, R_x 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、

NR_9R_{10} 、、Ph、氨基、、; i 选自 0-6 的整数;;

R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立地选自 L_2R_y ; L_2 选自无或 C_{1-2} 亚烷基, R_y 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、 NR_9R_{10} ;

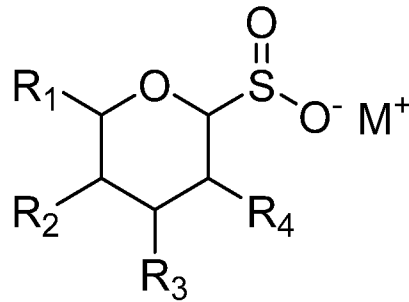
R_8 选自 C_{1-6} 烷基;

R_9 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn;

R_{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn;

M^+ 为一价阳离子。

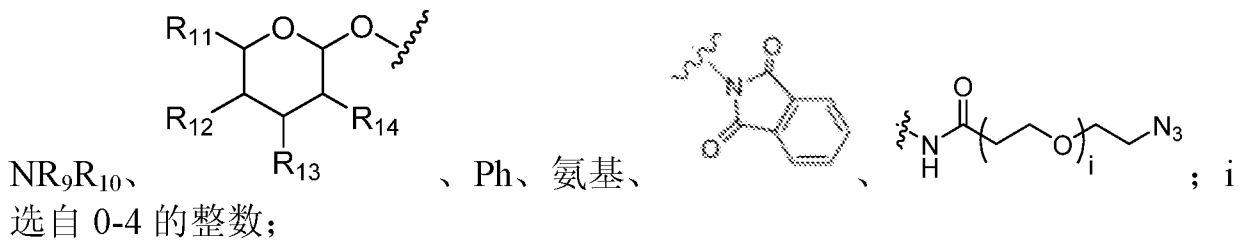
进一步地, 所述糖基亚硫酸盐的结构如式 II 所示:



式 II

其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 各自独立地选自 L_1R_x ; 或者 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 中两个相邻的基团连接成环, 另外两个基团各自独立地选自 L_1R_x , 所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的 5~6 元环;

L_1 选自无或亚甲基, R_x 选自氢、羟基、 C_{1-5} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、



选自 0-4 的整数;

R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立地选自 L_2R_y ; L_2 选自无或亚甲基, R_y 选自氢、羟基、 C_{1-5} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、 NR_9R_{10} ;

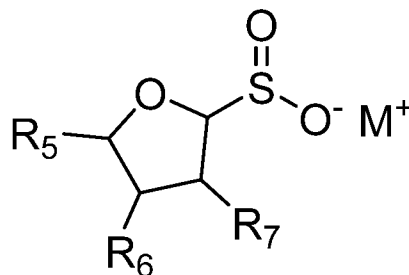
R_8 选自 C_{1-5} 烷基;

R_9 选自氢、 C_{1-5} 烷基、Ac、Bn;

R_{10} 选自氢、 C_{1-5} 烷基、Ac、Bn;

M^+ 为一价金属阳离子。

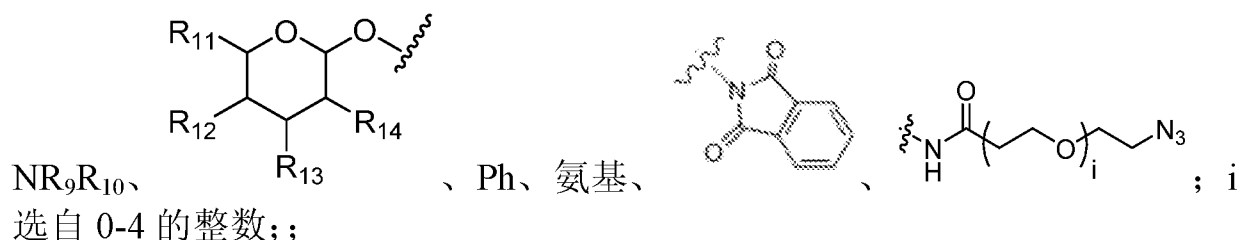
进一步地, 所述糖基亚硫酸盐的结构如式 III 所示:



式 III

其中, R_5 、 R_6 、 R_7 各自独立地选自 L_1R_x ; 或者 R_5 、 R_6 、 R_7 中两个相邻的基团连接成环, 另外一个基团为 L_1R_x , 所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的 5~6 元环;

L_1 选自无或亚甲基, R_x 选自氢、羟基、 C_{1-5} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、



R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄各自独立地选自L₂R_y；L₂选自无或亚甲基，R_y选自氢、羟基、C_{1~5}烷基、OAc、OBn、OR₈、NR₉R₁₀；

R₈选自C_{1~5}烷基;

R₉选自氢、C_{1~5}烷基、Ac、Bn;

R₁₀ 选自氢、C_{1~5} 烷基、Ac、Bn;

M^+ 为一价金属阳离子。

进一步地，所述 5~6 元环为 5~6 元饱和氧杂环；

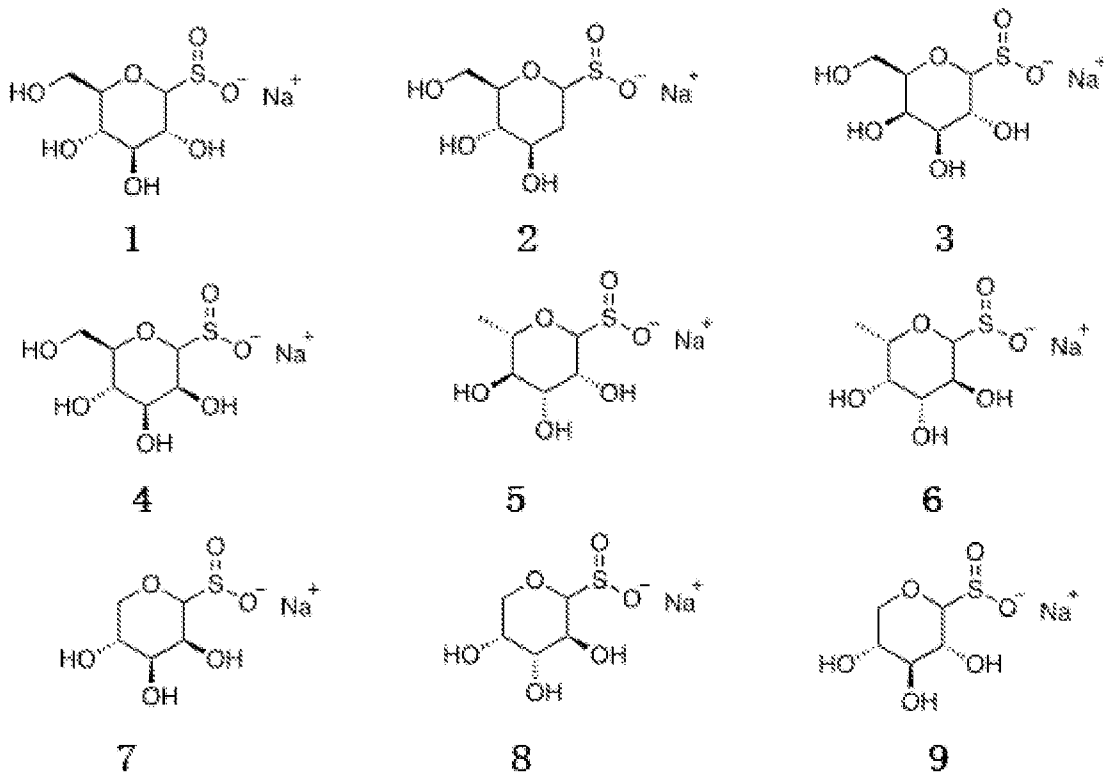
R₈选自C_{1~3}烷基;

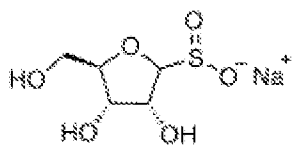
R₉选自氢、C_{1~3}烷基、Ac、Bn;

R₁₀ 选自氢、C_{1~3} 烷基、Ac、Bn;

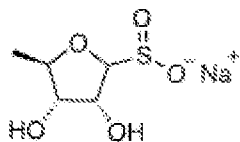
 M^+ 选自 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 。

进一步地，所述糖基亚磺酸盐的结构选自：

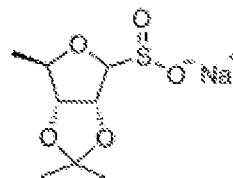




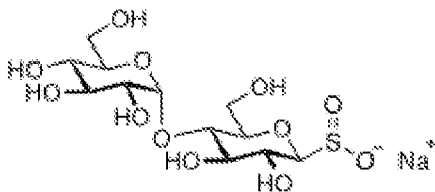
10



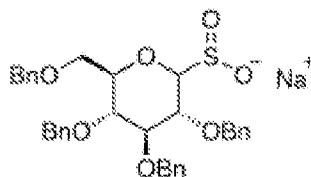
11



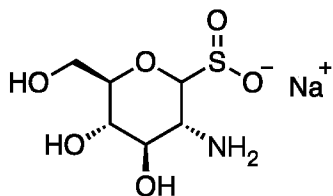
12



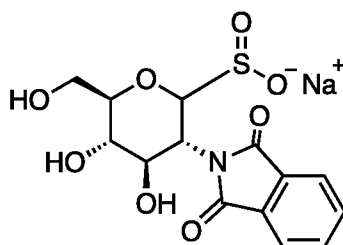
13



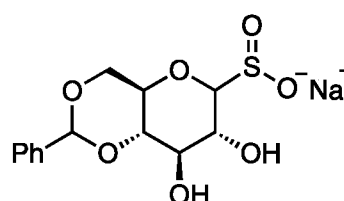
14



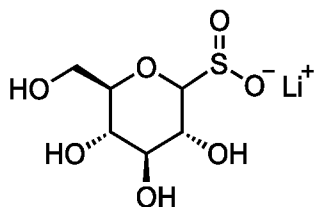
15



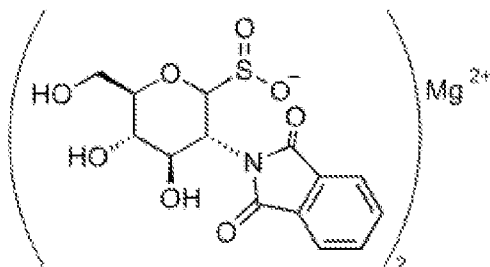
16



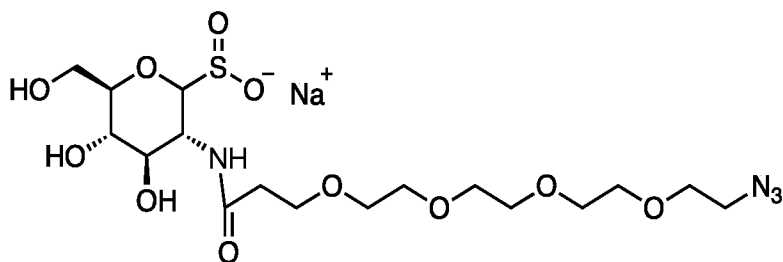
17



18



19



20

本发明还提供了上述方法制备得到的糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

关于本发明的使用术语的定义：除非另有说明，本文中术语提供的初始定义适用于整篇说明书的该术语；对于本文没有具体定义的术语，应该根据公开内容和上下文，给出本领域技术人员能够给予它们的含义。

蛋白质是一种大型生物分子，它由一个或多个由 α -氨基酸残基组成的长

链条组成。 α -氨基酸分子呈线性排列，相邻 α -氨基酸残基的羧基和氨基通过肽键连接在一起，最后经过折叠形成有功能的立体结构。蛋白质的 α -氨基酸序列是由对应基因所编码。除了遗传密码所编码的20种“标准”氨基酸，在蛋白质中，某些 α -氨基酸残基还可以被改变原子的排序而发生化学结构的变化，从而对蛋白质进行激活或调控。多个蛋白质和矿物质可以一起，往往是通过结合在一起形成稳定的蛋白质复合物，这样的大分子结构就像机械一样，来发挥某一特定功能。

多肽指的是由肽键连接的氨基酸短链。多肽属于生物聚合物和低聚物的广泛化学类别。多肽是天然存在的小生物分子，介于氨基酸和蛋白质之间的物质。氨基酸的分子量最小，蛋白质的分子量最大，而肽则是氨基酸单体组成的短链，由肽（酰胺）键连接。当一个氨基酸的羧基基团与另一个氨基酸的氨基反应时，形成该共价化学键。二胜肽（简称二肽），就是由二个氨基酸组成的蛋白质片段，两个或以上的氨基酸脱水缩合形成若干个肽键从而组成一个多肽，多个肽进行多级折叠就组成一个蛋白质分子。

