

98.12.08 年 月 日	修正 補充	公告本
-------------------	----------	-----

發明專利說明書

中文說明書替換本(98年12月)

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：091121856 ※IPC分類：C07H 5/06, C07H 15/12, C07H 7/027
C12P 19/26, C12P 13/04, C08B 37/00

※申請日期：91年9月24日

壹、發明名稱

(中文) 糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法
 (英文) PROCESS FOR PRODUCING SUGAR CHAIN ASPARAGINE
DERIVATIVE

貳、發明人(共 2 人)發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 尾原 康宏
 (英文) YASUHIRO KAJIHARA
 住居所地址：(中文) 日本國神奈川縣橫濱市金澤區瀬戸 22-2 橫濱市立大
學大學院總合理學研究科
 (英文)

國籍：(中文) 日本 (英文) JAPAN

參、申請人(共 2 人)申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 日商大塚化學股份有限公司
 (英文) OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.
 住居所或營業所地址：(中文) 日本國大阪府大阪市中央區大手通3丁目
2番27號
 (英文)
 國籍：(中文) 日本 (英文) JAPAN
 代表人：(中文) 森 明平
 (英文) AKIHEI MORI

發明人 2

姓名：(中文) 佐佐木 賢

(英文) KEN SASAKI

住居所地址：(中文) 日本國三重縣四日市市赤堀新町9番5號太陽化學
股份有限公司

(英文)

國籍：(中文) 日本

(英文) JAPAN

申請人 2

姓名或名稱：(中文) 尾原 康宏

(英文) YASUHIRO KAJIHARA

住居所或營業所地址：(中文) 日本國神奈川縣橫濱市金澤區瀬戸 22-2 橫

濱市立大學大學院總合理學研究科

(英文)

國籍：(中文) 日本 (英文) JAPAN

代表人：(中文)

(英文)

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為：_____

☐ 本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 國際專利合作條約；2002年06月19日；PCT/JP02/06091

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

技術領域

本發明係有關於一種糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法及糖鏈天門冬醯胺衍生物。

背景技術

過去，以糖水解酵素將糖鏈分解而使其成為衍生物之技術，係利用於糖鏈的構造解析等，數毫克規模的分析研究上。然而，由於無法大量地獲得各個的糖鏈衍生物，因此在克規模的研究技術上，其進展相當遲緩。所以，欲將糖鏈的衍生物應用於可製造藥品的合成研究上，是相當困難的。

另一方面，已知由蛋黃可大量地得到糖胜肽(Biochimica et Biophysica Acta 1335 (1997) p 23~32)。但是，有關圖1所示之化合物1以及該化合物1中分枝糖鏈一邊的非還原端之唾液酸及半乳糖等有缺失之一系列化合物，則尚未有成功的例子顯示可大量得到經苄基甲氧羰基(Fmoc)化的糖鏈衍生物。又，已有例子由人類血液中的蛋白質等少量分離出幾種的糖鏈，但若將該糖鏈使用於藥品的製造上時，該藥品將有混雜對人體有害之愛滋病毒及肝炎病毒等之危險性，因此欲將該糖鏈應用於藥品上，在技術上仍存在有問題。

再者，欲在分枝型糖鏈中，製造出該分枝部分的構造均相同之糖鏈，已有相當多的製造例子存在。其過去技術中，有三種方法。第一種方法，係由天然存在之糖蛋白質

分離純化出天門冬醯胺鍵結的複合型糖鏈。其代表例，如 T. Tamura, et al. Anal. Biochem., 1994, 216, p 335-344, V. H. Thomas, et al. Carbohydr. Res., 1998, 306, p 387-400, K. G. Rice, et al., Biochemistry, 1993, 32, p 7264-7270等記載之方法。這些方法中的優點，就是無須合成糖鏈。但是，其亦有幾個缺點。舉例來說，前述糖蛋白質衍生之糖鏈，可能會得到在非還原末端部分糖殘基有幾個發生隨機缺失之混合物的情形，該混合物中所含有之糖鏈，由於其物理、化學性質極類似，因此想要將各個糖鏈分離將是非常困難的事情，實質上也就不可能大量地獲得單一的糖鏈。又，為獲得較大量的(糖鏈)之故，亦有例子由人血中的蛋白質(由纖維蛋白原之分離：C. H. Hokke. et al, Carbohydr. Res., 305 (1997), p 463-468, 由人血清鐵傳遞蛋白之分離：M. Mizuno et al., J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, p 284-290)來分離糖鏈。如前所述，人血中的蛋白質上，有可能混入愛滋病毒或肝炎病毒，因此必須很慎重地進行該步驟。所以，欲將所得之糖鏈，以及其衍生物利用於醫藥品開發上就很困難。又，即使可以大量地得到糖鏈，受限於其構造，也並沒有例子有實質上獲得具多種類構造的糖鏈及其衍生物。

在 K. G. Rice, et al., Biochemistry, 1993, 32, p 7264-7270, 或者 Rice, et al., Neoglycoconjugate, Academic Press, 1994, ISBN 0-12-440585-1 p 286-321中，係使用糖水解酵素由糖鏈的非還原末端除去糖殘基，但

由於無法大量獲得作為原料的單一構造之糖類，因此只停留在分析規模的層次上。E. Meinjohanns (J. Chem. Soc. Perkin Transl, 1998, p 549-560)等人，在由牛胎球蛋白(由牛衍生之糖蛋白質)得到圖5所示之化合物56後，經由圖3所示之化合物33，合成了圖1所示之化合物10。為得到最初原料的化合物56之故，則利用聯胺分解反應。此聯胺具有高毒性，所得到之糖鏈的衍生物若使用於醫藥品時，就會有微量聯胺混入造成安全性問題之可能性。又，未鍵結有唾液酸之化合物56、33及10之糖鏈的衍生物，也祇能少量獲得而已。

第二個方法，係以化學合成糖鏈之方法。現在，以化學合成法組合單糖時，如J. Seifert et al. Angew Chem Int. Ed. 2000, 39, p 531-534所報告之例子，可構築至約10個糖單位左右。此方法之優點，是理論上可得到所有的糖鏈衍生物。但是，由於其步驟上十分繁雜，就有無法大量合成之缺點。又，即使要將鍵結有10個左右糖殘基之糖鏈合成至數毫克，也需要將近一年的時間。到目前為止，雖有關於化學合成數個糖鏈之例子，但其許多均僅停留在能夠合成數毫克的標的物糖鏈之階段。

第三個方法，係以組合酵素反應及化學反應來合成糖類之方法。其代表例，如Carlo Unverzagt, Angew Chem Int. Ed. 1996, 35, p 2350-2353所報告者。此方法係以化學合成構築到某程度的糖鏈之後，再以酵素反應將糖殘基附加於糖鏈之上，從而加長糖鏈之方法。但是，在加長糖鏈鎖

使用之酵素因為有基質特異性的緣故，能夠導入至糖鏈的糖種類便有所限制。又，化學合成的步驟數目上繁多，也造成了大量合成的困難，從而僅能得到少量的最終產物。又，C. H. Lin (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1995, p 1625-1630)等人，使用M. Koketsu等人所報告之方法(J. Carbohydrate Chemistry, 1995, 14 (6), p 833-841)，從卵黃得到唾液酸基寡糖胜肽，然後，再使用糖水解酵素、糖轉移酵素，而改變了糖鏈的非還原末端部分的構造。該論文中之圖，所記載之糖鏈，係在非還原末端部分上僅有1個天門冬醯胺(Asn)殘基。但是，若根據J. Carbohydrate Chemistry, 1995, 14 (6), p 833-841所報告之方法，仍然是得到混合物，其糖鏈之非還原末端上除天門冬醯胺以外，還鍵結有離胺酸等幾個胺基酸(平均而言，鍵結有2.5個胺基酸)。因此，並無法得到單一化合物型態之糖類衍生物，又，其亦沒有教示可大量得到各個衍生物，而關於該各個衍生物之化合物中，其分枝型糖鏈之分枝糖鏈的糖殘基係隨機缺失的情形。在C. H. Lin等人的論文中，並沒有證據顯示有得到單一生成物之糖鏈胜肽。Y. Ichikawa在Glycopeptide and Related Compounds (Marcel Dekker, Inc., 1997, ISBN 0-8247-9531-8, p. 79-205)中敘述，將三分枝型的複合型糖鏈由末端開始，依次以糖水解酵素處理時，就可以由糖鏈的非還原末端起將糖鏈依次除去，而得到各種糖鏈之衍生物。然而，其並未提及要如何將個別的糖鏈加以分離，又，其合成亦只有均勻分枝者而已。因此

，即使依據該方法，關於其分枝型糖鏈之分枝糖鏈的糖殘基係隨機缺失的化合物，一般咸認仍無法就個別的衍生物大量地獲得。

發明之開示

本發明，係可將醫藥品開發等領域上十分有用的各種經分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物，以相較於過去的方法非常容易而大量地取得。又，本發明之目的，係提供一糖鏈天門冬醯胺的製造方法及糖鏈的製造方法，並經由製造糖鏈天門冬醯胺衍生物的步驟，而可在取得糖鏈天門冬醯胺衍生物的同時，以相較於過去的方法，非常容易而大量地取得各種有用的經分離之糖鏈天門冬醯胺及糖鏈。進一步，本發明之目的，係提供一新穎的糖鏈天門冬醯胺衍生物、糖鏈天門冬醯胺及糖鏈。

亦即，本發明係有關於

(1)一種由糖鏈天門冬醯胺衍生的糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，導入脂溶性的保護基；以及

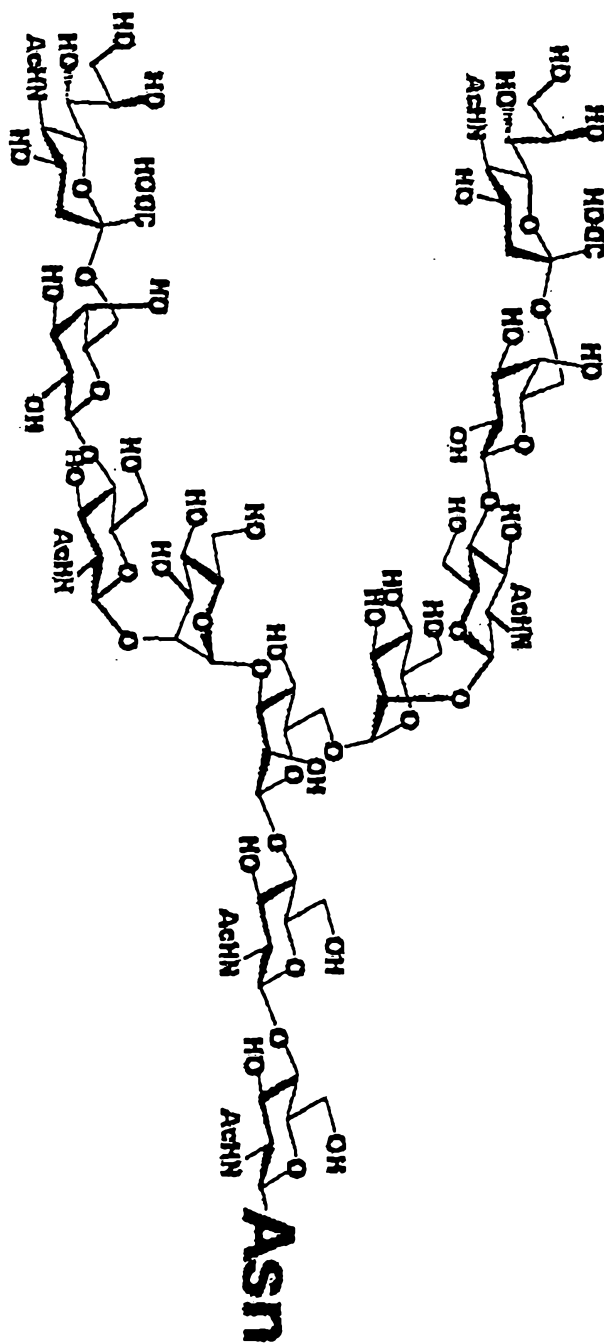
(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；

(2)如前述(1)所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方

法，其進一步包含：

(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟；

(3)如前述(1)或(2)所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其中，該包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有



及/或在該化合物上有缺失1個以上糖殘基之化合物者；

(4)如前述(1)~(3)中任一者所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其中，該脂溶性的保護基係苄基甲氧羰(Fmoc)基；

(5)如前述(1)~(3)中任一者所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其中，該步驟(a)係在包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以上之糖鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟；

(6)一種糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，導入脂溶性的保護基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；以及