抗体指的是指机体由于抗原的刺激而产生的具有保护作用的蛋白质。

Antibody 指一种人工修饰了末端氨基酸的抗体。

Mucin-1 蛋白指黏蛋白-1。

GTP 酶指三磷酸鸟苷酶。

非结构性蛋白指由病毒基因组编码的，在病毒复制或基因表达调控过程中具有一定功能，但最终并不结合生成成熟的病毒，不作为病毒结构一部分的蛋白。

淀粉样蛋白指当组织淀粉样变性时在组织内积聚的来自免疫球蛋白的糖蛋白。

氨基酸残基指由肽键连接的氨基酸失水后剩余部分。组成蛋白质或多肽的氨基酸在相互结合时，由于其部分基团参与了肽键的形成而失去一分子水，因此把多肽中的氨基酸单位称为氨基酸残基。

巯基指-SH，可以是来自半胱氨酸上的巯基；二硫键指-S-S-，可以是两个半胱氨酸以共价键连接形成的二硫键。

本发明以糖基亚磺酸盐为原料，提供了一种对蛋白质和/或多肽进行糖基化修饰的新方法，该方法反应原料易得，反应条件温和，反应耗时较短，反应过程可控，所得糖基化修饰的蛋白和/或多肽收率高，纯度高。

本发明的糖基化修饰方法不仅适用于含二硫键的蛋白质和/或多肽，还适用于含巯基的蛋白质和/或多肽，甚至适用于同时含二硫键和巯基的蛋白质和/或多肽，应用前景广阔。

本发明首次发现，利用本发明的方法对同时含二硫键和巯基的蛋白质和/或多肽进行糖基化修饰时，糖基化基团先修饰蛋白质和/或多肽中的巯基，再修饰蛋白质和/或多肽中的二硫键。本发明的方法能够对同时含二硫键和巯基的蛋白质和/或多肽进行过程可控的、多种糖基化修饰，应用前景广阔。

显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，

在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

图1为本发明糖基化修饰蛋白质和/或多肽的方法的反应过程示意图。

图2为实施例1所得抗体偶联化合物的质量表征图谱。

图 3 为实施例 2 所得抗体偶联化合物的质量表征图谱。

图 4 为实施例 5 所得一号位巯基木糖基单一取代的多肽的质量表征图谱。

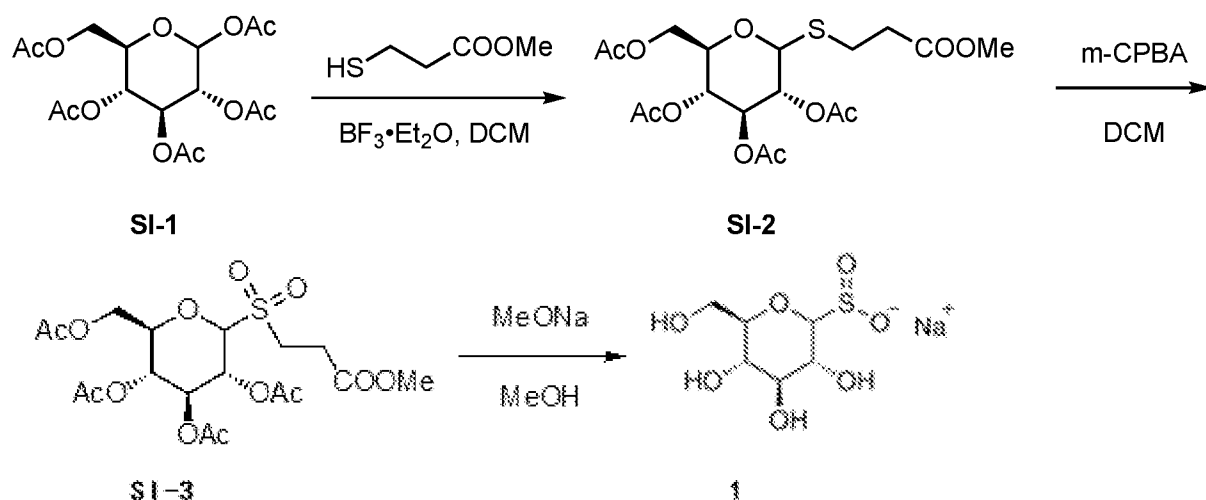
图 5 为实施例 5 所得一号位木糖基取代, 二号位和九号位葡萄糖基取代的多肽的质量表征图谱。

具体实施方式

本发明所用原料与设备均为已知产品，通过购买市售产品所得。

按照以下方法制备糖基亚磺酸盐:

(一) 制备糖基亚磺酸盐 1



具体操作为:

步骤 1: 向含有 **SI-1** (3.9 g, 10 mmol, 1.0 equiv) 和 25 mL CH_2Cl_2 的 100 mL 圆底烧瓶中依次加入 3-巯基丙酸甲酯 (1.3 mL, 12 mmol, 1.2 equiv) 和 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.5 mL, 20 mmol, 2.0 equiv)。将反应溶液在室温下搅拌 1 h, 直至 TLC 监测显示 **SI-1** 完全消耗后用饱和 NaHCO_3 溶液水洗至中性。分离得有机层, 并用盐水洗涤、无水硫酸钠干燥后浓缩, 得到 **SI-2**, 无需纯化直接用于下一步骤。

步骤 2:将 **SI-2** 溶解在 20 mL CH_2Cl_2 中并在 0°C 下冷却。在搅拌条件下将 *m*-CPBA(间氯过氧苯甲酸, 6 g, 30 mmol, 3 equiv)缓慢加入到反应溶液中。混合溶液于室温条件下搅拌 1 小时后过滤, 滤液用饱和 NaHCO_3 溶液洗至中性, 无水硫酸钠干燥、浓缩, 加入甲基叔丁基醚, 析出固体, 过滤得到白色固体 **SI-3**。

步骤 3: 在 0°C 下将 **SI-3** 溶解在 20mL MeOH 中, 向其中加入 MeONa(540 mg, 10 mmol, 1.0 equiv), 在 0°C 下搅拌 2 小时, TLC 监测显示 **SI-3** 完全消耗后浓缩。用无水乙醇洗涤并过滤得到白色固体, 即糖基亚磺酸盐 **1**。三步总收率为 85%。

(二) 制备糖基亚磺酸盐 **2-20**

参照上述糖基亚磺酸钠 **1** 的制备方法, 区别仅在于将原料 **SI-1** 替换为对应的原料, 分别制备得到糖基亚磺酸盐 2-20。

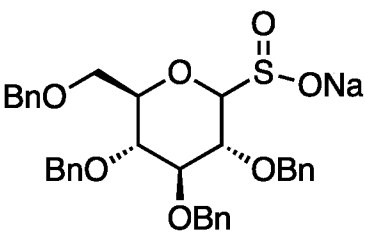
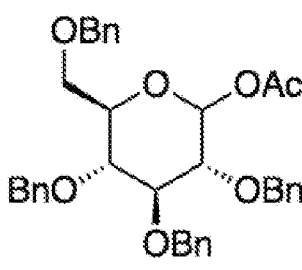
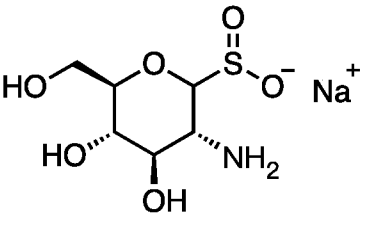
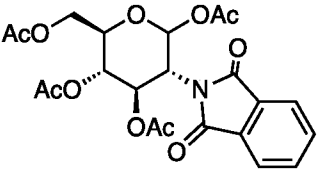
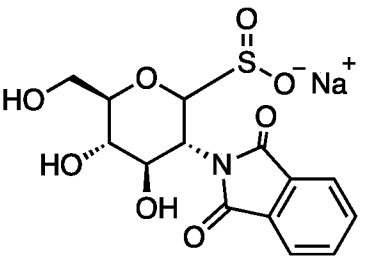
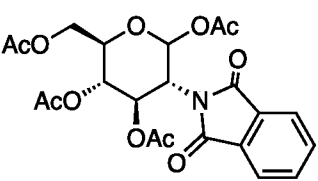
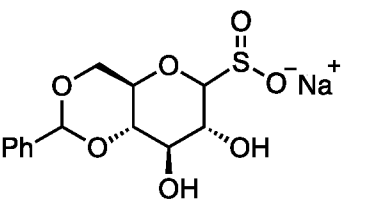
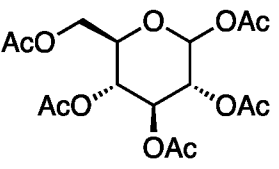
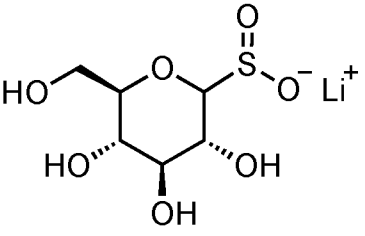
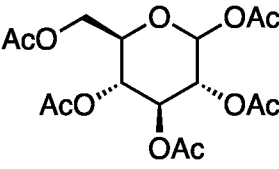
糖基亚磺酸盐 1-20 的结构和表征见表 1。糖基亚磺酸盐 1-20 的三步总收率和纯度见表 2。

表 1. 糖基亚磺酸盐 1-20 的结构和表征

编号	结构	与 SI-1 对应的原料	结构表征
1			$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 3.85 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 12.0, 5.2 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 3.35 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.30 (d, J = 5.3 Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ 92.68, 79.99, 77.10, 69.76, 69.16, 60.94.
2			$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ 96.29, 76.96, 70.67, 68.55, 60.78, 31.38.
3			$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 3.99 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.83 (dd, J = 11.7, 7.7 Hz, 1H), 3.78 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.66 – 3.60 (m, 1H), 3.58 (q, J = 3.9 Hz, 1H), 3.53 (dd, J = 9.4, 3.4 Hz, 1H), 3.34 (d, J = 3.5 Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ 93.72, 79.49, 73.96, 69.08, 67.06, 61.60.

4			¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.22 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 3.78 (m, 2H), 3.71 – 3.62 (m, 3H), 3.50 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 100.65, 77.55, 71.25, 67.94, 66.20, 61.06
5			¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.33 – 4.29 (m, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 1H), 3.85 – 3.76 (m, 2H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 1.31 (d, <i>J</i> = 6.1, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 90.32, 71.66, 69.90, 68.21, 57.41, 16.76.
6			¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.86 – 3.80 (m, 1H), 3.72 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 3.62 (dt, <i>J</i> = 10.6, 2.9 Hz, 1H), 3.56 (td, <i>J</i> = 7.1, 1.9 Hz, 1H), 3.39 (dd, <i>J</i> = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 1.22 – 1.17 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 93.75, 75.19, 74.10, 71.61, 66.57, 16.78.
7			¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 99.50, 73.85, 70.79, 69.85, 68.38.
8			Mixture of a and b ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.37 (td, <i>J</i> = 3.9, 1.3 Hz, 0.5 H), 4.03 – 3.83 (m, 3H), 3.75 – 3.54 (m, 2.5H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 96.71, 72.41, 71.81, 70.31, 68.44.
9			¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.98 (dd, <i>J</i> = 11.1, 5.3 Hz, 1H), 3.60 (t, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 3.52 (td, <i>J</i> = 9.7, 5.2 Hz,

			1H), 3.42 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 93.61, 77.12, 69.54, 69.15, 68.86.
10			Mixture of and ^1H NMR (400 MHz, D_2O) NMR (400dd, $J = 4.7, 2.2$ Hz, 0.5H), 4.18 – 4.07 (m, 0.5H), 4.01–3.91 (m, 1H), 3.80 07 (m, z, , 1H), 3.66 07 (m, z, , 2H), 2.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 0.5H). ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 102.09, 83.05, 71.29, 70.67, 61.67.
11			^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 4.28 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.96 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.81 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 3.73 – 3.65 (m, 1H), 1.21 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 101.85, 78.88, 76.35, 70.51, 17.67.
12			^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.01 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 4.4, 1.7$ Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.15 (d, $J = 5.1$ Hz, 3H).
13			^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 5.32 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.81 – 3.44 (m, 11H), 3.33 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 99.67, 92.47, 78.56, 77.51, 76.44, 72.83, 72.66, 71.73, 69.62, 69.30, 60.94, 60.43.

14			¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 7.41 – 7.19 (m, 18H), 7.16 – 7.19 (m, DMSO-d ₄ 9.0 – 4.74 (m, 2H), 4.71 – 4.74 (m, 2H) O-4.56 – 4.39 (m, 5H), 4.30 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.74 – 3.60 (m, 1H), 3.61-3.51 (m, 3H), 3.46 – 9.9 Hz, 1H1H).
15			¹ H NMR (400 MHz, D ₂ O) δ 3.92 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.76 (dd, J = 12.5, 4.9 Hz, 1H), 3.71 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.68 – 3.60 (m, 1H), 3.48 (ddd, J = 22.8, 17.9, 9.0 Hz, 2H), 3.39 – 3.31 (m, 1H).
16			¹ H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.84 (s, 2H), 7.77 (dd, J = 5.5, 3.1 Hz, 2H), 4.29 (dd, J = 6.7, 2.8 Hz, 2H), 4.13 (dd, J = 7.2, 3.3 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 12.1, 2.1 Hz, 1H), 3.73 – 3.67 (m, 1H), 3.46 (ddd, J = 9.3, 6.7, 2.2 Hz, 1H), 3.34 (s, 1H).
17			¹ H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.48 (dd, J = 6.8, 3.1 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.40 – 7.39 (m, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.31 (td, 1H), 3.82 (t, J = 10.2 Hz, 1H), 3.78 – 3.72 (m, 2H), 3.60 (dq, J = 9.3, 7.8, 7.3, 3.6 Hz, 3H).
18			¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 3.85 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 12.0, 5.2 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 3.35 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.30 (d, J = 5.3

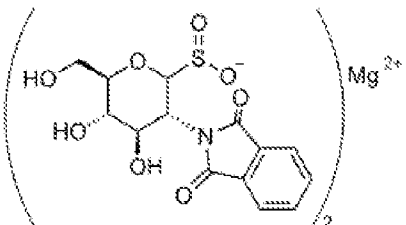
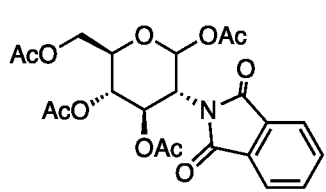
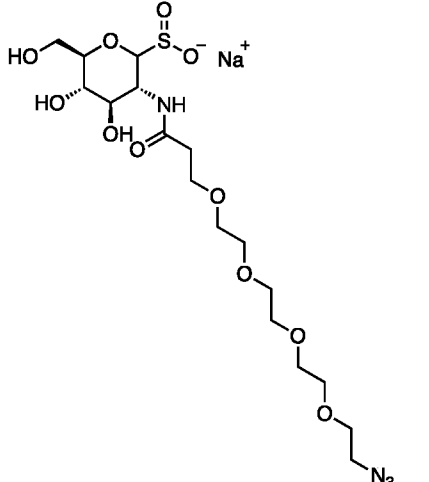
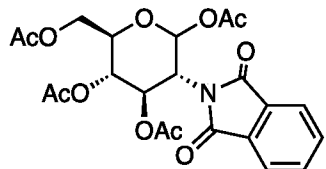
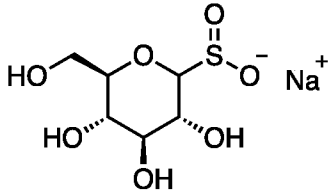
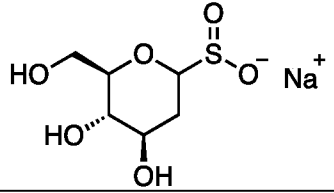
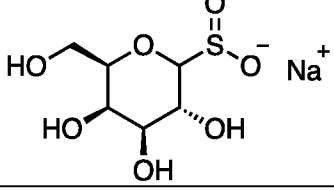
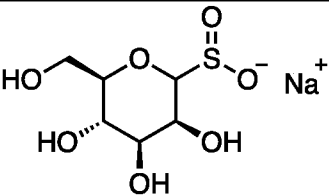
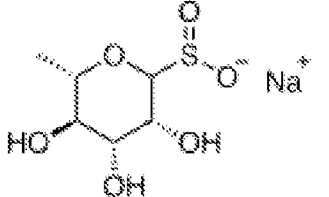
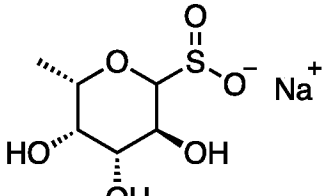
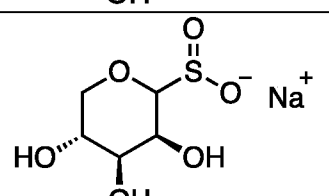
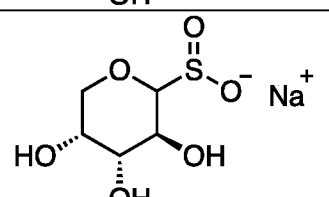
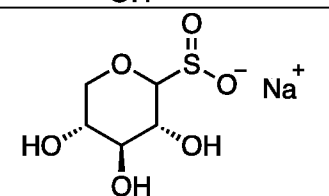
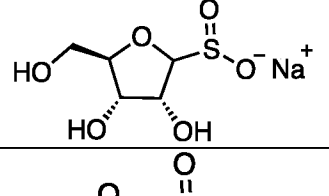
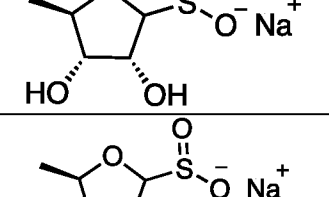
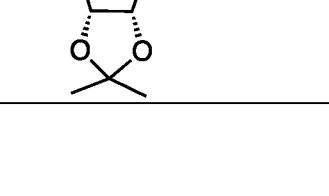
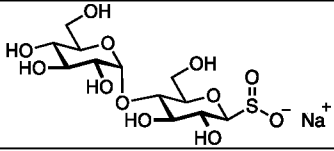
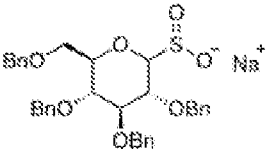
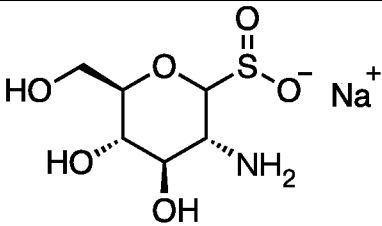
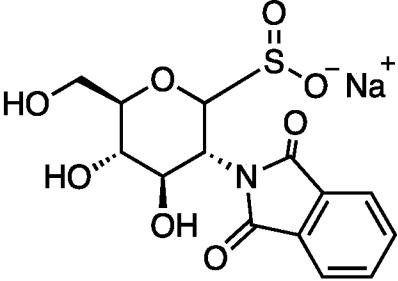
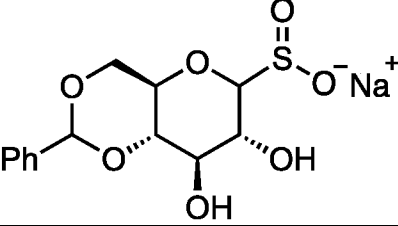
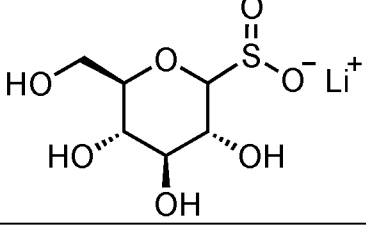
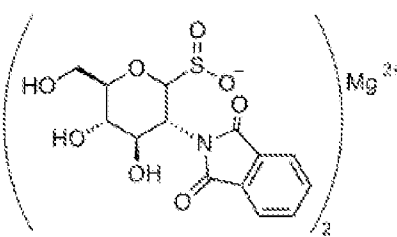
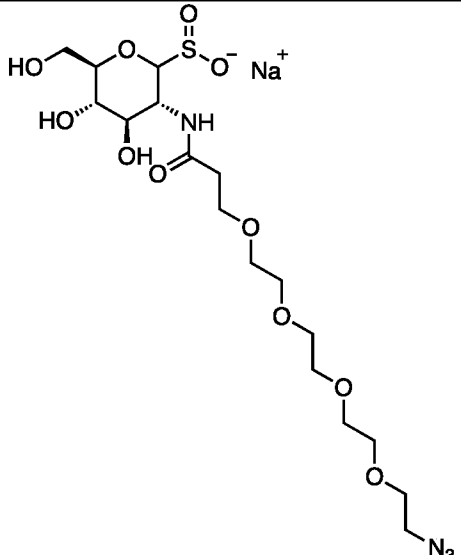
			Hz, 2H)
19			¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD) δ 7.83 – 7.76 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 2H), 4.16 (t, <i>J</i> = 10.3 Hz, 1H), 3.90 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz, 1H), 3.79 – 3.75 (m, 1H), 3.74 – 3.67 (m, 1H), 3.36 – 3.32 (m, 1H).
20			¹ H NMR (400 MHz, D ₂ O) δ 3.94 (t, <i>J</i> = 10.3 Hz, 2H), 3.86 – 3.76 (m, 3H), 3.76 – 3.67 (m, 14H), 3.61 (d, <i>J</i> = 10.6 Hz, 2H), 3.54 – 3.50 (m, 2H), 3.49 – 3.42 (m, 2H), 2.58 (t, <i>J</i> = 6.2 Hz, 2H).

表 2. 糖基亚硫酸盐 1-20 的三步总收率和终产物纯度

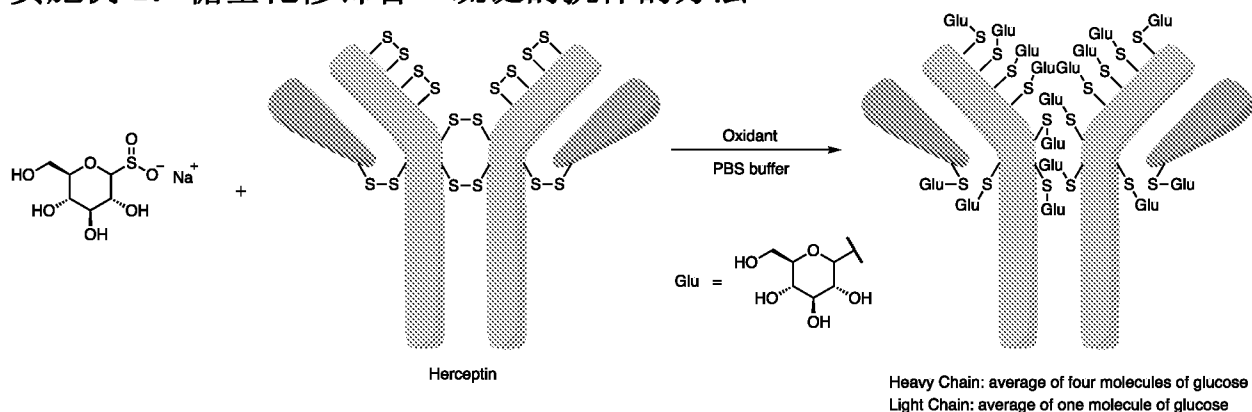
编号	结构	三步总收率	纯度
1		85%	99%
2		77%	95%
3		87%	98%

4		75%	98%
5		67%	90%
6		70%	90%
7		70%	90%
8		70%	90%
9		70%	90%
10		65%	85%
11		85%	95%
12		60%	90%

13	 A disaccharide derivative consisting of a glucose unit linked to a fructose unit via a 1-2 glycosidic bond. The fructose unit has a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Na ⁺) at the C5 position.	75%	95%
14	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Na ⁺) at the C5 position. The other hydroxyl groups are protected with benzyl (Bn) or benzylidene (OBn) groups.	85%	98%
15	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Na ⁺) at the C5 position and an amino group (-NH ₂) at the C2 position.	82%	98%
16	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Na ⁺) at the C5 position and a benzimidazole group at the C2 position.	85%	98%
17	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Na ⁺) at the C5 position and a phenyl group (-Ph) at the C2 position.	70%	97%
18	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻ Li ⁺) at the C5 position.	85%	98%
19	 A disaccharide derivative with a sulfonate group (-SO ₃ ⁻) at the C5 position and a benzimidazole group at the C2 position. The structure is shown as a magnesium salt, with Mg ²⁺ and a subscript 2 indicating the stoichiometry.	70%	85%

20		57%	98%
----	---	-----	-----

实施例 1：糖基化修饰含二硫键的抗体的方法



按照上述路线对抗体进行糖基化修饰，合成抗体偶联化合物，具体操作为：将糖基亚磺酸钠（4 μmol ）、来自罗氏制药的含有二硫键的赫赛汀抗体（0.01 μmol ），过氧叔丁醇（4 μmol ）和 PBS buffer 溶液（0.1 mL）称量装至螺旋盖小瓶中混合，小瓶中充满 N_2 ，并用特氟龙衬里的盖子密封。室温静置 1 小时，反应结束。

将反应液用半透膜（截留分子量为 3 kDa）分离，得到抗体偶联化合物。单一 α 构型，收率 95%，纯度大于 98%。经一级质谱以及二级质谱分析，抗体偶联化合物平均每条重链上接有四个葡萄糖分子，平均每条轻链上接有一个葡萄糖分子。

序列表征如下：

重链(平均每条重链上有四个葡萄糖分子)：

EVQLVESGGGLVQPGGSLR+LSCAASGFNIK+DTYIHWVR+QAPGK+GLEWVAR+IYPTNGYTR+YADSVK+GR+FTISADTSK+NTAYLQMNSLR+AEDTAVYYC(-Glu)SR+WGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTK+GPSVFPLAPSSK+STSGGTAALGC(-Glu)LVK+DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK+PSNTK+VDK+K+VEPK+SCDK+THTC(-Glu)PPC(-Glu)PAPELLGGPSVFLFPPK+PK+DTLMISR+TPEVT