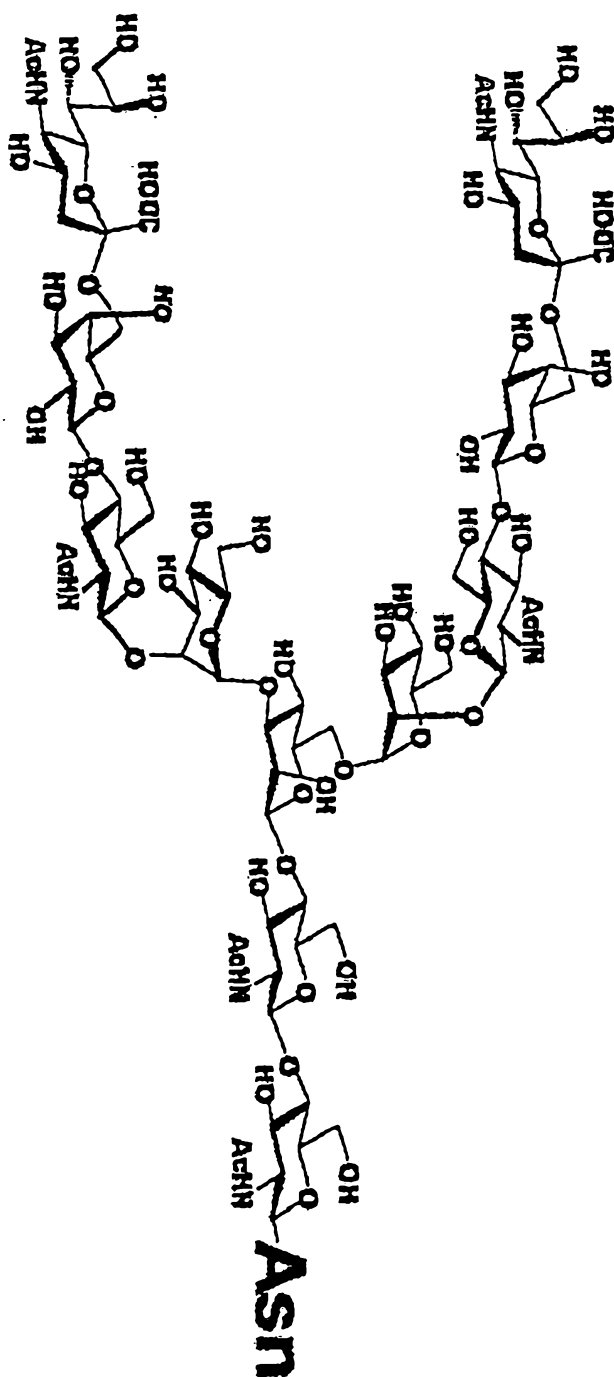
(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基，加以除去；

(7)如前述(6)所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其進一步包含：

(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟；及/或

(c')步驟，亦即，將(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺，使用糖水解酵素，進行水解之步驟

(8)如前述(6)或(7)所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其中，該包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有



及/或在該化合物上有缺失1個以上糖殘基之化合物者；

(9)如前述(6)~(8)中任一者所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其中，該脂溶性的保護基係Fmoc基；

(10)如前述(6)~(8)中任一者所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其中，該步驟(a)係在包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以上之糖鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟；

(11)一種糖鏈之製造方法，其包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，再導入脂溶性的保護基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；

(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係除去步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基；以及

(d)獲得糖鏈之步驟，其係除去步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺的天門冬醯胺殘基；

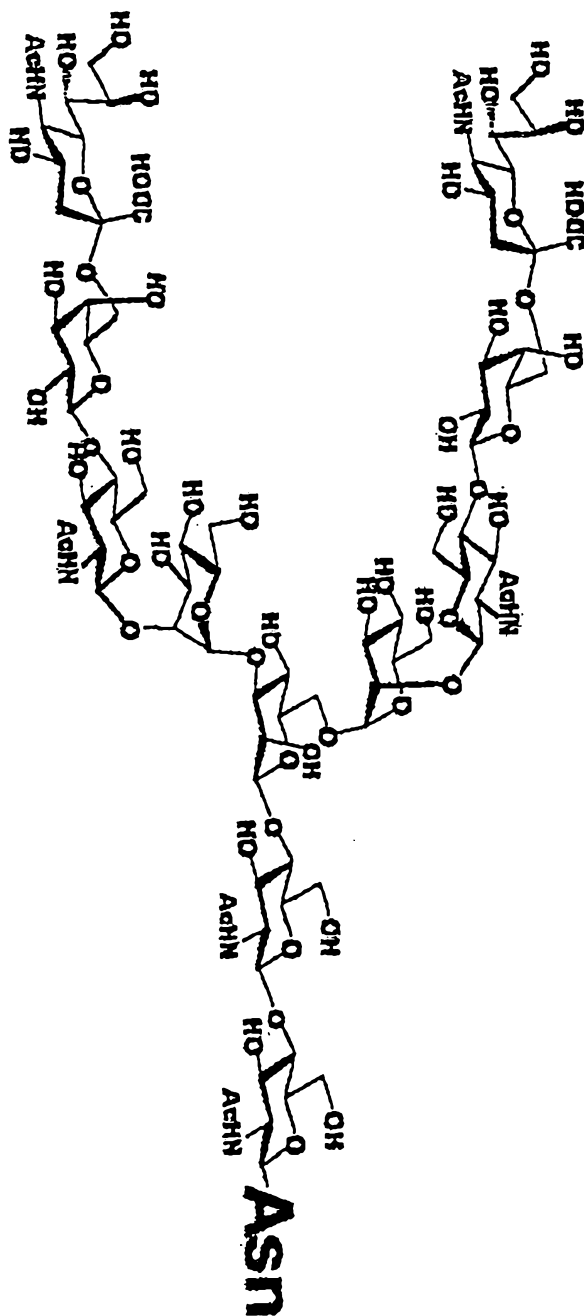
(12)如前述(11)所記載之糖鏈之製造方法，其進一步包含：

(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟；及/或

(c')步驟，亦即，將(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺，使用糖水解酵素，進行水解之步驟；及/或

(d')步驟，亦即，將(d)所得到之糖鏈，使用糖水解酵素，進行水解之步驟；

(13)如前述(11)或(12)所記載之糖鏈之製造方法，其中，該包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有

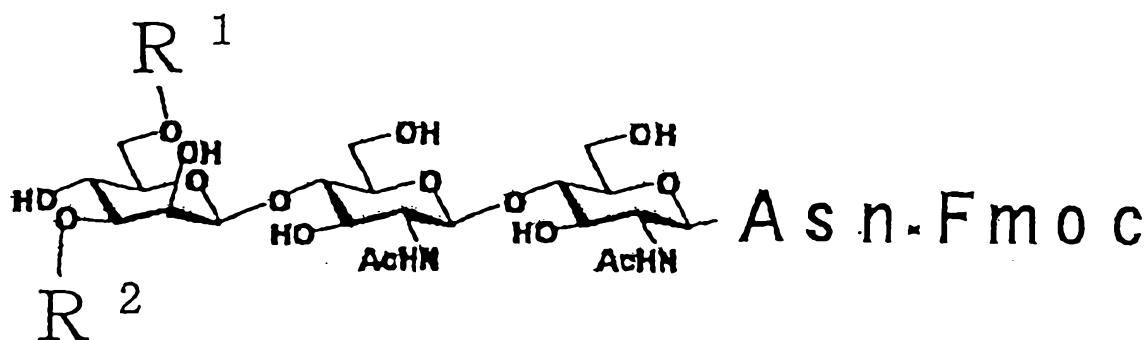


及/或在該化合物上有缺失1個以上糖殘基之化合物者；

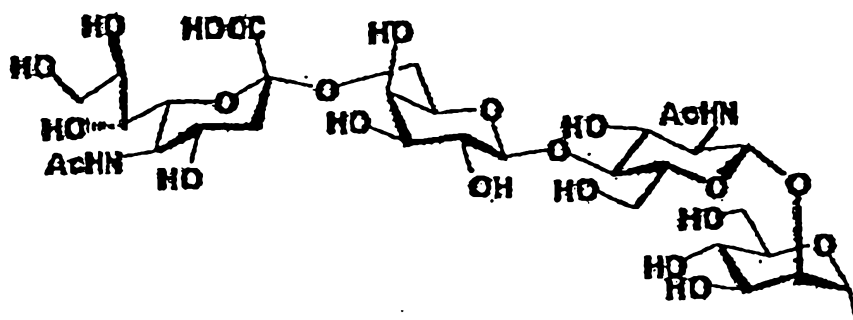
(14)如前述(11)~(13)中任一者所記載之糖鏈之製造方法，其中，該脂溶性的保護基係Fmoc基；

(15)如前述(11)~(13)中任一者所記載之糖鏈之製造方法，其中，該步驟(a)係在包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以上之糖鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟；

(16)一種糖鏈天門冬醯胺衍生物，其係具有一般式：

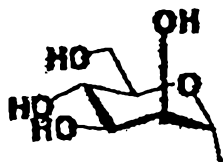
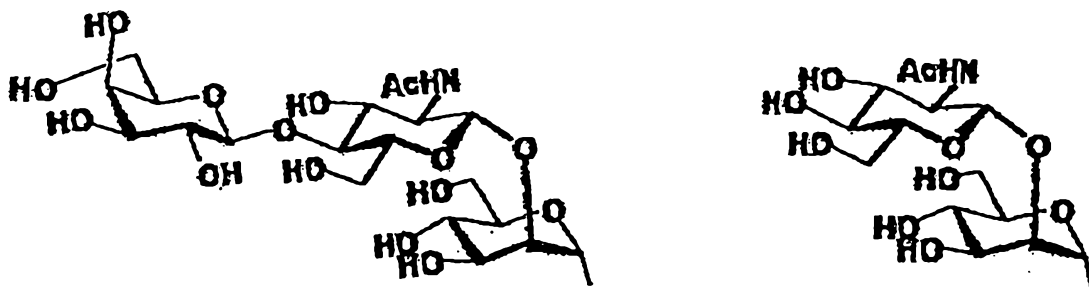


(式中， R^1 及 R^2 為H、



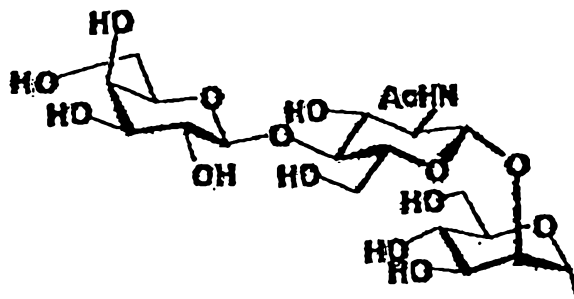
(12)

發明說明續頁



或

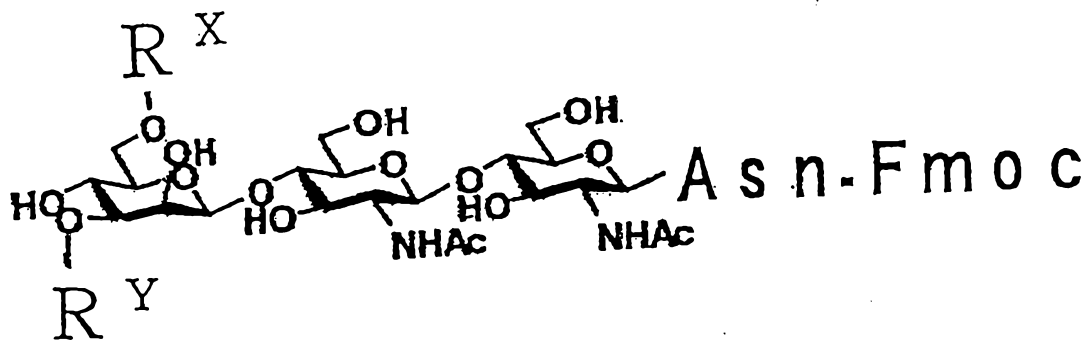
其可為相同或相異，但，



R^1 及 R^2 同時為

之情況除外)；

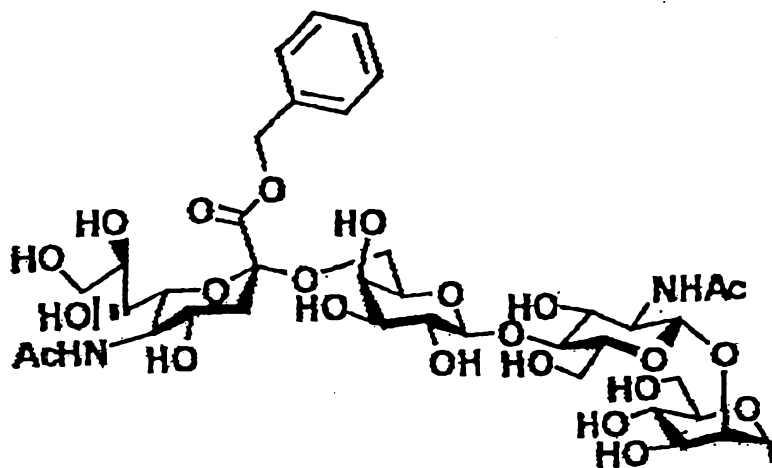
(17) 一種糖鏈天門冬醯胺衍生物，其係具有一般式：



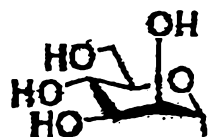
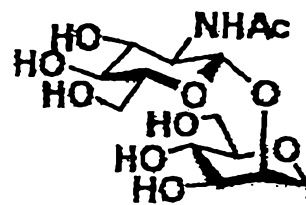
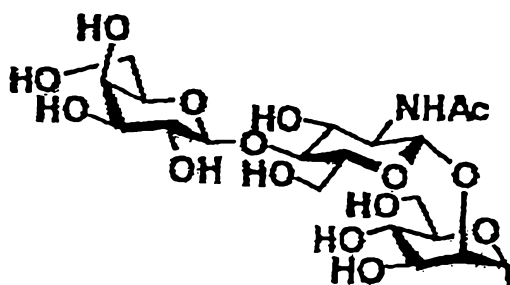
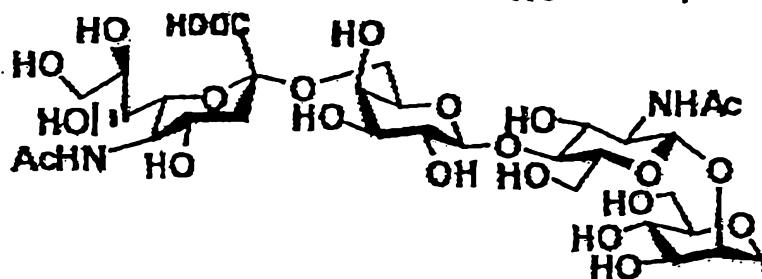
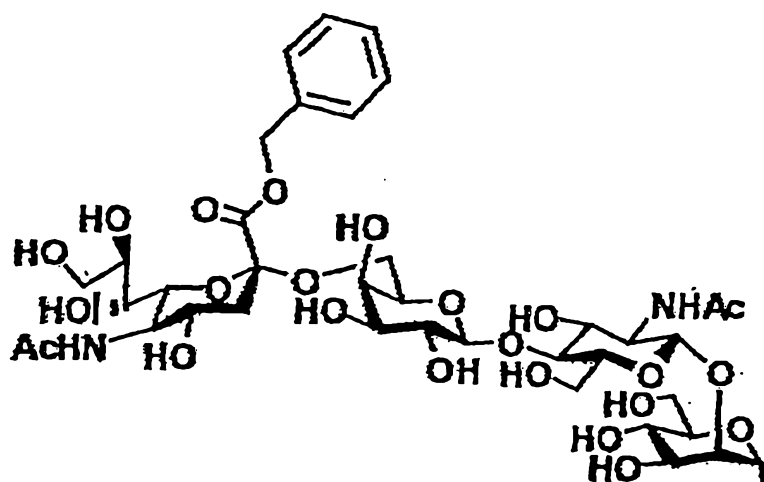
(式中， R^X 及 R^Y 中，其一者為