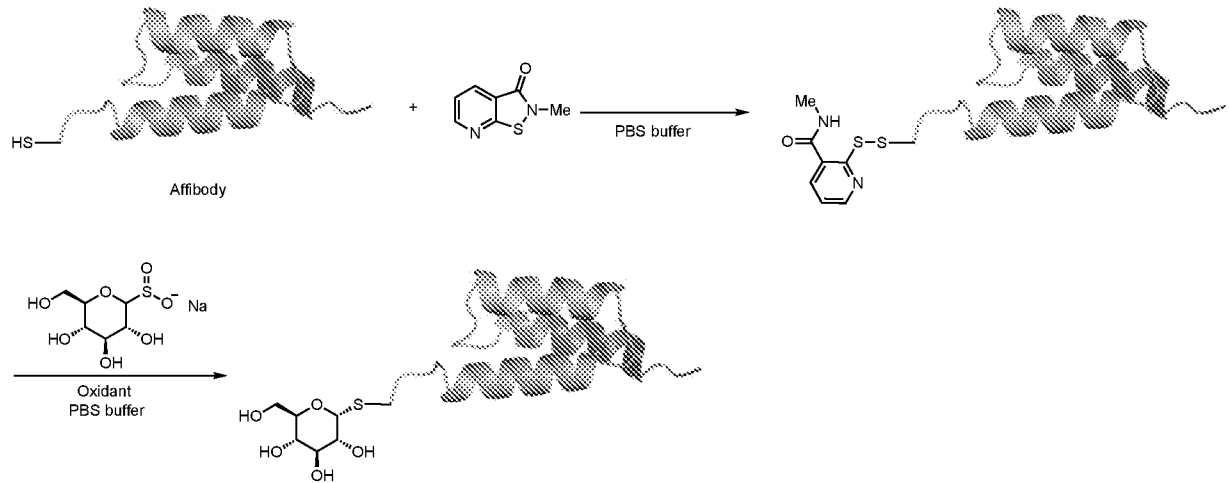
CVVVVDVSHEDPEVK+FNWYVDGVEVHNAK+TK+PR+EEQYNSTYR+VVS
VLTVLHQDWLNGK+EYK+CK+VSNK+ALPAPIEK+TISK+AK+GQPR+EPQ
VYTLPPSR+EEMTK+NQVSLTCLVK+GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK+TT
PPVLDSDGSSFFLYSK+LTVDK+SR+WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK+S
LSLSPG (SEQ ID NO.1)。

轻链 (平均每条轻链上有一个葡萄糖分子)：

DIQMTQSPSSLSASVGDR+VTITCR+ASQDVNTAVAWYQQK+PGK+A
PK+LLIYSASFLYSGVPSR+FSGSR+SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYT
TPPTFGQGTK+VEIK+R+TVAAPSVFIFPPSDEQLK+SGTASVVCLLNNFYP
R+EAK+VQWK+VDNALQSGNSQESVTEQDSK+DSTYLSSTLTLSK+ADY
EK+HK+VYACEVTHQGLSPVTK+SFNR+GEC(-Glu) (SEQ ID NO.2)。

质量表征如图 2 所示。

实施例 2：糖基化修饰含巯基的 Affibody 的方法



1. 制备含有巯基的 Affibody

将核苷酸序列为 5'-ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCGAAAACC
TGTATTTTCAGGGCCATATGGTTGATAACAAATTTAACAAAGAAATGC
GCAACGCATATTGGGAAATTGCACTGCTGCCGAATCTGAATAATCAGC
AGAAACGTGCGTTTATTCGTAGCCTGTATGATGATCCGAGTCAGAGCG
CAAACCTGCTGGCAGAAGCAAAAAAACTGAATGATGCACAGGCACCG
AAATGCtaG-3' (SEQ ID NO.3) 的基因片段嵌入大肠杆菌的质粒，表达含有巯基的 Affibody。然后进行蛋白免疫印迹 (Western Blot) 曝光，菌体重悬，超声破碎，分离上清液，先经镍柱亲和层析 (过程中用 binding Buffer 冲洗，binding Buffer 组成如下：50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 7.4)，然后经蛋白凝胶柱层析，用 100 mL wash buffer 持续洗脱 (wash buffer 组成如下：50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole (咪唑)，pH = 7.4)，收集洗脱液，浓缩，获得纯化的含有巯基的 Affibody，其序列为：

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMVDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQQ
KRAFIRSLYDDP SQSANLLAEAKKLNDAPKC (SEQ ID NO.4)。

2.糖基化修饰含有巯基的 Affibody

先将含有巯基的 Affibody (0.01 μ mol) 与 2-甲基异噻唑并[4,5-*b*]吡啶-3(2*H*)-酮 (2 μ mol) 和 PBS buffer 溶液(0.1 mL)在螺旋盖小瓶中混合, 室温静置 10 分钟后, 将糖基亚磺酸钠 (4 μ mol)、过氧叔丁醇 (4 μ mol) 称量装至螺旋盖小瓶中混合, 小瓶中充满 N₂, 并用特氟龙衬里的盖子密封。室温静置 1 小时, 反应结束。

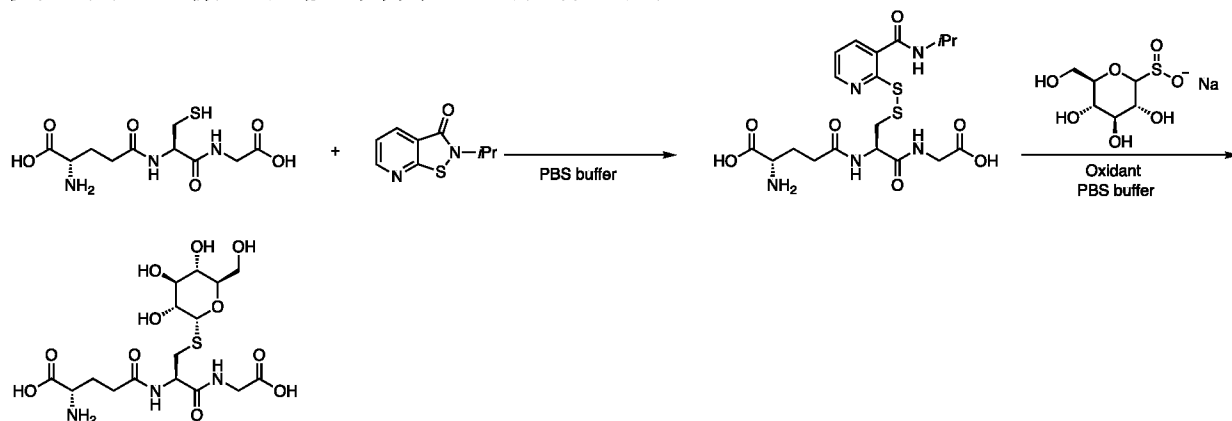
将反应液用半透膜分离 (截留分子量为 3 kDa), 得到抗体偶联化合物。单一 α 构型, 收率 95%, 纯度大于 98%。

序列表征如下:

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMVDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQQ
KRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAPKC(-Glu) (SEQ ID NO.5)。

质量表征如下: [M+11H]/11 = 853.2606 (参见图 3)。

实施例 3: 糖基化修饰含巯基的多肽的方法 1



按照上述路线糖基化修饰多肽, 合成多肽偶联化合物, 具体操作为: 先将含巯基的还原型谷胱甘肽 (0.01 mmol) 与 2-异丙基异噻唑并[4,5-*b*]吡啶-3(2*H*)-酮 (0.03 mmol) 和 PBS buffer(1 mL)混合, 室温静置 10 分钟后, 将糖基亚磺酸钠 (0.06 mmol)、过氧叔丁醇 (0.06 mmol) 称量装至螺旋盖小瓶中混合, 小瓶中充满 N₂, 并用特氟龙衬里的盖子密封。室温静置 1 小时, 反应结束。

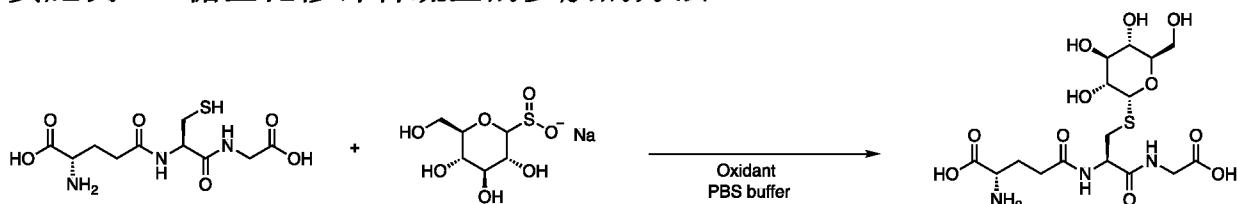
将反应液经反相柱分离 (梯度洗脱, 洗脱剂为乙腈与水的混合溶液, 其中乙腈的体积百分数为 5%-95%), 得到多肽偶联化合物。单一 α 构型, 收率 95%, 纯度大于 98%。结构表征如下:

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.50 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.64 (dd, *J* = 8.3, 5.1 Hz, 1H), 4.04 – 3.94 (m, 4H), 3.87 – 3.77 (m, 3H), 3.55 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.44 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.16 – 3.04 (m, 2H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.27 – 2.19 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 174.42, 172.94, 172.69, 172.21, 87.10, 73.47, 72.53, 70.91, 69.36, 60.28, 53.92, 52.72, 41.12, 32.44, 30.99, 25.63.

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -75.61.

实施例 4：糖基化修饰含巯基的多肽的方法 2



按照上述路线糖基化修饰多肽，合成多肽偶联化合物，具体操作为：将含巯基的还原型谷胱甘肽（0.01 mmol）、糖基亚磺酸钠（0.06 mmol）、过氧叔丁醇（0.06 mmol）和 PBS buffer(1 mL)称量装至螺旋盖小瓶中混合，小瓶中充满 N_2 ，并用特氟龙衬里的盖子密封。室温静置 1 小时，反应结束。

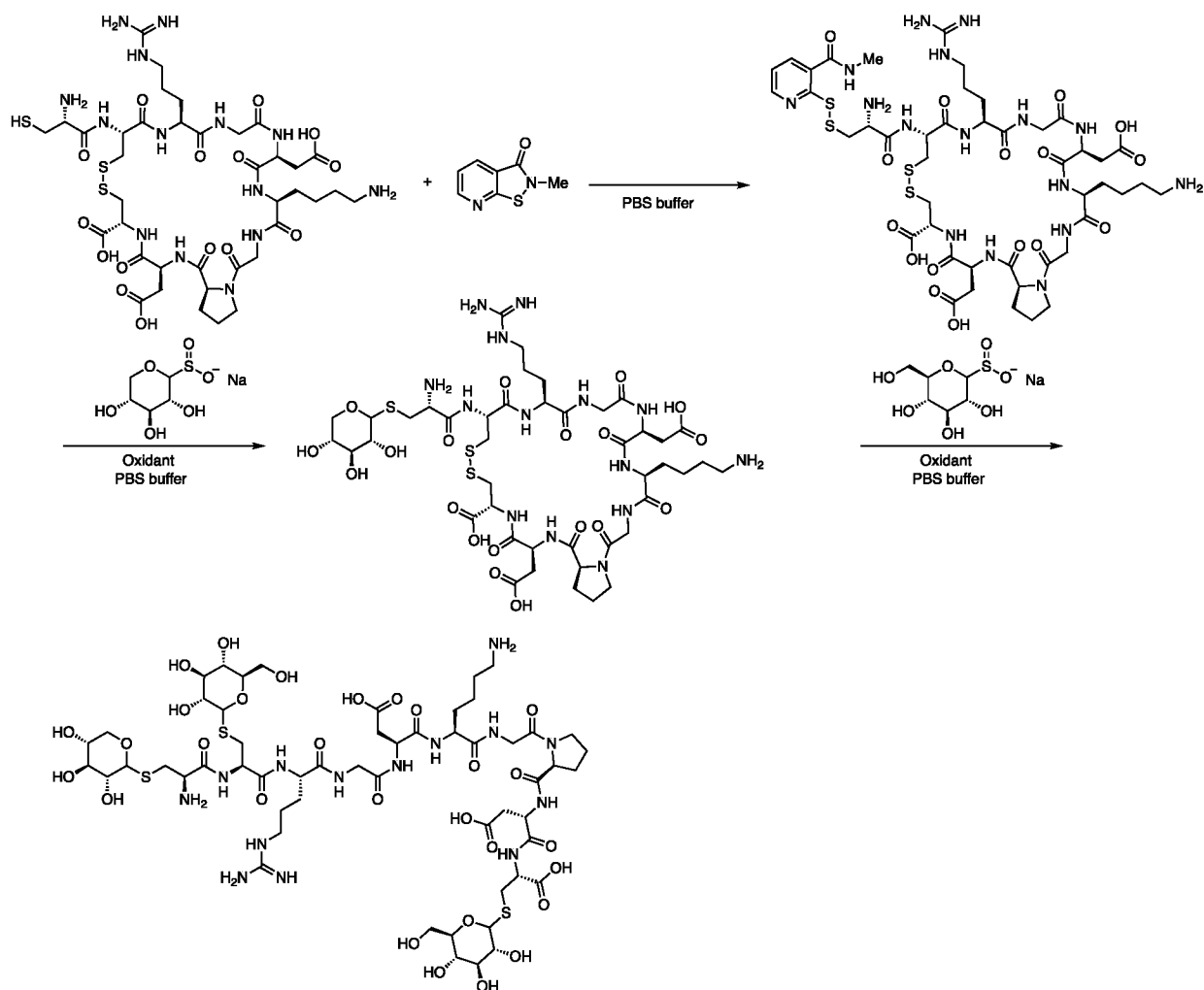
将反应液经反相柱分离（梯度洗脱，洗脱剂为乙腈与水的混合溶液，其中乙腈的体积百分数为 5%-95%），得到多肽偶联化合物。单一 α 构型，收率 50%，纯度大于 98%。结构表征如下：

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 5.50 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.64 (dd, $J = 8.3, 5.1$ Hz, 1H), 4.04 – 3.94 (m, 4H), 3.87 – 3.77 (m, 3H), 3.55 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.44 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.16 – 3.04 (m, 2H), 2.64 – 2.54 (m, 2H), 2.27 – 2.19 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 174.42, 172.94, 172.69, 172.21, 87.10, 73.47, 72.53, 70.91, 69.36, 60.28, 53.92, 52.72, 41.12, 32.44, 30.99, 25.63.