(13)

發明說明續頁



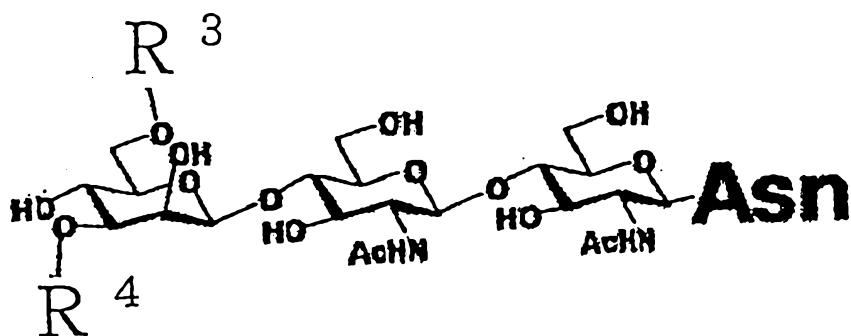
使用糖水解酵素，進行水解，而另一者為 H、



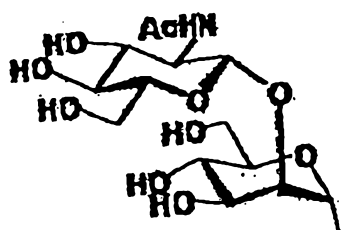
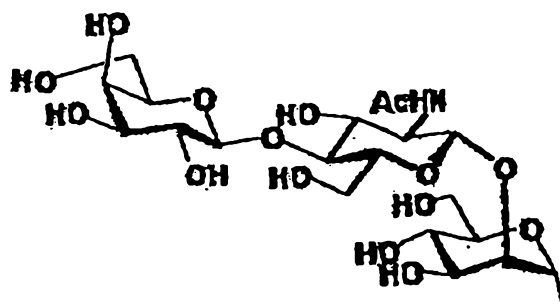
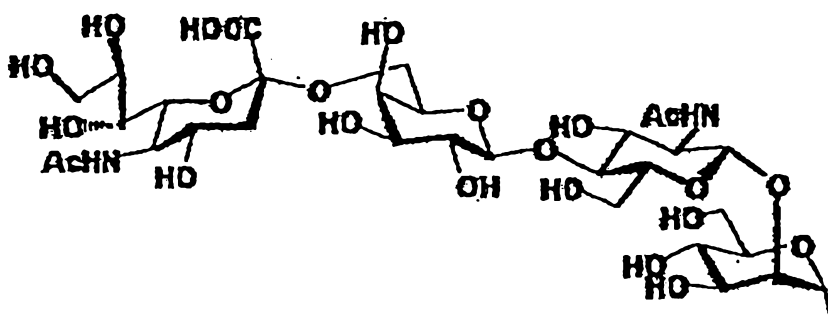
或

)。

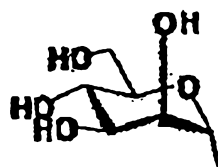
(18) 一種糖鏈天門冬醯胺，其係具有一般式



(式中， R^3 及 R^4 為H、



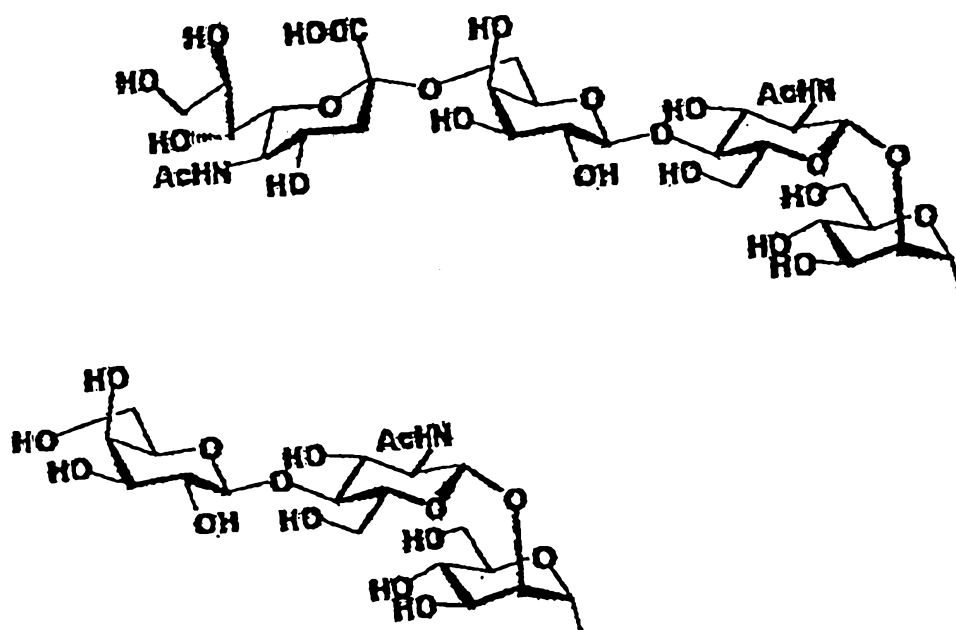
或



，其可為相同或相異，但， R^3 及 R^4 同時為

(15)

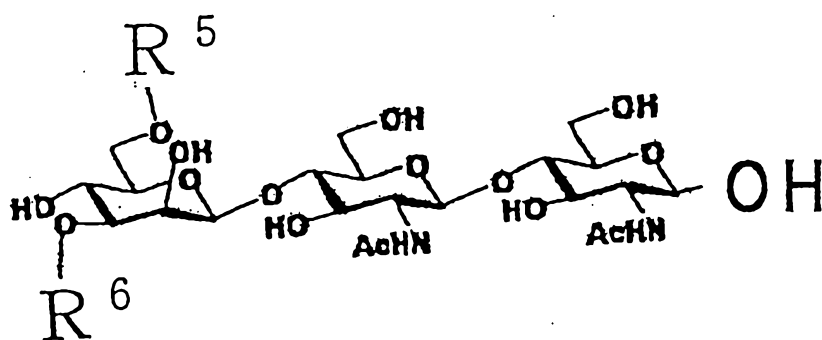
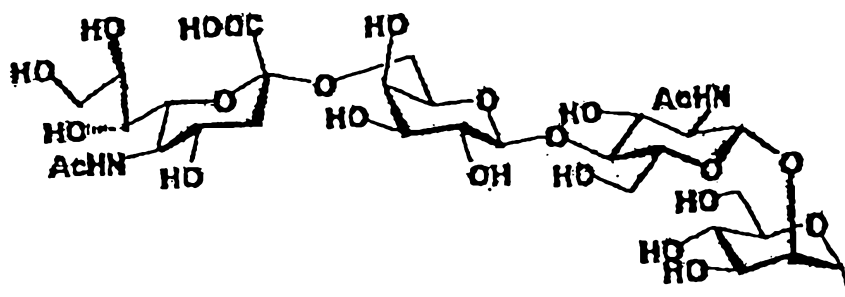
發明說明續頁

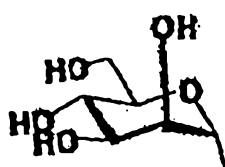
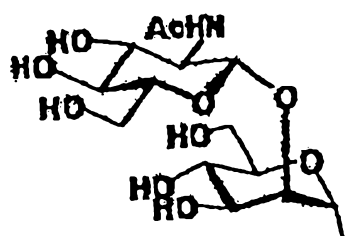
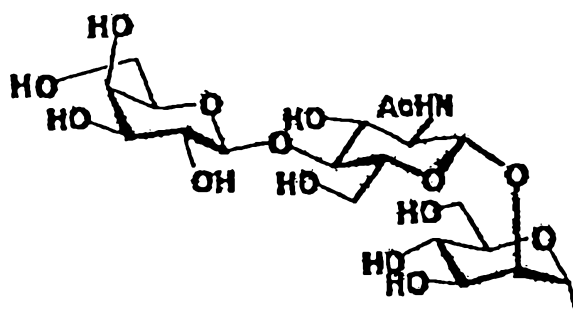


或

之情況除外)；以及

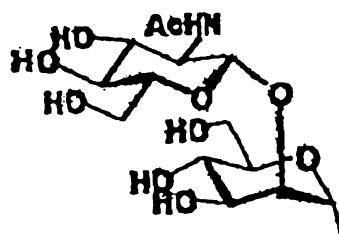
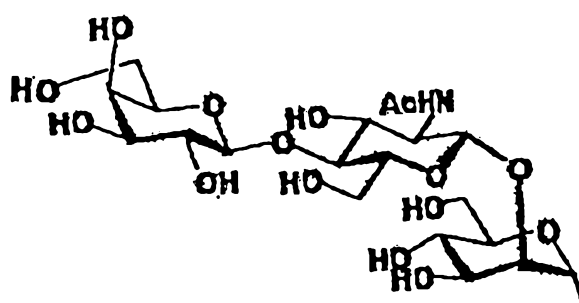
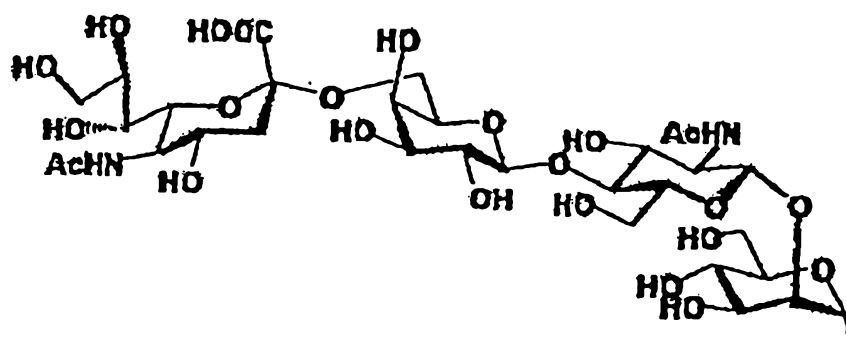
(19)一種糖鏈，其係具有一般式：

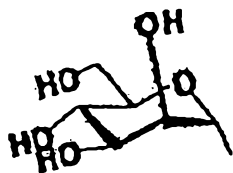
(式中， R^5 及 R^6 為H、



或

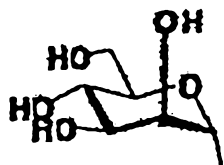
，其可為相同或相異，但， R^5 及 R^6 同時為





或

，或者 R^5 或 R^6 之一者為 H，



同時另一者為

之情況除外)。

附圖之簡單說明

圖 1 係表示本發明所得之糖鏈天門冬醯胺衍生物的一群體之構造。

圖 2 係表示本發明所得之糖鏈天門冬醯胺衍生物的一群體之構造。

圖 3 係表示本發明所得之糖鏈天門冬醯胺的一群體之構造。

圖 4 係表示本發明所得之糖鏈天門冬醯胺的一群體之構造。

圖 5 係表示本發明所得之糖鏈的一群體之構造。

圖 6 係表示本發明所得之糖鏈的一群體之構造。

圖 7 係表示本發明所得之糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法中步驟之一個例子。

圖 8 係表示使用各種糖水解酵素進行之糖鏈天門冬醯胺衍生物的變換步驟之一個例子。

圖 9 係表示使用各種糖水解酵素進行之糖鏈天門冬醯胺衍生物的變換步驟之一個例子。

圖 10 係表示使用各種糖水解酵素進行之糖鏈天門冬醯胺衍生物的變換步驟之一個例子。

圖 11 係表示使用各種糖水解酵素進行之糖鏈天門冬醯胺衍生物的變換步驟之一個例子。

圖 12 係表示由糖鏈天門冬醯胺衍生物除去保護基(Fmoc基)之步驟以及由糖鏈天門冬醯胺除去天門冬醯胺殘基之步驟之一例。

實施本發明之最佳型態

本發明的糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，舉例來說，其一個大的特徵在於，由天然的糖蛋白質衍生之糖鏈天門冬醯胺，理想為由天門冬醯胺鍵結型糖鏈，所得到之糖鏈天門冬醯胺的混合物中，其所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，將脂溶性的保護基導入(鍵結)於其中，於得到糖鏈天門冬醯胺衍生物之混合物後，由該混合物分離出各糖鏈天門冬醯胺衍生物。又，在本說明書中，所謂的「糖鏈天門冬醯胺」係指天門冬醯胺鍵結狀態之糖鏈而言。又，所謂的「天門冬醯胺鍵結型糖鏈」，係指在蛋白質的聚胜肽中之天門冬醯胺(Asn)的酸胺基上，還原末端所存在的N-乙醯葡萄糖胺係N-糖苷鍵結之糖鏈群，並以Man(β 1-4)GlcNac為母核之糖鏈群。所謂的「糖鏈天門冬醯胺衍生物」，係指天門冬醯胺殘基上鍵結有脂溶性的保護基狀態之糖鏈天門冬醯胺而言。又，化合物的構造式中，「AcHN」係表示乙醯胺。