^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) δ -75.61.

实施例 5：一锅两步法制备不同糖基化修饰的多肽偶联物



按照上述路线进行不同糖基化修饰，合成多肽偶联化合物，具体操作为：先将既含巯基又含二硫键的多肽（该多肽序列为 CCRGDKGPDC（SEQ ID NO.6，二号位与九号位的半胱氨酸形成二硫键），0.005 mmol）与 2-甲基异噻唑并[4,5-*b*]吡啶-3(2*H*)-酮（0.006 mmol）和水(1 mL)混合，室温静置 10 分钟后，将木糖基亚磺酸钠（0.006 mmol）、过氧叔丁醇（0.008 mmol）称量装至螺旋盖小瓶中混合，小瓶中充满 N₂，并用特氟龙衬里的盖子密封。室温静置 1 小时，反应结束，得到一号位巯基木糖基单一取代的多肽。再将葡萄糖基亚磺酸钠（0.01 mmol），过氧叔丁醇（0.01 mmol）称量装至同一小瓶中混合，小瓶中充满 N₂，并用特氟龙衬里的盖子密封。将混合物在室温搅拌 1 小时，反应结束。

将反应液经反相柱分离（梯度洗脱，洗脱剂为乙腈与水的混合溶液，其中乙腈的体积百分数为 5%-95%），得到一号位木糖基取代，二号位和九号位葡萄糖基取代的多肽。单一 α 构型，收率 95%，纯度大于 98%。

一号位巯基木糖基单一取代的多肽：

序列表征如下：

C(-Xyl)CCRGDKGPDC(（SEQ ID NO.7，二号位与九号位的 C 形成二硫键）)；

质量表征如下： $[M+2H]/2 = 592.5524$ （参见图 4）。
一号位木糖基取代，二号位和九号位葡萄糖基取代的多肽：
序列表征如下：
C(-Xyl)C(-Glu)RGDKGPDC(-Glu)（SEQ ID NO.8）；
质量表征如下： $[M+2H]/2 = 755.7004$ （参见图 5）。

综上，本发明提供了一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法，属于药物化学技术领域。本发明以糖基亚磺酸盐为原料，提供了一种对蛋白质和/或多肽进行糖基化修饰的方法，该方法反应原料易得，反应条件温和，反应耗时较短，反应过程可控，所得糖基化修饰的蛋白和/或多肽收率高，纯度高。本发明的糖基化修饰方法不仅适用于含二硫键的蛋白质和/或多肽，还适用于含巯基的蛋白质和/或多肽，甚至适用于同时含二硫键和巯基的蛋白质和/或多肽，应用前景广阔。

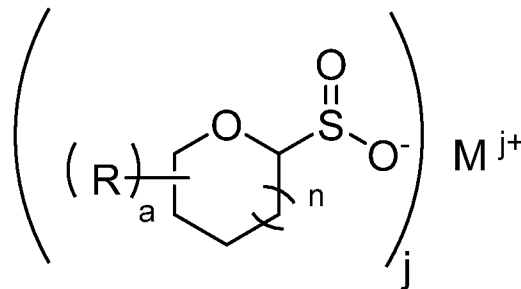
权 利 要 求 书

1.一种蛋白和/或多肽糖基化修饰的方法，其特征在于：所述方法包括以下步骤：

以包括糖基亚磺酸盐、蛋白和/或多肽、氧化剂在内的物质为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；

其中，所述蛋白和/或多肽中含巯基和/或二硫键；

所述糖基亚磺酸盐的结构如式 W 所示：



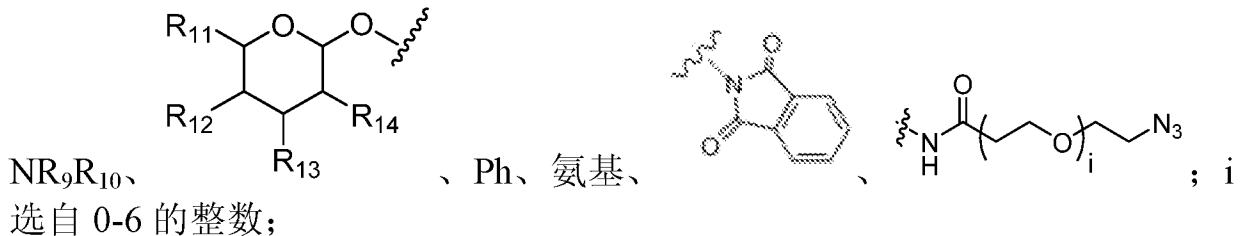
式 W

其中，n 选自 0 或 1；

a 选自 3 或 4；

R 各自独立地选自 L_1R_x ；或者两个相邻的 R 连接成环，另外的 R 各自独立地选自 L_1R_x ，所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的环；

L_1 选自无或 C_{1-2} 亚烷基， R_x 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、



选自 0-6 的整数；

R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立地选自 L_2R_y ； L_2 选自无或 C_{1-2} 亚烷基， R_y 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、 NR_9R_{10} ；

R_8 选自 C_{1-6} 烷基；

R_9 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn；

R_{10} 选自氢、 C_{1-6} 烷基、Ac、Bn；

j 为 1、2 或 3；

M^{j+} 为 j 价阳离子。

2.根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述氧化剂选自双氧水，过氧叔丁醇，过硫酸钾，氧气，叔丁基过氧化物中的一种或两种以上；

和/或，所述溶剂为水性溶液，优选为水或缓冲液；

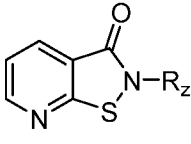
和/或，所述反应的温度为室温；

和/或，所述反应是在惰性气体氛围下进行的。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述蛋白和/或多肽中含巯基，蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 70-1000 个；

所述方法为方法 1 或方法 2；

方法 1 包括以下步骤：先以含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应，然后加入糖基亚磺酸盐、氧化剂，进行第二步反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；化合物 A 为 R_w-S-LG ，其中，LG 为离去基团， R_w 为烷基、芳基或杂芳基，或者 R_w 与 LG 连接成环；优选地，化合

物 A 为 , 其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基；

方法 2 包括以下步骤：以含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：方法 1 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (10-300): (20-600): (20-600)，优选为 1:200:400:400；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μmol : 1mL，优选为 0.1 μmol : 1mL；和/或，所述第一步反应的时间为 1-20 分钟，优选为 10 分钟；所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时；

方法 2 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (20-600): (20-600)，优选为 1:400:400；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μmol : 1mL，优选为 0.1 μmol : 1mL；和/或，所述反应的时间为 0.2-1.5 小时，优选为 1 小时。

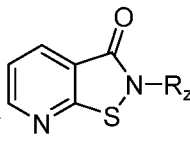
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于：所述含巯基的蛋白和/或多肽选自含巯基的 Affibody，Mucin 1 蛋白，GTP 酶，含巯基的非结构性蛋白，含巯基的淀粉样蛋白；

优选地，所述含巯基的 Affibody 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：所述蛋白和/或多肽中含巯基，蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 1-100 个；

所述方法为方法 3 或方法 4；

方法 3 包括以下步骤：先以含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应，然后加入糖基亚磺酸盐、氧化剂，进行第二步反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽；化合物 A 结构为 R_w-S-LG ，其中，LG 为离去基团， R_w 为烷基、芳基或杂芳基，或者 R_w 与 LG 连接成环；优选地，

化合物 A 为 , 其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基，优选为 C_{1-3} 烷基；

方法 4 包括以下步骤：以含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂为原料在溶剂中反应，得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：方法 3 中，所述含巯基的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (3-10): (3-10)，优选为 1:3:6:6；和/或，所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例

为 (0.01-0.2) mmol: 1mL, 优选为 0.01mmol: 1mL; 和/或, 所述第一步反应的时间为 1-20 分钟, 优选为 10 分钟; 所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时;

方法 4 中, 所述含巯基的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (3-10): (3-10), 优选为 1: 6:6; 和/或, 所述含巯基的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.01-0.2) mmol: 1mL, 优选为 0.01mmol: 1mL; 和/或, 所述反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其特征在于: 所述含巯基的蛋白和/或多肽选自 α V β 3 整合素结合肽, 细胞穿透肽-R8, 还原型谷胱甘肽。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于: 所述蛋白和/或多肽中含二硫键, 蛋白和/或多肽中的氨基酸残基个数为 2-2000 个;

所述方法包括以下步骤: 将糖基亚磺酸盐、含二硫键的蛋白和/或多肽、氧化剂在溶剂中反应, 得到糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于: 所述含二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐、氧化剂的摩尔比为 1: (60-600): (20-600), 优选为 1:400:400;

和/或, 所述含二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.05-0.5) μ mol: 1mL, 优选为 0.1 μ mol: 1mL;

和/或, 所述反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 0.5-1 小时。

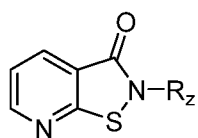
11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法, 其特征在于: 所述含二硫键的蛋白和/或多肽选自赫赛汀, 伊诺珠单抗奥加明, TGuard 蛋白, 布伦妥昔单抗维多汀, 米维西单抗索拉维辛, Upifitamab 利索多汀, 恩福单抗维多汀, 塞托珠单抗格列宁, 泰利苏单抗维多汀, 图沙米特单抗拉维坦辛, 去甲状腺素瘤雷夫坦星, 他卡西单抗泰德隆, 淀粉样 β /A4 蛋白, Jag1 蛋白, 溶菌酶, iRGD 肽, 胰岛素。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于: 所述蛋白和/或多肽中含巯基和二硫键;

所述方法为方法 5 或方法 6;

方法 5 包括以下步骤: 先以含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、化合物 A 为原料在溶剂中进行第一步反应, 然后加入糖基亚磺酸盐 a、氧化剂, 进行第二步反应, 得到糖基亚磺酸盐 a 修饰的蛋白和/或多肽; 然后加入糖基亚磺酸盐 b、氧化剂, 进行第三步反应, 得到糖基亚磺酸盐 a 和糖基亚磺酸盐 b

修饰的蛋白和/或多肽; 化合物 A 结构为 R_w-S-LG , 其中, LG 为离去基团, R_w 为烷基、芳基或杂芳基, 或者 R_w 与 LG 连接成环; 优选地, 化合物 A 为



, 其中 R_z 为 C_{1-8} 烷基, 优选为 C_{1-3} 烷基;

方法 6 包括以下步骤: 先以含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺

酸盐 a、氧化剂为原料在溶剂中进行第 (1) 步反应, 得到糖基亚磺酸盐 a 修饰的蛋白和/或多肽; 然后加入糖基亚磺酸盐 b、氧化剂, 进行第 (2) 步反应, 得到糖基亚磺酸盐 a 和糖基亚磺酸盐 b 修饰的蛋白和/或多肽;

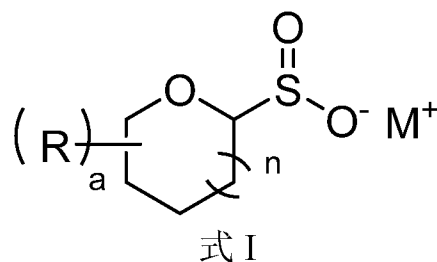
糖基亚磺酸盐 a 为权利要求 1 所述的糖基亚磺酸盐, 糖基亚磺酸盐 b 为权利要求 1 所述的糖基亚磺酸盐, 糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b 相同或不同;