如前所述，由天然的糖蛋白質衍生之糖鏈，係非還原

末端的糖殘基有隨機缺失之糖鏈混合物。本發明者們，令人驚異地，發現在天然的糖蛋白質衍生之糖類，具體來說是在糖鏈天門冬醯胺的混合物中所包含之該糖鏈天門冬醯胺上，藉由導入脂溶性的保護基，可將導入有該保護基之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物，以習知之色層分析法輕易地分離出各個糖鏈天門冬醯胺衍生物。藉此，就可以個別地大量製備具有各種構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物。舉例來說，過去很難分離的，圖1所示之化合物2及6或圖2所示之化合物3及7之類似構造的糖鏈天門冬醯胺衍生物群體，就可以分離了，亦就可個別地將這些化合物各個、容易地大量加以製備。又，以所得到之糖鏈天門冬醯胺衍生物作為基礎，舉例來說，藉由使糖水解酵素依次作用而除去糖殘基，就可以進一步合成各種糖鏈天門冬醯胺衍生物。

如此，藉由在糖鏈天門冬醯胺上導入脂溶性的保護基，而使其成為衍生物，就可將個別的糖鏈天門冬醯胺衍生物進行分離，而且，由於導入脂溶性的保護基，糖鏈天門冬醯胺衍生物之全體的脂溶性就提高了，舉例來說，其與十分適合使用之逆相系管柱的相互作用可明顯地提高，其結果，就可以更敏稅地反映出糖鏈構造之差別，從而可分離出個別的糖鏈天門冬醯胺衍生物。舉例來說，本發明中適合使用之脂溶性保護基的Fmoc基，其脂溶性就非常高。亦即Fmoc基的萸基骨架，在其中心的五員環上，有二個苯環鍵結而形成非常高度脂溶性質之構造，舉例來說，

其與逆相系管柱之一的 ODS 管柱的十八基會產生非常強的相互作用，因此就可以將類似構造的糖鏈天門冬醯胺衍生物加以分離。

進一步，根據本發明，如後所述，藉由除去所獲得之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基，就可以得到各種的糖鏈天門冬醯胺，又，藉由將所得到之糖鏈天門冬醯胺的天門冬醯胺殘基除去，亦就可以容易且大量地得到各種糖類。

本發明的糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，具體言之，包含：

- (a) 得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含 1 種或 2 種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，導入脂溶性的保護基；以及
- (b) 分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析。

在 (a) 步驟所使用之包含 1 種或 2 種以上的糖鏈天門冬醯胺之混合物，其只要是含有天門冬醯胺鍵結狀態之糖鏈 1 種或 2 種以上者即可，並無特別之限制。舉例來說，亦可為一混合物，其包含含有天門冬醯胺 1 個或數個鍵結之糖鏈的 1 種或 2 種以上。在其中，若特別從容易取得的觀點來看時，則以包含還原末端上鍵結有天門冬醯胺之糖鏈 1 種或 2 種以上的混合物為理想。又，本說明書中，所謂的「糖鏈」，係指鍵結有任意的單糖 2 種以上者。

這種糖鏈天門冬醯胺之混合物，可以習知之方法，理想者為天然之原料(例如乳汁、由牛衍生之胎球蛋白或蛋衍生之糖蛋白質及/或糖胜肽的混合物)來獲得，該混合物中，舉例來說，可以添加蛋白質分解酵素(例如「普羅」酵素(和光純藥公司製)、「阿克契」酵素-E(科研製藥公司製)，以及一般的羧基胜肽酵素、胺基胜肽酵素等酵素)，於習知之反應條件下進行反應，切斷胜肽部分，就可作為該反應後之反應液，或者再由該反應液將糖鏈天門冬醯胺以外之成分，以習知的方法(例如凝膠過濾管柱、離子交換管柱等各種色層分析法、以及高速液體色層分析(HPLC)純化法)除去，便可以得到。基於製作之容易性的觀點，係以使用習知之由蛋衍生的糖胜肽[Biochimica et Biophysica Acta 1335 (1997) p 23-32；粗純化SGP(該混合物含有蛋黃中的蛋白質、無機鹽等，且糖胜肽的含量10~80重量%左右)]，而製成前述混合物者為理想。

又，基於有效地獲得具有期望的糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物的觀點，理想者係以進一步將該混合物所含有的糖鏈天門冬醯胺進行水解，並事先將一部分的糖殘基予以切斷者為佳。又，該切斷之程度，只要至少可在保有本說明書提及之「糖鏈」的構造範圍內即可，並無特別之限制。如此所得到之混合物，舉例來說，一混合物含有圖3所示之化合物24及/或在該化合物中缺失1個以上的糖殘基之化合物者便是。又，這種情況下，該糖殘基有缺失之化合物，基於保持本說明書所提及「糖鏈」的構造之觀點

，係以糖殘基缺失9個為其上限。

舉例來說，圖3所示之化合物25及29，可將含有化合物24之糖鏈天門冬醯胺之混合物(以下，稱為化合物24混合物)，根據以下所示，以酸水解，而有效率地得到該混合物，甚至，亦可以有效率地得到相對應之糖鏈天門冬醯胺衍生物，亦即圖1所示之化合物2及6。

舉例來說，可對化合物24混合物適量加入0.1規定程度之酸水溶液，並於4~100℃下進行反應。此時，一方面以薄層色層分析法(例如使用矽凝膠60F254(默克公司製)，以及作為展開溶劑之醋酸乙酯：甲醇：水=4：4：3)來追蹤該水解反應之進行，並於化合物25及29可得到最多之處使反應停止。舉例來說，可在25℃的條件下反應5~10小時左右，或於100℃的條件下反應數分鐘程度，再使反應停止即可。理想者，可於70℃進行反應，反應開始後，於35分鐘使反應停止並迅速冰浴。又，反應可藉由中和反應液來使其停止。又，前述酸並無特別之限制，，例如可使用鹽酸、硫酸、硝酸、三氟醋酸等無機酸及有機酸、陽離子交換樹脂、不溶性的固體試劑等。

同樣地，由化合物24亦可以很有效率地在前述混合物中得到化合物33。舉例來說，可對化合物24混合物適量加入前述酸水溶液，理想者於80℃下進行反應，反應開始後，理想係於60分鐘使反應停止。

又，亦可以酵素來進行水解。此時所用之酵素，係以糖水解酵素為適合，而內(endo)型或外(exo)型任一者之反

應形式的酵素皆可使用。舉例來說，與前述相同，由化合物 24 得到化合物 25 及化合物 29 時，可使用具有將唾液酸由末端切斷之唾液酸水解酵素。這種酵素並無特別之限制，只要具有該活性，不論市售的酵素、新穎的分離酵素、遺傳工程上製作之酵素皆可。酵素反應只要根據習知之條件即可，此時，可與前述相同，以薄層色層分析來追蹤反應之進行，並於化合物 25 及 29 可得到最多之處使反應停止即可。

使用含有上述所得之糖鏈天門冬醯胺的混合物，並於其上導入脂溶性之保護基。該保護基並無特別之限制，舉例來說，可使用 Fmoc 基及第三丁基氧羰 (Boc) 基、苄基、烯丙基、烯丙氧碳酸酯基、乙醯基等的碳酸酯系或醯胺系的保護基等。基於所得到的糖鏈天門冬醯胺衍生物可馬上使用於期望的糖胜肽合成上之觀點，該保護基係以 Fmoc 基及 Boc 基為理想，而 Fmoc 基則更為理想。Fmoc 基係於烯丙基等較為酸性之條件下，不安定的糖存在於糖鏈上時，特別有效。又，保護基之導入方法可根據習知方法 (例如可參照 Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6) 即可。

舉例來說，使用 Fmoc 基時，可對於含有糖鏈天門冬醯胺之混合物加入適量丙酮之後，再進一步加入第基甲基-N-琥珀酸基碳酸酯及碳酸氫鈉進行溶解，藉由在 25℃ 進行 Fmoc 基與天門冬醯胺殘基之鍵結反應，而可將 Fmoc 基

導入於該糖鏈天門冬醯胺殘基上。

根據以上之步驟，就可以得到導入有脂溶性保護基之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物。

然後，在步驟(b)中將糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物，於習知之色層分析，特別是分取型的色層分析中，分離出各種糖鏈天門冬醯胺衍生物。又，在此步驟中，前述步驟(a)所得到之糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物，其係可直接使用。但基於有效率地得到具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物的觀點，可進一步將該混合物中所含之糖鏈天門冬醯胺衍生物進行水解，而將一部分糖殘基事先切斷，並使用該得到之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物。又，糖殘基切斷之程度可與前述相同。且，水解亦可與前述相同。

舉例來說，若係化合物3及7時，而要從化合物2及6的混合物中將其等分離出來時，可將該混合物供注於使用半乳糖水解之水解處理(程序)中，所得到之混合物再以HPLC就可進一步容易地分離出化合物3及7，同時並可大量地得到各種單一化合物型態之化合物。

各糖鏈天門冬醯胺衍生物以色層分析法所進行之分離，可利用適當、習知的色層分析法，單獨或複數地加以組合來進行。

舉例來說，可將所得到之糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物以凝膠過濾管柱色層分析法純化後，再使用HPLC進行純化。在HPLC中所使用之管柱係以逆相系之管柱為理想

。舉例來說，ODS、苯基系、腈系及陰離子系的管柱，具體言之，如法瑪西亞公司製之Mono Q管柱、雅朵洛公司製之雅朵洛微珠管柱等。分離條件等只要參照適當、習知之條件調整即可。根據以上之步驟，就可由糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物得到期望的各個糖鏈天門冬醯胺衍生物。在圖7中所表示者，即本發明之糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法中之步驟的一個例子。

進一步，藉由將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物進行水解，就可以有效率地得到具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物[步驟(b')]。舉例來說，在糖鏈天門冬醯胺衍生物的分離階段，限制混合物中所含之糖鏈天門冬醯胺衍生物的種類，就可大略地分離糖鏈天門冬醯胺衍生物，然後再水解，舉例來說，藉由使用糖水解酵素進行水解，就可以有效率地得到具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物。又，水解亦可與前述相同地進行。但特別言之，基於更有效率地得到具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物的觀點，糖殘基的切斷方式係使用明確的糖水解酵素進行水解者為理想。

舉例來說，除去半乳糖殘基的化合物2及6的化合物3及7，其變換(步驟)(圖8)可將化合物2及6溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用半乳糖水解酵素，進行半乳糖殘基的切斷反應而得到。又，化合物2及6，其即使是包含混合物型態，亦可以個別地進行分離。在此反應所使用

之半乳糖水解酵素，係以使用市售的習知外(Exo-)型酵素為理想。又，其只要是具有同樣的活性者，可為剛被分離之酵素，亦可為遺傳工程上所製作者。再者，與前述相同，可將反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)供注於色層分析中，再得到各糖鏈天門冬醯胺衍生物亦可。舉例來說，係以HPLC(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=82：15)進行分離為理想。

● 除去N-乙醯葡糖胺殘基的化合物3及7的化合物4及8，其變換(步驟)(圖8)可將化合物3及7溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用N-乙醯葡糖胺水解酵素，進行N-乙醯葡糖胺殘基的切斷反應而得到。又，亦可使用N-乙醯己糖胺水解酵素。又，化合物3及7，其即使是包含混合物型態，亦可以個別地進行分離。在此反應所使用之各酵素，係以使用市售的習知外(Exo-)型酵素為理想。又，其

● 只要是具有同樣的活性者，可為剛被分離之酵素，亦可為遺傳工程上所製作者。再者，與前述相同，可將反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)供注於色層分析中，再得到各糖鏈天門冬醯胺衍生物亦可。舉例來說，係以HPLC(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=65：35或50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=82：15)進行分離為理想。

除去甘露糖殘基的化合物4及8的化合物5及9，其變換

(步驟)(圖8)可將化合物4及8溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用甘露醣水解酵素，進行甘露醣殘基的切斷反應而得到。又，化合物4及8，其即使是包含混合物型態，亦可以個別地進行分離。在此反應所使用之甘露醣水解酵素，係以使用市售的習知外(Exo-)型酵素為理想。又，其只要是具有同樣的活性者，可為剛被分離之酵素，亦可為遺傳工程上所製作者。再者，與前述相同，可將反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)供注於色層分析中，再得到各糖鏈天門冬醯胺衍生物亦可。舉例來說，係以HPLC(ODS管柱，展開溶劑可適當地混合使用為10-200 mM醋酸銨等緩衝溶液與乙腈，或以乙醇、甲醇、丁醇或丙醇等具脂溶性的水溶性有機溶劑。在此舉例則為，50 mM醋酸銨：乙腈=82：18作為展開溶劑)進行分離為理想。

除去半乳糖殘基的化合物10的化合物11，其變換(步驟)(圖9)可將化合物10溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用半乳糖水解酵素，進行半乳糖殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，糖鏈天門冬醯胺衍生物的分離，舉例來說，係以HPLC(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=85：15)進行分離為理想。

又，可進一步將化合物11使用任意的糖水解酵素，進

行水解，而變換成各種的糖鏈天門冬醯胺衍生物(舉例來說，化合物 11、12 及 13 等)。

除去 N-乙醯葡糖胺殘基的化合物 11 的化合物 12，其變換(步驟)(圖 9)可將化合物 11 溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用 N-乙醯葡糖胺水解酵素，進行 N-乙醯葡糖胺殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，糖鏈天門冬醯胺衍生物之分離，舉例來說，係以 HPLC (ODS 管柱，展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液：乙腈 = 85：18) 進行分離為理想。

除去甘露醣殘基的化合物 12 的化合物 13，其變換(步驟)(圖 9)可將化合物 12 溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用甘露醣水解酵素，進行甘露醣殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，各糖鏈天門冬醯胺衍生物之分離，舉例來說，係以高速液體管柱色層分析(ODS 管柱，展開溶劑為 50 mM 醋酸銨：乙腈 = 82：18)進行分離為理想。

化合物 3 及 7 變換為化合物 14 及 19，其變換(步驟)(圖 10)可將化合物 3 及 7 溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用唾液酸水解酵素，進行唾液酸殘基的切斷反應而得到

。又，化合物 3 及 7，其即使是包含混合物型態，亦可以個別地進行分離。在此反應所使用之唾液酸水解酵素，係以使用市售的外(Exo-)型酵素為理想。又，其只要是具有同樣的活性者，可為剛被分離之酵素，亦可為遺傳工程上所製作者。再者，與前述相同，可將反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)供注於色層分析中，再得到各糖鏈天門冬醯胺衍生物亦可。舉例來說，係以高速液體管柱色層分析(ODS管柱，展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液：乙腈 = 85：15)進行分離為理想。

除去 N-乙醯葡糖胺殘基的化合物 14 及 19 的化合物 15 及 20，其變換(步驟)(圖 10)可將化合物 14 及 19 溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用 N-乙醯葡糖胺水解酵素，進行 N-乙醯葡糖胺殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，各糖鏈天門冬醯胺衍生物係以高速液體管柱色層分析(ODS管柱，展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液：乙腈 = 82：18)進行分離為理想。

除去甘露糖殘基的化合物 15 及 20 的化合物 16 及 21，其變換(步驟)(圖 10)可將化合物 15 及 20 溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，與前述相同，可根據習知之條件使用甘露糖水解酵素，進行甘露糖殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反

應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，各糖鏈天門冬醯胺衍生物係以高速液體色層分析(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈＝82：18)進行分離為理想。

除去半乳糖殘基的化合物16及21的化合物17及22，其變換(步驟)(圖11)可將化合物16及21溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，根據習知之條件使用半乳糖水解酵素，進行半乳糖殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，各糖鏈天門冬醯胺衍生物的分離，舉例來說，係以高速液體色層分析(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈＝85：15)進行分離為理想。

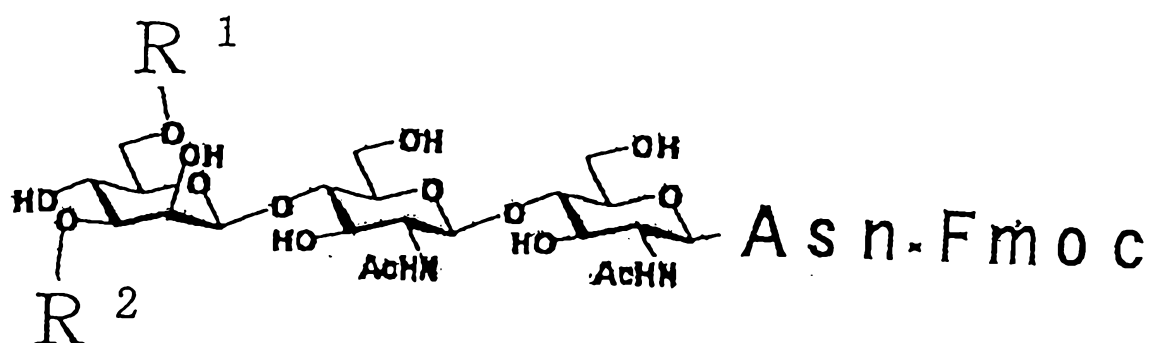
除去N-乙醯葡糖胺殘基的化合物17及22的化合物18及23，其變換(步驟)(圖11)可將化合物17及22溶解於緩衝液(舉例來說，磷酸緩衝溶液、醋酸緩衝溶液、良好緩衝溶液等)中，與前述相同，根據習知之條件使用N-乙醯葡糖胺水解酵素，進行N-乙醯葡糖胺殘基的切斷反應而得到。反應後所得到之反應液(糖殘基被切斷之糖鏈天門冬醯胺衍生物的混合物)中，各糖鏈天門冬醯胺衍生物，舉例來說，係以高速液體管柱色層分析(ODS管柱，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈＝82：18)進行分離為理想。

如此，在得到各糖鏈天門冬醯胺衍生物之後，可進一步使用各種糖水解酵素等，將該衍生物水解，並藉由除去

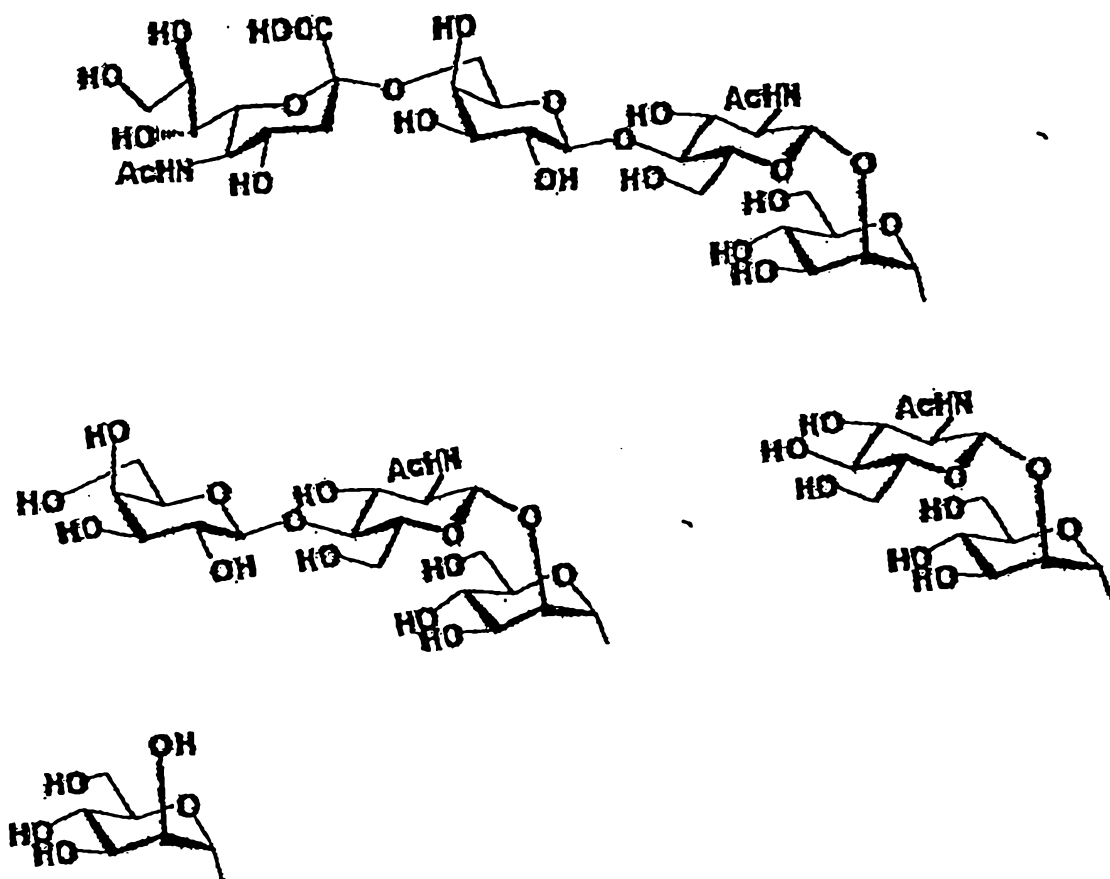
糖鏈非還原末端的糖殘基，舉例來說，而各自以單一化合物之型態，得到糖鏈末端的分枝構造為不均勻的各種糖鏈天門冬醯胺衍生物。又，可使用各種糖水解酵素，藉由改變水解之順序及其種類，就可製造出更多種類的糖鏈天門冬醯胺衍生物。

根據過去的方法，欲以分析規模得到具有極限糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物時，必須花費極大的時間及費用，但若根據本發明，不需要特別的裝置及試劑，只要使用慣用的凝膠過濾管柱、HPLC管柱，以及至少3種的糖水解酵素(例如，牛乳糖水解酶、甘露糖水解酶、N-乙酰葡萄糖胺水解酶)等，便可以二週左右的時間，製作得到一克左右具有期望糖鏈構造的糖鏈天門冬醯胺衍生物。