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其特征在于: 方法 5 中, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、化合物 A、糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b、第二步反应采用的氧化剂、第三步反应采用的氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (1-3): (1-3): (1-3): (1-3), 优选为 1:1.2:1.2:2:1.6:2; 和/或, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.001-0.01) mmol: 1mL, 优选为 0.005mmol: 1mL; 和/或, 所述第一步反应的时间为 5-20 分钟, 优选为 10 分钟; 所述第二步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时; 所述第三步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时;

方法 6 中, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽、糖基亚磺酸盐 a、糖基亚磺酸盐 b、第 (1) 步反应采用的氧化剂、第 (2) 步反应采用的氧化剂的摩尔比为 1: (1-3): (1-3): (1-3): (1-3), 优选为 1:1.2:2:1.6:2; 和/或, 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽与溶剂的比例为 (0.001-0.01) mmol: 1mL, 优选为 0.005mmol: 1mL; 和/或, 所述第 (1) 步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时; 所述第 (2) 步反应的时间为 0.2-1.5 小时, 优选为 1 小时。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法, 其特征在于: 所述含巯基和二硫键的蛋白和/或多肽选自氨基酸序列为 CCRGDKGPDC 的多肽、氨基酸序列为 SKDACIRTCVMCDEQ 的多肽、Sublancin 抗菌肽。

15. 根据权利要求 1-14 任一项所述的方法, 其特征在于: 所述糖基亚磺酸盐的结构如式 I 所示:

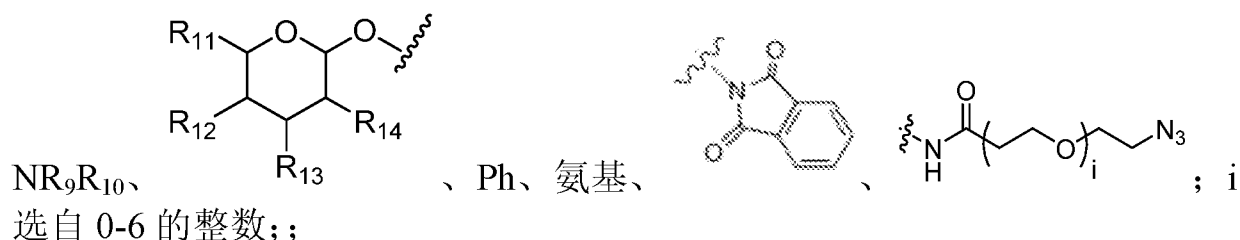


其中, n 选自 0 或 1;

a 选自 3 或 4;

R 各自独立地选自 L_1R_x ; 或者两个相邻的 R 连接成环, 另外的 R 各自独立地选自 L_1R_x , 所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的环;

L_1 选自无或 C_{1-2} 亚烷基, R_x 选自氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、



R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄ 各自独立地选自 L₂R_y；L₂ 选自无或 C₁₋₂ 亚烷基，R_y 选自氢、羟基、C₁₋₆ 烷基、OAc、OBn、OR₈、NR₉R₁₀；

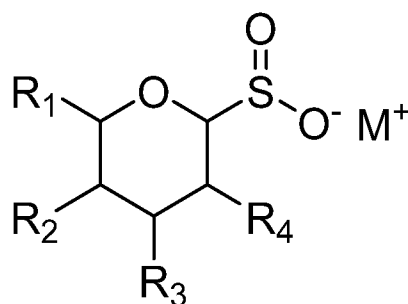
R₈ 选自 C₁₋₆ 烷基；

R₉ 选自氢、C₁₋₆ 烷基、Ac、Bn；

R₁₀ 选自氢、C₁₋₆ 烷基、Ac、Bn；

M⁺为一价阳离子。

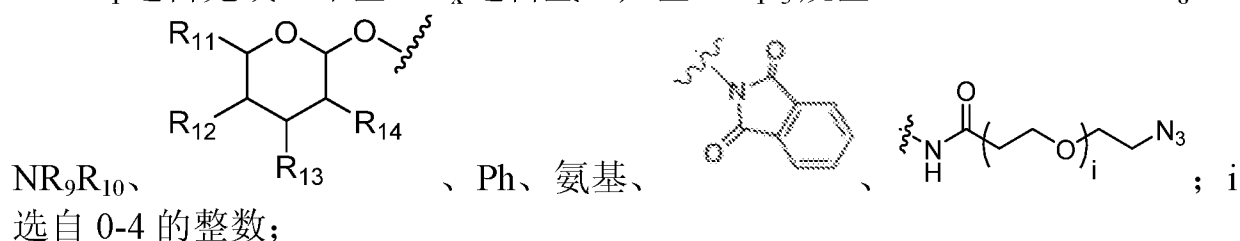
16. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述糖基亚磺酸盐的结构如式 II 所示：



式 II

其中，R₁、R₂、R₃、R₄ 各自独立地选自 L₁R_x；或者 R₁、R₂、R₃、R₄ 中两个相邻的基团连接成环，另外两个基团各自独立地选自 L₁R_x，所述环为未被取代或被一个或两个以上 L₁R_x 取代的 5~6 元环；

L₁ 选自无或亚甲基，R_x 选自氢、羟基、C₁₋₅ 烷基、OAc、OBn、OR₈、



R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄ 各自独立地选自 L₂R_y；L₂ 选自无或亚甲基，R_y 选自氢、羟基、C₁₋₅ 烷基、OAc、OBn、OR₈、NR₉R₁₀；

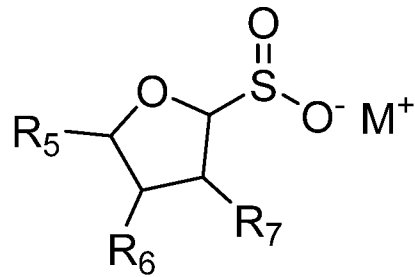
R₈ 选自 C₁₋₅ 烷基；

R₉ 选自氢、C₁₋₅ 烷基、Ac、Bn；

R₁₀ 选自氢、C₁₋₅ 烷基、Ac、Bn；

M⁺为一价金属阳离子。

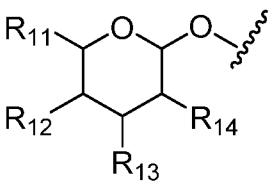
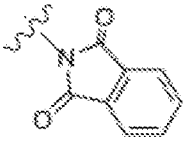
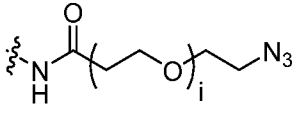
17. 根据权利要求 15 所述的方法，其特征在于：所述糖基亚磺酸盐的结构如式 III 所示：



式 III

其中, R_5 、 R_6 、 R_7 各自独立地选自 L_1R_x ; 或者 R_5 、 R_6 、 R_7 中两个相邻的基团连接成环, 另外一个基团为 L_1R_x , 所述环为未被取代或被一个或两个以上 L_1R_x 取代的 5~6 元环;

L_1 选自无或亚甲基, R_x 选自氢、羟基、 $C_{1\sim5}$ 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、

NR_9R_{10} 、、Ph、氨基、、; i 选自 0-4 的整数;;

R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 各自独立地选自 L_2R_y ; L_2 选自无或亚甲基, R_y 选自氢、羟基、 $C_{1\sim5}$ 烷基、OAc、OBn、 OR_8 、 NR_9R_{10} ;

R_8 选自 $C_{1\sim5}$ 烷基;

R_9 选自氢、 $C_{1\sim5}$ 烷基、Ac、Bn;

R_{10} 选自氢、 $C_{1\sim5}$ 烷基、Ac、Bn;

M^+ 为一价金属阳离子。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的方法, 其特征在于: 所述 5~6 元环为 5~6 元饱和氧杂环;

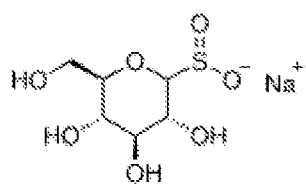
R_8 选自 $C_{1\sim3}$ 烷基;

R_9 选自氢、 $C_{1\sim3}$ 烷基、Ac、Bn;

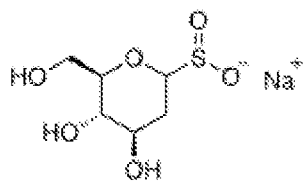
R_{10} 选自氢、 $C_{1\sim3}$ 烷基、Ac、Bn;

M^+ 选自 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 。

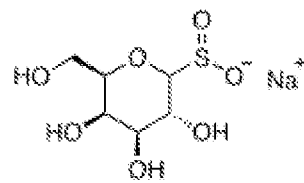
19. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于: 所述糖基亚磺酸盐的结构选自:



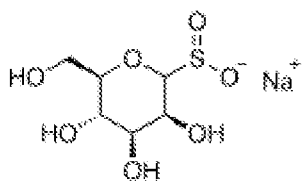
1



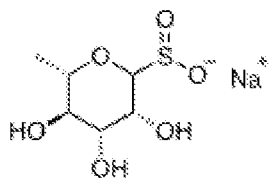
2



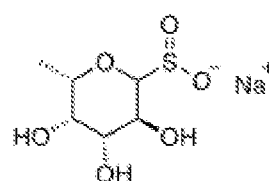
3



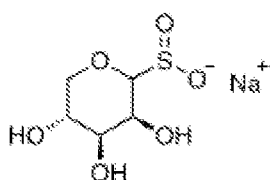
4



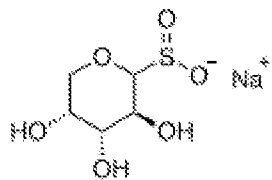
5



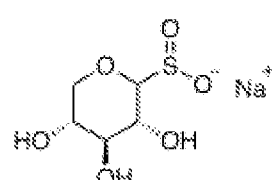
6



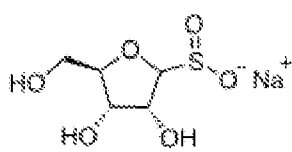
7



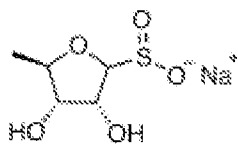
8



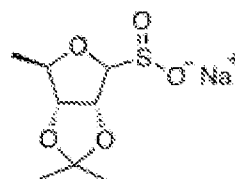
9



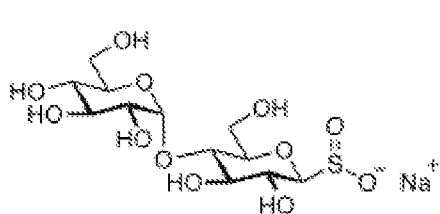
10



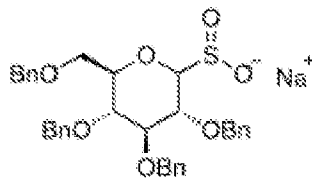
11



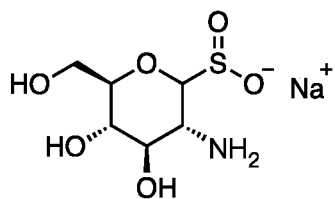
12



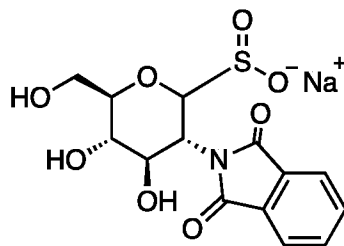
13



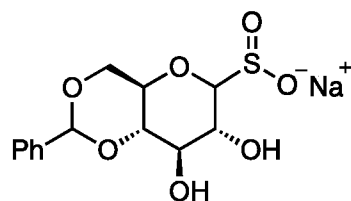
14



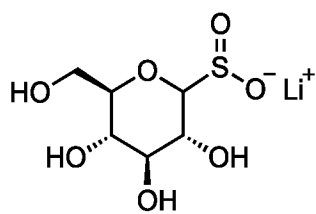
15



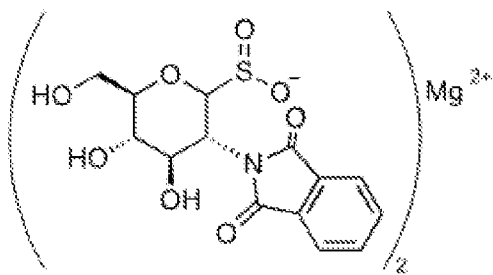
16



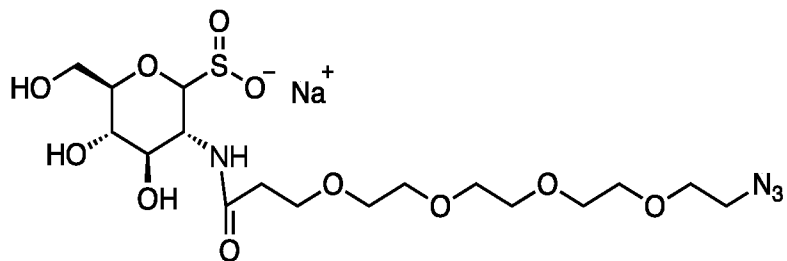
17



18



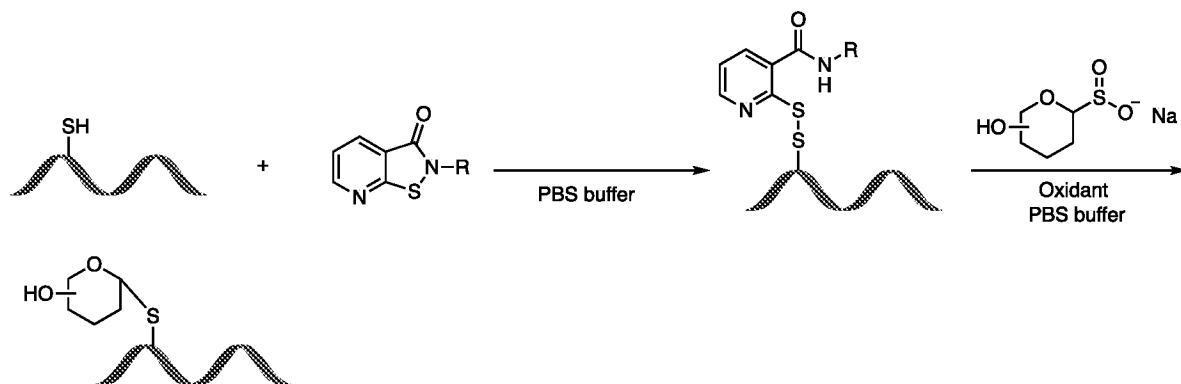
19



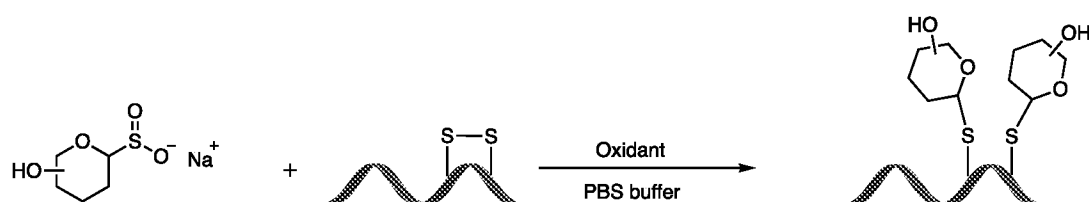
20

20. 权利要求 1-19 任一项所述方法制备得到的糖基化修饰的蛋白和/或多肽。

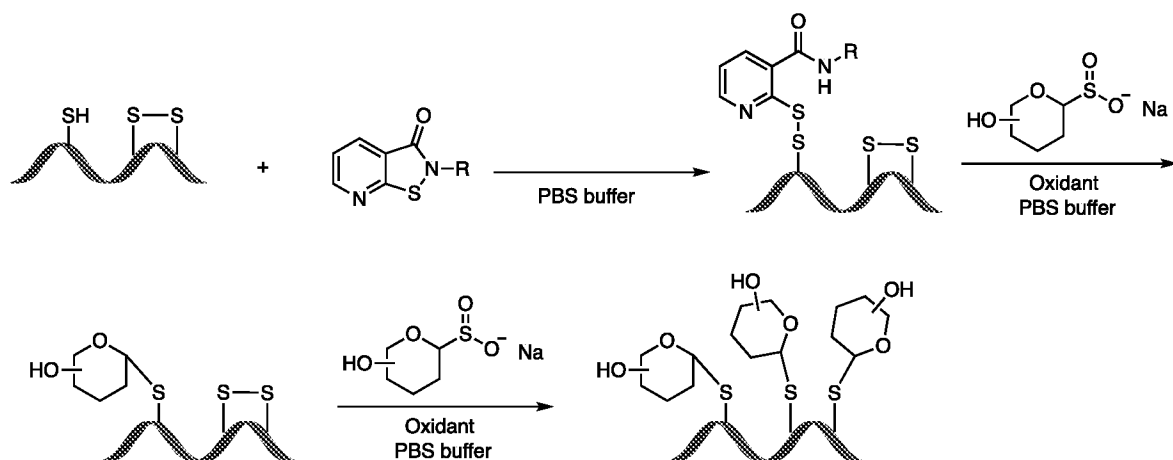
1.



2.



3.



4.

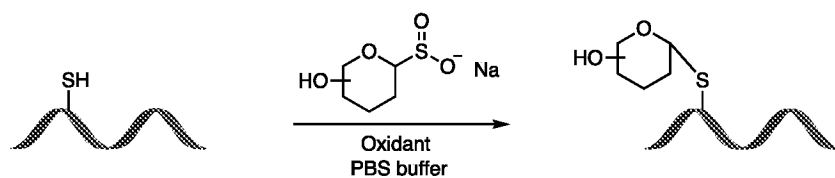
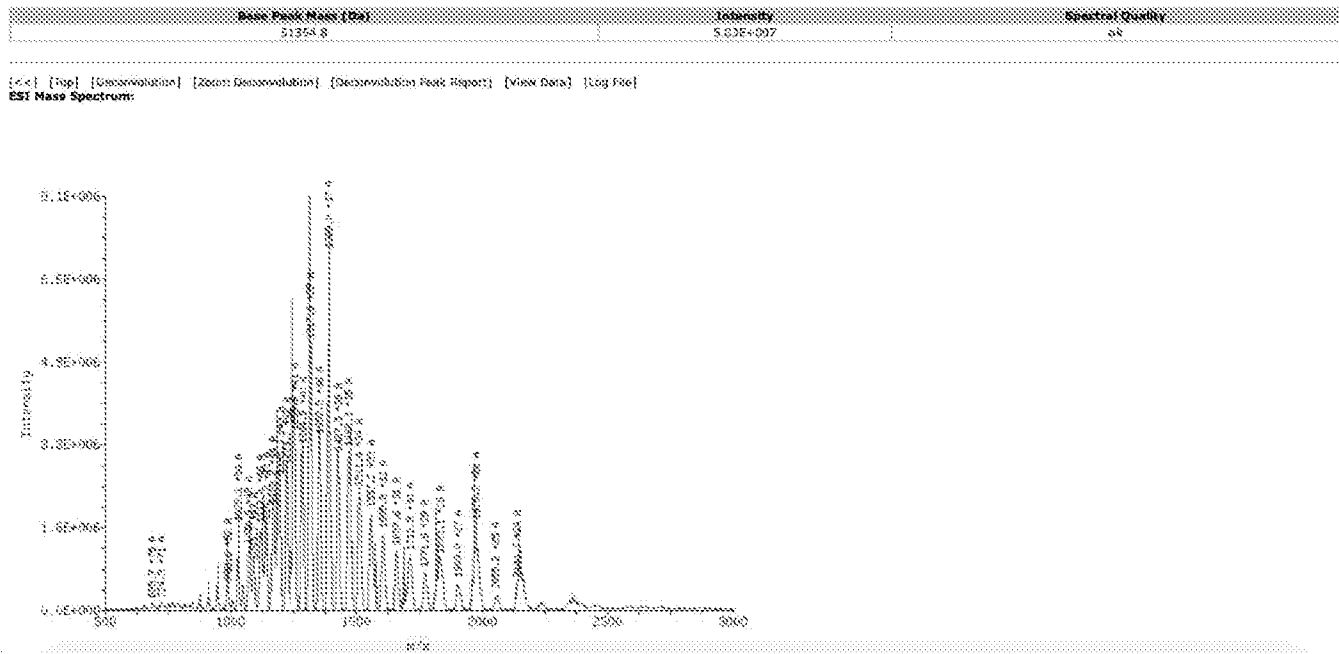


图 1

重链:



轻链:

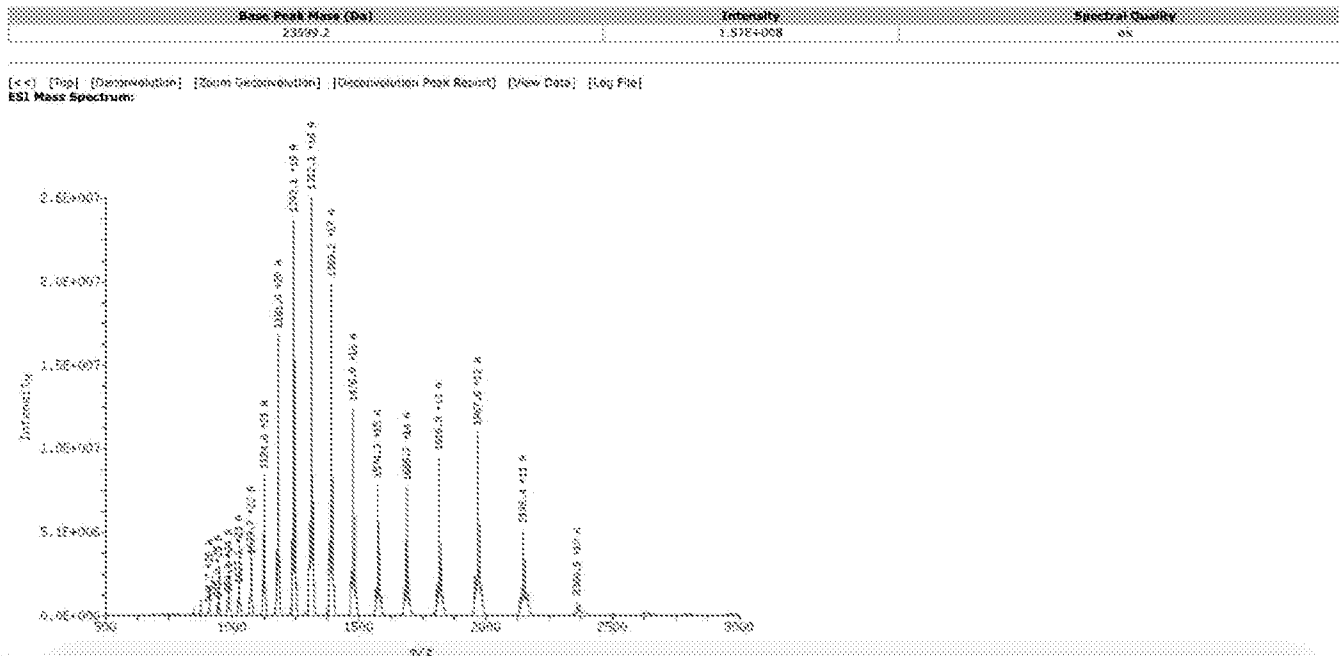


图 2

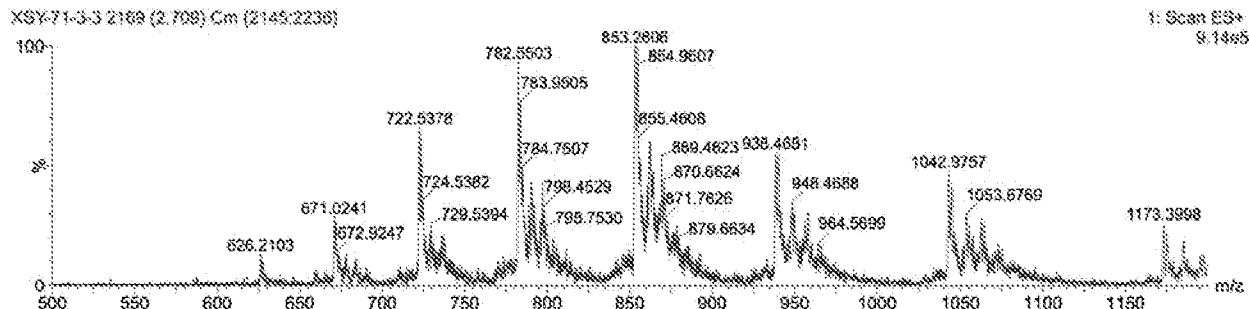


图 3

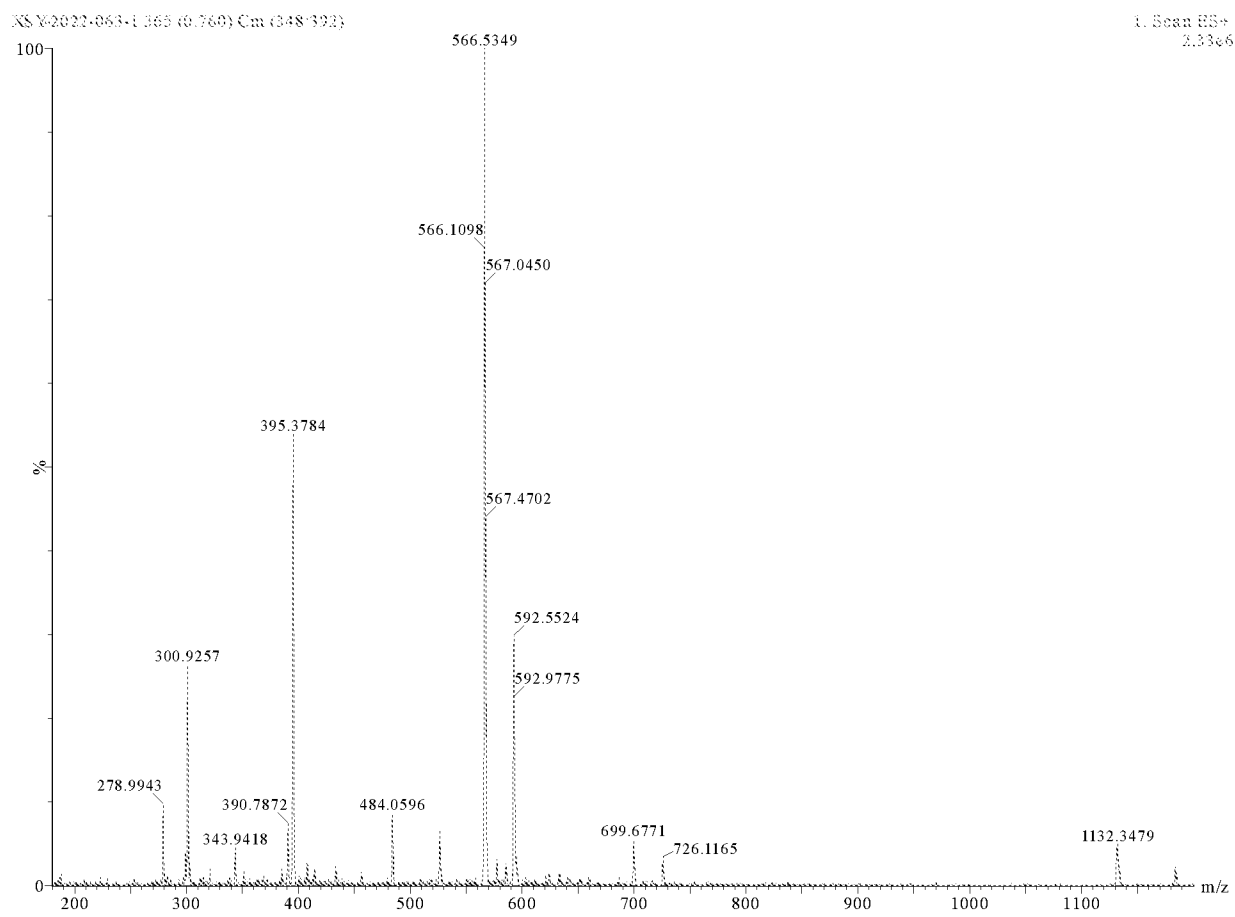


图 4

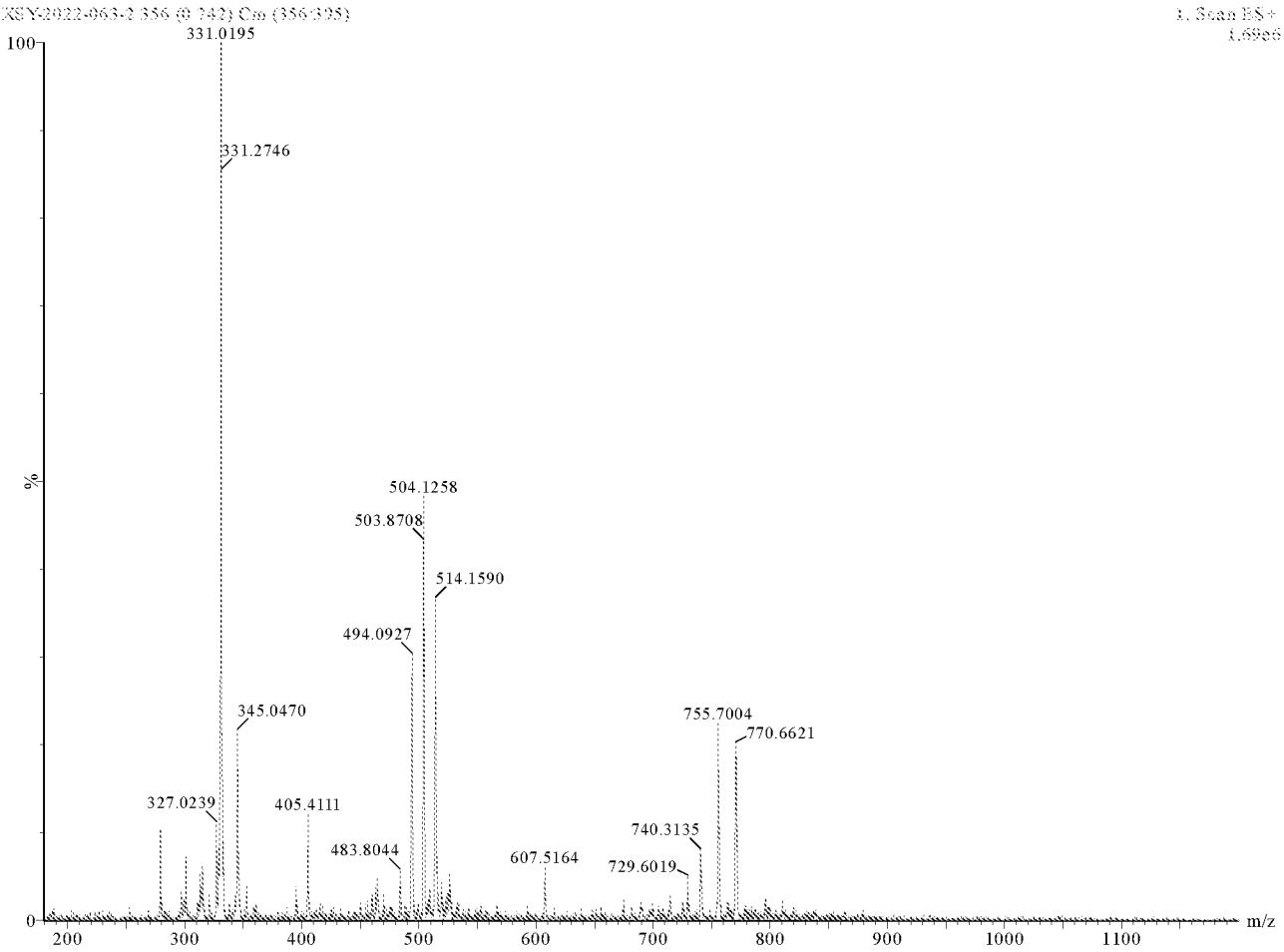


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 1/00(2006.01)i; C07H 5/10(2006.01)i; C07H 9/04(2006.01)i; A01N 41/04(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07D 513/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H; A01N; C07K; C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, pubmed, ISI web of science, STN, 中国生物序列检索系统, Chinese Biological Sequence Retrieval System: 四川大学, 钮大文, 糖基亚磺酸盐, 蛋白, protein, 多肽, peptide, 糖基化, Glycosylation, 氧化剂, 双氧水, 过氧叔丁醇, 过硫酸钾, 氧气, 叔丁基过氧化物, 巯基, 硫醇基, 二硫键, 氧化剂, 双氧水, 过氧叔丁醇, 过硫酸钾, 氧气, 叔丁基过氧化物, oxidant, hydrogen peroxide, tert butyl peroxide, potassium persulfate, oxygen, tert butyl peroxide, 葡萄糖基亚磺酸钠, 木糖基亚磺酸钠, 供体, donor, 亚磺酸钠糖基, 2-甲基异噻唑并[4, 5-b]吡啶-3(2H)-酮, isothiazolopyridinones, 异噻唑并吡啶-3-酮, Sulfinate glycosyl, isothiazolo[5, 4-b]pyridine, Isothiazolopyridine, isothiazolo (5, 4b) pyridine-3-one, 91859-64-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 114736248 A (WEST CHINA HOSPITAL, SICHUAN UNIVERSITY) 12 July 2022 (2022-07-12) description, paragraphs 165-167, and table 1	1-2, 9, 15-20
A	CN 112279880 A (SICHUAN UNIVERSITY) 29 January 2021 (2021-01-29) entire document	1-20
A	US 2007213506 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 13 September 2007 (2007-09-13) entire document	1-20
A	CN 114375295 A (SICHUAN UNIVERSITY) 19 April 2022 (2022-04-19) entire document	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 December 2022

Date of mailing of the international search report

04 January 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118051

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG Gaolan et al. "Protecting-group-free S-glycosylation towards thioglycosides and thioglycopeptides in water" <i>GREEN CHEM.</i> , Vol. 23, No. 8, 01 March 2021 (2021-03-01), pages 2907-2912	1-20
A	ROMAN C. et al. "S-Glycosides: synthesis of S-linked arabinoxylan oligosaccharides" <i>ORG. BIOMOL. CHEM.</i> , Vol. 18, No. 14, 08 April 2020 (2020-04-08), pages 2696-2701	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118051

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The actually submitted sequence listing is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/118051

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114736248	A	12 July 2022	None			
CN	112279880	A	29 January 2021	None			
US	2007213506	A1	13 September 2007	JP	2007527376	A	27 September 2007
				AT	506370	T	15 May 2011
				KR	20060019611	A	03 March 2006
				NZ	544654	A	31 May 2009
				EA	200600042	A1	25 August 2006
				BR	PI0411766	A	08 August 2006
				CA	2529341	A1	06 January 2005
				IL	172729	D0	10 April 2006
				WO	2005000862	A2	06 January 2005
				DE	602004032345	D1	01 June 2011
				EP	1644390	A2	12 April 2006
				AU	2004251105	A1	06 January 2005
CN	114375295	A	19 April 2022	WO	2021013155	A1	28 January 2021
				US	2022127239	A1	28 April 2022

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/118051

A. 主题的分类

C07H 1/00(2006.01)i; C07H 5/10(2006.01)i; C07H 9/04(2006.01)i; A01N 41/04(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07D 513/04(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H; A01N; C07K; C07D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, pubmed, ISI web of science, STN, 中国生物序列检索系统: 四川大学, 钮大文, 糖基亚硫酸盐, 蛋白, protein, 多肽, peptide, 糖基化, Glycosylation, 氧化剂, 双氧水, 过氧叔丁醇, 过硫酸钾, 氧气, 叔丁基过氧化物, 巯基, 硫醇基, 二硫键, 氧化剂, 双氧水, 过氧叔丁醇, 过硫酸钾, 氧气, 叔丁基过氧化物, oxidant, hydrogen peroxide, tert butyl peroxide, potassium persulfate, oxygen, tert butyl peroxide, 葡萄糖基亚硫酸钠, 木糖基亚硫酸钠, 供体, donor, 亚硫酸钠糖基, 2-甲基异噻唑并[4, 5-b]吡啶-3(2H)-酮, isothiazolopyridinones, 异噻唑并吡啶-3-酮, Sulfinat glycosyl, isothiazolo[5, 4-b]pyridine, Isothiazolopyridine, isothiazolo (5, 4b) pyridine-3-one, 91859-64-2

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 114736248 A (四川大学华西医院) 2022年7月12日 (2022 - 07 - 12) 说明书第165-167段及表1	1-2, 9, 15-20
A	CN 112279880 A (四川大学) 2021年1月29日 (2021 - 01 - 29) 全文	1-20
A	US 2007213506 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2007年9月13日 (2007 - 09 - 13) 全文	1-20
A	CN 114375295 A (四川大学) 2022年4月19日 (2022 - 04 - 19) 全文	1-20
A	ZHANG G. 等. "Protecting-group-free S-glycosylation towards thioglycosides and thioglycopeptides in water" GREEN CHEM., 第23卷, 第8期, 2021年3月1日 (2021 - 03 - 01), 第2907-2912页	1-20

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
---	---

国际检索实际完成的日期

2022年12月6日

国际检索报告邮寄日期

2023年1月4日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

孙谦

电话号码 86-(10)-53962101

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	ROMANÒ C. 等. "S-Glycosides: synthesis of S-linked arabinoxylan oligosaccharides" ORG. BIOMOL. CHEM., 第18卷, 第14期, 2020年4月8日 (2020 - 04 - 08), 第2696-2701页	1-20

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表为ST. 26标准的XML文件。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/118051

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114736248	A	2022年7月12日	无			
CN	112279880	A	2021年1月29日	无			
US	2007213506	A1	2007年9月13日	JP	2007527376	A	2007年9月27日
				AT	506370	T	2011年5月15日
				KR	20060019611	A	2006年3月3日
				NZ	544654	A	2009年5月31日
				EA	200600042	A1	2006年8月25日
				BR	PI0411766	A	2006年8月8日
				CA	2529341	A1	2005年1月6日
				IL	172729	D0	2006年4月10日
				WO	2005000862	A2	2005年1月6日
				DE	602004032345	D1	2011年6月1日
				EP	1644390	A2	2006年4月12日
				AU	2004251105	A1	2005年1月6日
CN	114375295	A	2022年4月19日	WO	2021013155	A1	2021年1月28日
				US	2022127239	A1	2022年4月28日