根據以下的步驟，舉例來說，保護基若為Fmoc基時，可以很有效率地製得具有下述一般式的糖鏈天門冬醯胺衍生物。

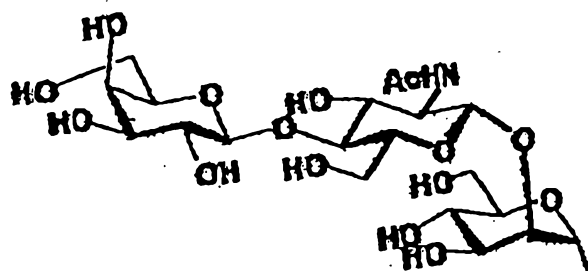


(式中， R^1 及 R^2 為H、



或

其可為相同或相異，但， R^1 及 R^2 同時為

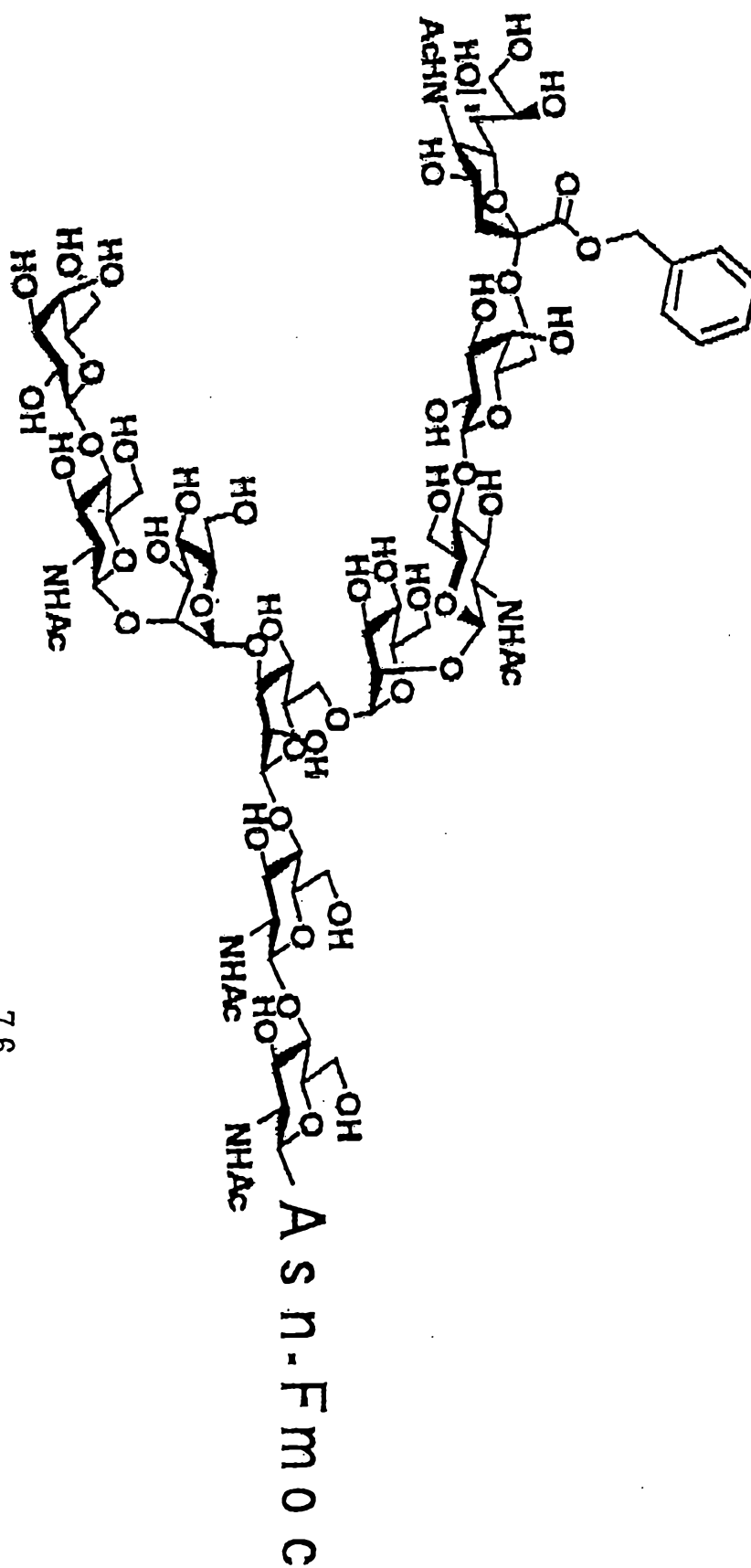


時除外)。

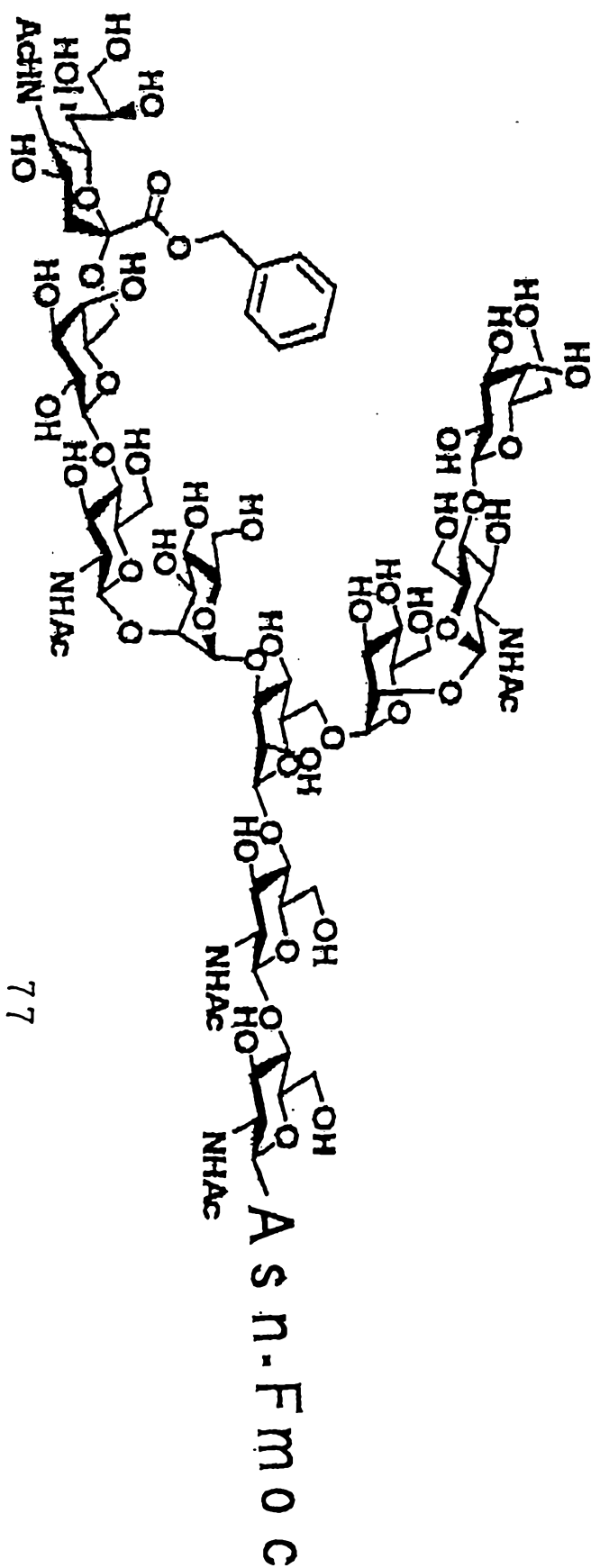
這種糖鏈天門冬醯胺衍生物，具體言之，例如有圖1及圖2所示之各化合物。其中，特別是化合物1、化合物2~9、11~23、70及71，係由本發明所首次製得者。本發明(之範圍)係包含該化合物。

又，本發明之糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法，其理想態樣係提供一糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法，其

步驟(a)係使用一含有在非還原末端具有唾液酸殘基之1種或2種以上的糖鏈天門冬醯胺之混合物，在該混合物所含有之糖鏈天門冬醯胺上導入Fmoc基，同時將苄基導入唾液酸殘基上，而得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟。根據這種製造方法，就可以大量地更有效率地獲得各種型式的糖鏈天門冬醯胺衍生物。舉例來說，可以提高圖1所示的化合物2及6的分離效率，並有效率地進行該二化合物之製造。亦即，由化合物2及6的混合物直接明確地進行二化合物之分離，在效率上是十分不利的，但在本態樣中，若在二化合物的唾液酸殘基上導入苄基，並將以下的化合物76及77的混合物，



76



加入前述步驟(b)中時，由於化合物76及77的分離可以比較地容易進行之故，可將兩化合物分離，然後再將苺基根據後述之方法使其脫離時，便可由化合物2及6的混合物中，有效率地將二化合物分離而得到。

化合物2及6的分離為相當困難，但在其等的唾液酸殘基上導入苺基而得到之化合物76及77的分離卻係容易者，乃因在唾液酸殘基的羧基上導入高脂溶性的苺基，並藉由與HPLC(高速液體色層分析)的逆相管柱間的疏水性相互作用，而被進一步提高(分離效率)的緣故。因此，推測在分離步驟(b)上，因與適當使用的逆相系管柱間的相互作用被明顯地提昇，結果造成更敏銳地反映糖鏈構造之差別，而可以分離出二化合物。

關於含有在非還原末端具有1種或2種以上的唾液酸殘基之糖鏈天門冬醯胺的混合物，只要是含有具有這種構造的糖鏈天門冬醯胺1種或2種以上的混合物者即可，並無特別之限制。基於易於獲得之觀點，係以含有在非還原末端具有唾液酸殘基，而還原末端則鍵結有天門冬醯胺的糖鏈1種或2種以上的混合物為理想。該混合物，係以含有前述圖3所示之化合物24及/或該化合物中缺失1個以上的糖殘基之化合物者為理想。

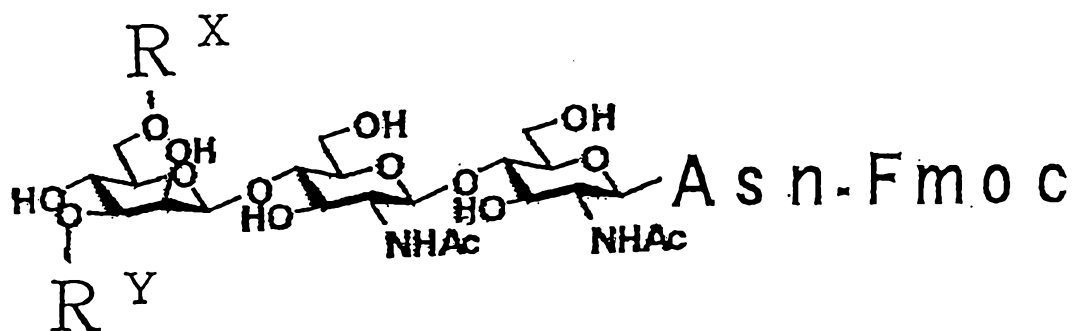
又，基於更有效率地獲得具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物的觀點，係以實施前述步驟(b')者為理想。

又，本態樣中，係可各自地製得糖鏈天門冬醯胺衍生

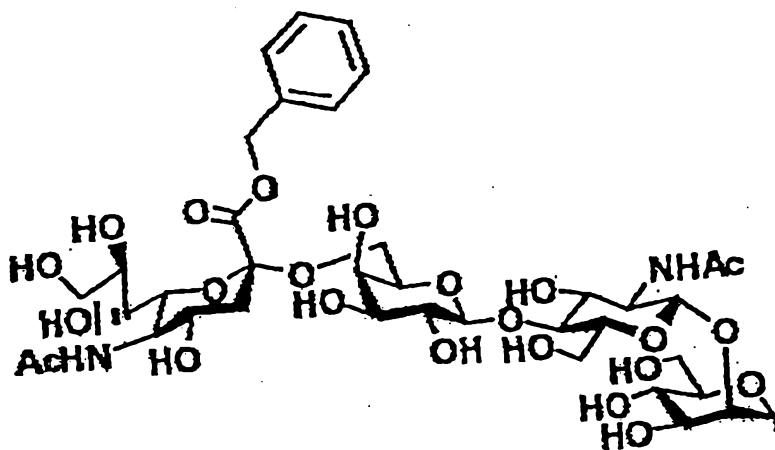
物導入有苄基及Fmoc基者，以及只有導入Fmoc基者。

關於苄基導入糖鏈天門冬醯胺的唾液酸殘基，只要根據習知之方法（例如參照 Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6）即可。

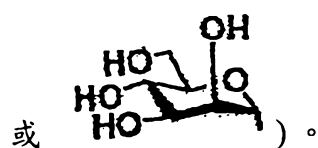
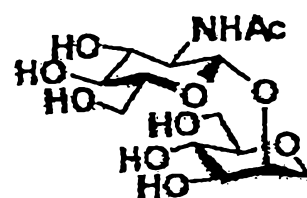
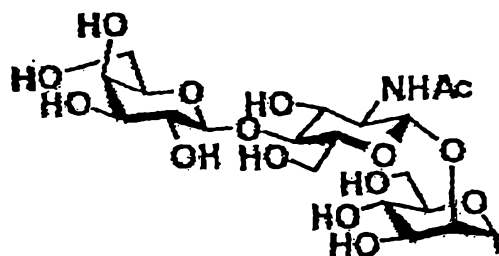
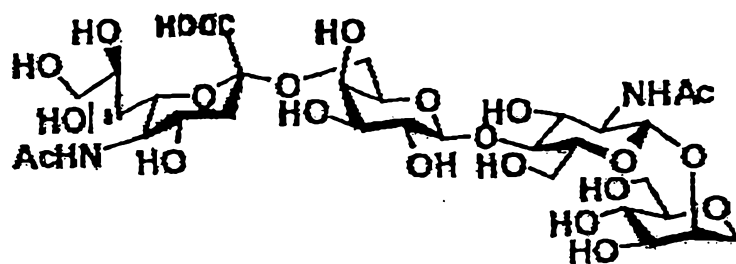
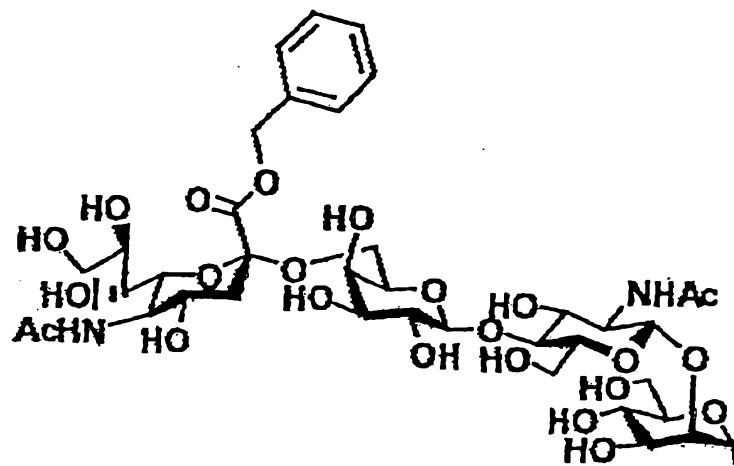
根據以上的步驟，舉例來說，可以有效率地得到具有下述一般式：



（式中， R^X 及 R^Y 係一者為



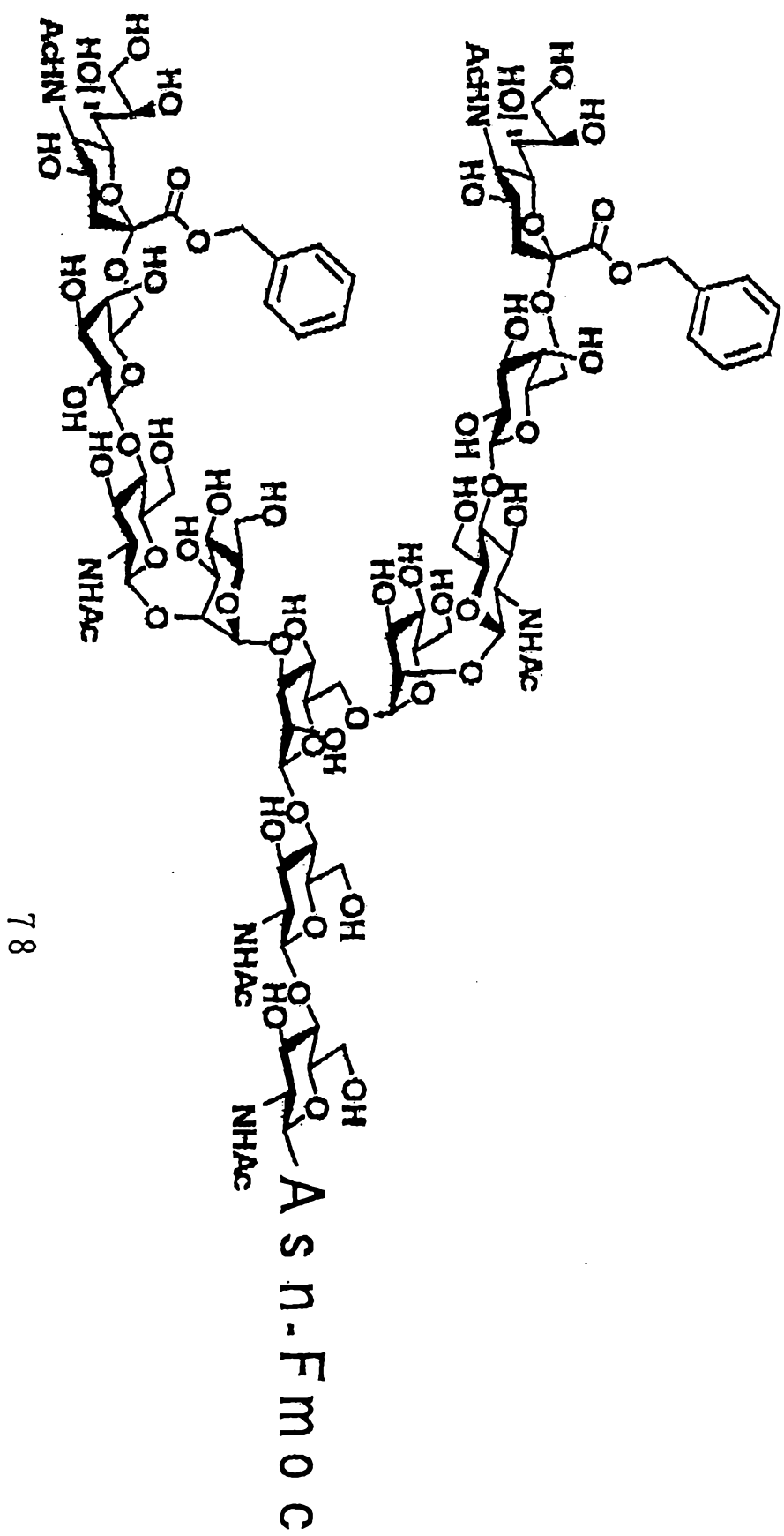
，另一者為H、



同時又導入有苄基及Fmoc基之糖鏈天門冬醯胺衍生物。這種糖鏈天門冬醯胺衍生物，具體言之，有前述化合物76及77，以及以下的化合物78：

(39)

發明說明續頁



78

。根據本態樣所獲得之糖鏈天門冬醯胺衍生物，可直接使用於糖胜肽的固相合成。存在於該糖鏈天門冬醯胺衍生物的唾液酸殘基上之羧基，由於可藉由苄基而受到保護之故，相較於沒有導入苄基之糖鏈天門冬醯胺衍生物，其優點就是在糖胜肽的固相合成上，不會有該羧基所參與之副反應，且可很有效率地得到期望之糖胜肽。

又，本發明係提供一糖鏈天門冬醯胺的製造方法，其可大量地得到各種分離的糖鏈天門冬醯胺。該方法所包含之步驟，係根據前述糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法，而繼續的糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造步驟，進一步，再由所得到之糖鏈天門冬醯胺衍生物除去保護基的步驟。

亦即，本發明的糖鏈天門冬醯胺之製造方法，係包含(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，導入脂溶性的保護基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；以及

(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基，加以除去。

步驟(a)及步驟(b)，係與前述糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法相同，所使用之包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，以及脂溶性的保護基，亦與前述相同。

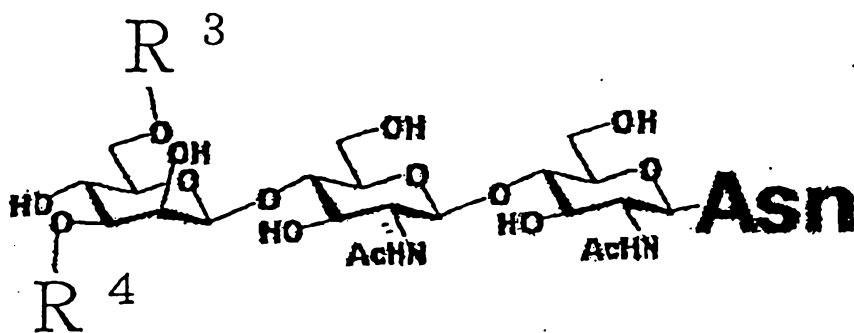
步驟(c)中，由糖鏈天門冬醯胺衍生物將保護基除去之方法，可根據習知者進行即可(舉例來說，參照 Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6)。舉例來說，保護基若為 Fmoc 基時，如圖 12 所示之模式者，可在 N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中，於糖鏈天門冬醯胺衍生物上加入嗎啉以進行反應，便可以除去 Fmoc 基。又，Boc 基亦可藉由弱酸反應而加以除去。除去保護基後，可根據期望，以例如凝膠過濾管柱、使用離子交換管柱等之各種層析法，以及 HPLC 分離方法來進行純化，而得到糖鏈天門冬醯胺亦可。

又，與前述糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法相同，本發明之糖鏈天門冬醯胺之製造方法的理想態樣，係提供一糖鏈天門冬醯胺衍生物的製造方法，其步驟(a)係使用一含有在非還原末端具有唾液酸殘基之 1 種或 2 種以上的糖鏈天門冬醯胺之混合物，在該混合物所含有之糖鏈天門冬醯胺上導入 Fmoc 基，同時將苄基導入唾液酸殘基上，而得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟。在此態樣中，步驟(c)除了除去 Fmoc 基外，更除去苄基。苄基之除去，只要根據習知方法進行即可(舉例來說，參照 Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6)。

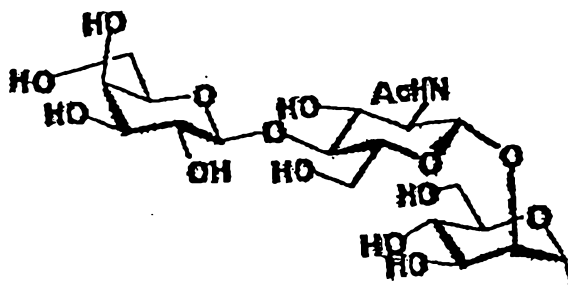
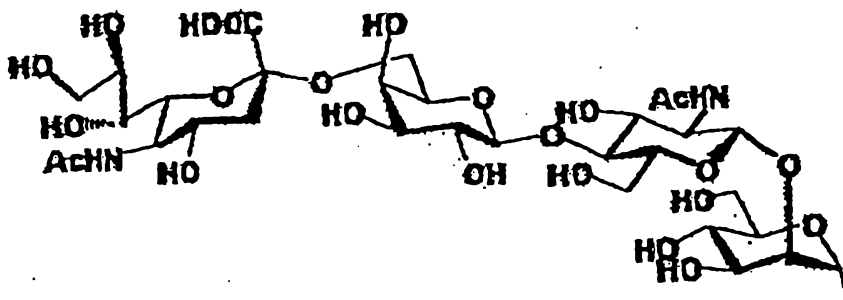
進一步，基於有效率地得到具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺，理想者係將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯

胺衍生物進行水解，及/或將步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺進行水解。又，水解亦可與前述同樣地進行。基於更有效率地獲得具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺的觀點，係以使用糖水解酵素來進行水解者[步驟(b')及/或步驟(c')]為更理想。

根據以上的步驟，舉例來說，可以有效率地獲得具有下述一般式的糖鏈天門冬醯胺：

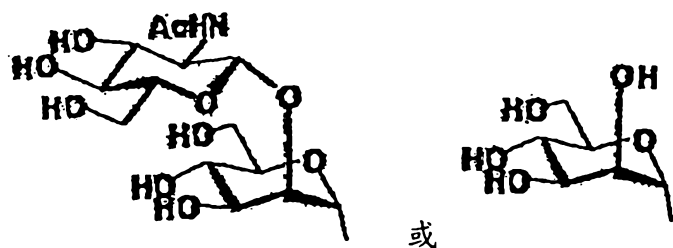


(式中， R^3 及 R^4 為H、

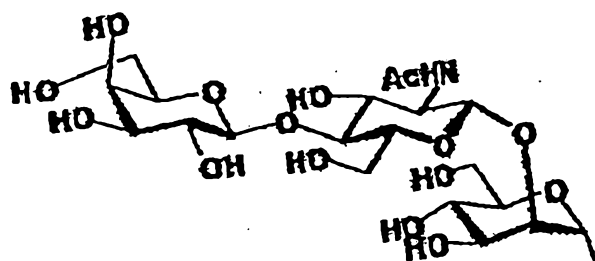
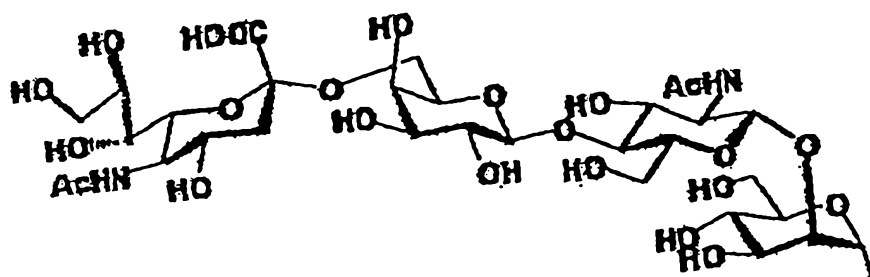


(43)

發明說明續頁



，其可為相同或相異，但， R^3 及 R^4 同時為



或

之情況除外)。

這種糖鏈天門冬醯胺，具體而言，例如有圖3及圖4所示之各化合物。其中，特別是化合物25~32、34~46、72及73，皆係本發明所首次製造者。本發明之範圍包含該等化合物。

進一步，本發明係提供糖鏈的製造方法，其可大量地獲得各種分離之糖鏈。該方法除了依據前述糖鏈天門冬醯胺之製造方法外，在糖鏈天門冬醯胺的製造步驟之後，進一步，還包含由所得到之糖鏈天門冬醯胺除去糖鏈天門冬醯胺殘基之步驟。

亦即，本發明之糖鏈的製造方法係包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於含有包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物的該糖鏈天門冬醯胺上，導入脂溶性的保護基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；

(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基，加以除去；以及

(d)獲得糖鏈之步驟，其係將步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺的天門冬醯胺殘基，加以除去。

步驟(a)~(c)，係與前述糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法相同，所使用之包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，以及脂溶性的保護基，亦與前述相同。

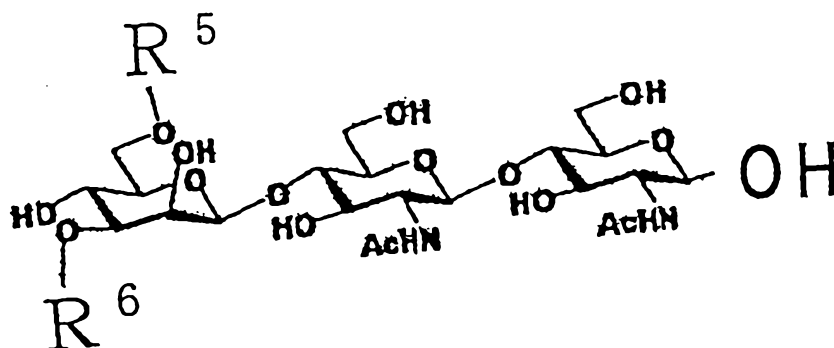
又，本發明的糖鏈之製造方法中，其理想態樣，係提供一糖鏈天門冬醯胺的製造方法，其步驟(a)係使用一含有在非還原末端具有唾液酸殘基之1種或2種以上的糖鏈天門冬醯胺之混合物，在該混合物所含有之糖鏈天門冬醯胺上導入Fmoc基，同時將苄基導入唾液酸殘基上，而得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟。在此態樣中，步驟(c)除了除去Fmoc基外，更除去苄基。苄基之除去，只要根據前述方法進行即可。

步驟(d)中，由糖鏈天門冬醯胺除去天門冬醯胺殘基，可根據習知之方法進行即可。舉例來說，如圖12所示之模

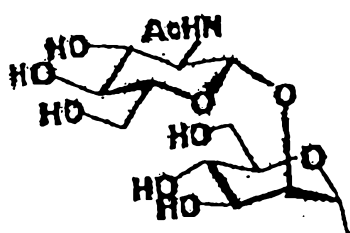
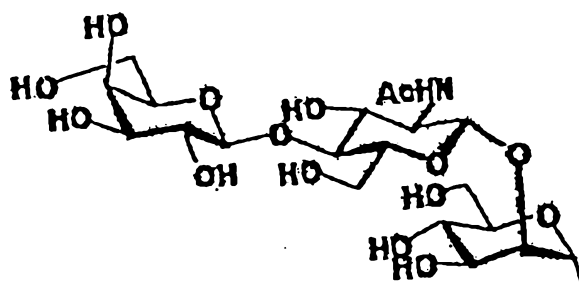
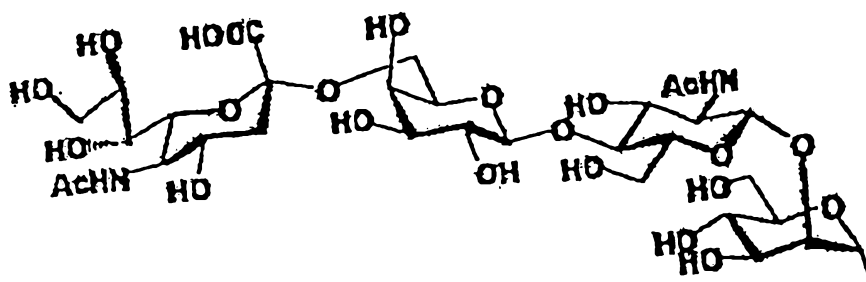
式者，可將糖鏈天門冬醯胺與無水聯胺反應之後，藉由乙醯化除去天門冬醯胺殘基，便可以得到糖鏈。又，將糖鏈天門冬醯胺以鹼性水溶液加熱還流之後，亦可藉由乙醯化除去天門冬醯胺殘基而得到糖鏈。在除去天門冬醯胺殘基後，可根據期望以適當、習知之方法，例如凝膠過濾管柱、使用離子交換樹脂等之各種色層分析法，以及HPLC分離等方法，來進行純化。

進一步，與前述相同，基於有效率地獲得期望糖鏈構造之糖鏈的觀點，係以將步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物水解，及/或將步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺水解，及/或將步驟(d)所得到之糖鏈水解者，較為理想。又，水解可與前述同樣地進行。基於更有效率地獲得具有期望糖鏈構造之糖鏈的觀點，係以使用糖水解酵素來進行水解者[步驟(b')及/或步驟(c')及/或步驟(d')]為更理想。

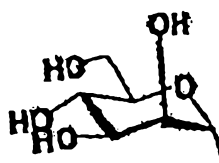
根據以上的步驟，舉例來說，可以有效率地獲得具有下述一般式的糖鏈：



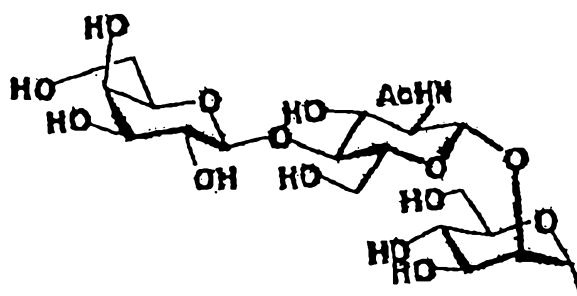
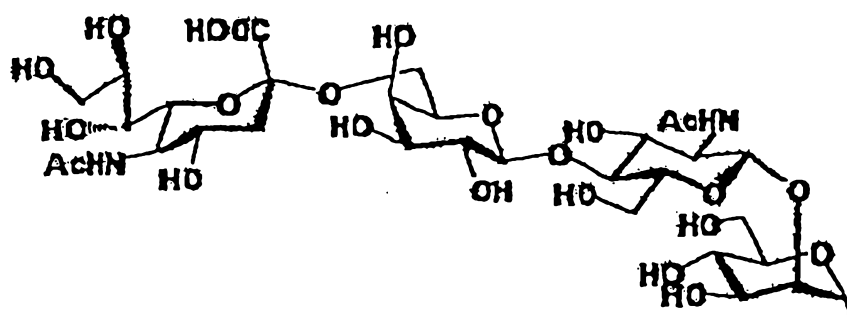
(式中， R^5 及 R^6 為H、

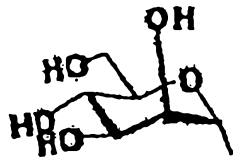
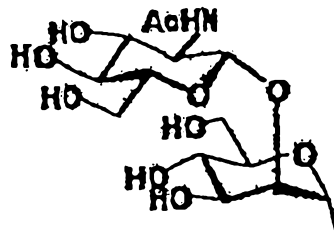


或



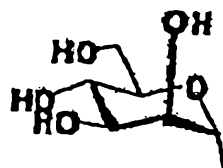
，其可為相同或相異，但， R^5 及 R^6 同時為





或

，或者 R^5 或 R^6 之一者為 H，



同時另一者為

之情況除外)。

這種糖鏈天門冬醯胺，具體而言，例如有圖 5 及圖 6 所示之各化合物。其中，特別是化合物 48~55、57~69、74 及 75，皆係本發明所首次製造者。本發明之範圍包含該等化合物。

如此地，根據本發明，便可大量地以價格，有效率地製得具有期望糖鏈構造之糖鏈天門冬醯胺衍生物、糖鏈天門冬醯胺及糖鏈(以下，亦有將三者合併稱為糖鏈之情形)。

這種糖鏈在醫藥品開發等領域上非常有用。舉例來說，其應用例之一有癌症的疫苗。已知細胞若發生癌化情形時，會有體內所無之糖鏈的發生。又，已知若以化學合成該糖鏈，並作成疫苗投與至個體時，將可控制癌症的增殖情形。由此，只要能根據本發明製造期望之糖鏈時，就可

能以有效疫苗之合成來進行癌症的治療。又，亦可將本發明所得之糖鏈，進一步地利用化學反應及糖轉移酵素反應等組合，使其與新的糖殘基結合成為衍生物，而合成新穎的疫苗。

又，舉例來說，紅血球生成素(EPO)可藉其紅血球增殖能力，而作為貧血的治療藥品，但此EPO若未鍵結糖鏈時，已知將不具有活性。如此地，由於蛋白質藉由糖鏈之鍵結可表現其生理活性之故，舉例來說，可在無法鍵結糖鏈之大腸菌表現系中，僅大量地製作蛋白質，然後再將具有期望糖鏈構造、且由本發明所製造之糖鏈導入時，就可以賦予其生理活性之表現，又，藉由在任意的蛋白質上，導入具有各種糖鏈構造、且由本發明所製造之糖鏈時，就可以合成具有新穎生理活性的新穎糖蛋白質。

又，存在於天然的糖蛋白質上之糖鏈，可藉由與本發明所製造之糖鏈取代，而賦予其新穎的生理活性。將糖蛋白質所具有的糖鏈取代成本發明所得到之糖鏈，舉例來說，有P. Sears and C. H. Wong, Science, 2001, vol 291, p 2344-2350所記載之方法。亦即，將糖蛋白質以 β -N-乙醯葡糖胺酵素(Endo-H)處理，就可造成蛋白質表面的天門冬醯胺殘基上，僅鍵結一個N-乙醯葡糖胺殘基之狀態。然後，再使用 β -N-乙醯葡糖胺酵素(Endo-M)，就可將本發明所得到之糖鏈天門冬醯胺(舉例來說，圖3及圖4之各化合物)中的期望糖鏈，鍵結至前述的N-乙醯葡糖胺殘基上。又，若將N-乙醯葡糖胺鍵結至tRNA上，利用大腸菌等

的表現系合成具有 N-乙醯葡糖胺之糖蛋白質後，亦可以使用 Endo-M，而將本發明所獲得之糖鏈天門冬醯胺中期望的糖鏈導入。

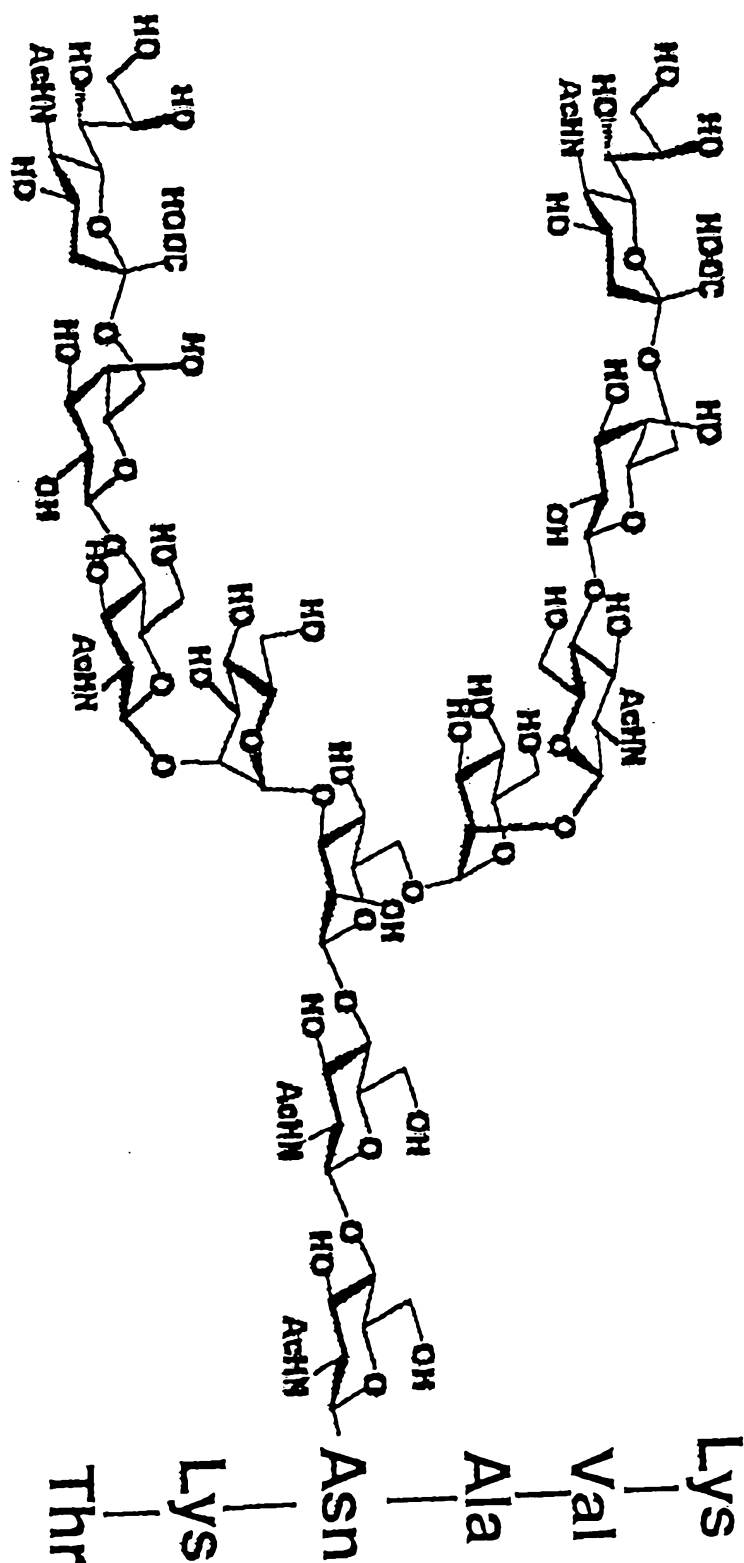
又，現在在將糖蛋白質作為治療藥使用時，其問題是所被投與之糖蛋白質的代謝速度太快。此乃是在糖蛋白質的糖鏈末端所存在之唾液酸，若在生體內一被除去時，該糖蛋白質馬上會被肝臟所代謝所致。因此，投與某程度的量之該糖蛋白質是有必要的。基此，根據本發明，將糖鏈末端很難除去之唾液酸重新地重組至糖鏈上，在對象蛋白質上利用 Endo-M 將該糖鏈導入時，就有可能降低所投與之糖蛋白質的量。

以下，茲以實施例具體地說明本發明，但本發明並不限於這些實施例。各化合物之構造式及編號係表示於圖 1~圖 6 中。又， $^1\text{H-NMR}$ 的資料，其測定之條件，在實施例 1~7 是 30°C 下 HOD 為 4.8 ppm，在實施例 8~45 是 30°C 下丙酮的甲基訊號為 2.225 ppm，且 HOD 為 4.718 ppm。又，關於 Fmoc 基被除去之化合物，則是於測定溶劑中共存有 50 mM 的碳酸氫銨下所測定得到者。

實施例 1 化合物 24 之合成

將從蛋得到之粗純化 SGP(唾液酸基糖胜肽) 2.6 克，溶解於 Tris-鹽酸・氯化鈣緩衝溶液 (TRIZMA BASE 0.05 莫爾 / 升、氯化鈣 0.01 莫爾 / 升、pH 7.5) 100 毫升中。在其上加入疊氮化鈉 58 毫克 (772 μmol) 及肌動蛋白酵素-E 526 毫克 (科研製藥公司製)，於 37°C 下靜置。65 小時後，再加入 263

毫克之肌動蛋白酵素-E，又再於37℃下靜置24小時。將此溶液冷凍乾燥之後，將殘餘物質以凝膠過濾管柱層析(Sephadex G-25，2.5 ϕ $\times$ 1 m，展開溶劑為水，流速為1.0毫升/分)純化二次，而得到如圖3所示，1.3克(555 μ mol)的目的化合物24。該SGP所含之糖鏈構造，係表示如下。



又，所得到之化合物 24，其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

5.15 (1H, s, Man4- H_1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1- H_1), 4.95

(1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 3.03 (1H, dd, Asn-β CH), 3.00 (1H, dd, Asn-β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.15 (18H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax})

實施例2 化合物1、2、6及10之合成

將實施例1所得到之化合物24 (609毫克, 261 μmol)溶解於水20.7毫升中, 進一步加入0.1規定鹽酸13.8毫升。將此溶液在70°C下加熱35分鐘後迅速冷卻, 加入飽和碳酸氫鈉使成為pH 7。將其冷凍乾燥之後, 殘留物質以凝膠過濾層析管柱(Sephadex G-25, 2.5 φ × 1 m, 展開溶劑為水, 流速為1.0毫升/分)進行純化, 而得到如圖3所示, 534毫克的化合物24、化合物25、29及化合物33之混合物。不要將該四成分各自分離, 而進行下列步驟。

又, 所得到之糖鏈混合物, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

5.13 (s, Man4-H₁), 5.12 (s, Man4-H₁), 5.01 (d, GlcNAc1-H₁), 4.94 (s, Man4'-H₁), 4.93 (s, Man4'-H₁), 4.82 (s, Man3-H₁), 4.60 (d, GlcNAc2-H₁), 4.58 (d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.47 (dd, Gal6, 6'-H₁), 4.44 (d, Gal6, 6'-H₁), 4.24 (d, Man3-H₂), 4.19 (d, Man4'-H₂), 4.11 (d, Man4-H₂), 2.97 (bdd, Asn-β CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H_{3eq}, NeuAc7-H_{3eq}),

2.64 (bdd, Asn- β CH), 2.15 (s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H_{3ax}, NeuAc7'-H_{3ax})

將得到之糖鏈混合物 429 毫克溶解於丙酮 16.3 毫升及水 11.2 毫升中。在其上加入 9-氟苄基甲基-N-琥珀酸基碳酸酯 (155.7 毫克, 461.7 μ mol) 及碳酸氫鈉 (80.4 毫克, 957 μ mol), 於室溫下攪拌二小時。將該溶液以蒸發器除去丙酮, 再將殘餘的溶液以凝膠過濾層析管柱 (Sephadex G-25, 2.5 ϕ $\times$ 1 m, 展開溶劑為水, 流速為 1.0 毫升/分) 進行純化, 而得到如圖 1 所示, 309 毫克的化合物 2、6 及化合物 10 之混合物。將該混合物以 HPLC (ODS 管柱, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 乙腈 = 65:35, 2.0 ϕ $\times$ 25 cm, 流速為 3 毫升/分) 進行純化, 其分別之溶離時間為, 化合物 1 為 51 分鐘後; 化合物 2 及 6 之混合物為 67 分鐘後; 化合物 10 為 93 分鐘後。將其各自分取並進行冷凍乾燥後, 以凝膠過濾層析管柱 (Sephadex G-25, 2.5 ϕ $\times$ 30 cm, 展開溶劑為水, 流速為 1.0 毫升/分) 進行純化, 而得到目的之化合物 2 及 6 混合物 150 毫克。

又, 所得到之化合物 1, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d,

Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 3.03 (1H, bdd, Asn-β CH), 3.00 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.15 (18H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax}) ; HRMS C₁₀₃H₁₅₄N₈NaO₆₆ [M+Na⁺] 理論值 2581.8838, 實測值 2581.8821。

又, 所得到之化合物 2 及 6, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc), 5.14 (s, Man4-H₁), 5.12 (s, Man4-H), 5.00 (d, GlcNAc1-H₁), 4.94 (s, Man4'-H₁), 4.93 (s, Man4'-H₁), 4.82 (s, Man3-H₁), 4.60 (d, GlcNAc2-H₁), 4.58 (d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.46 (dd, Gal6, 6'-H₁), 4.44 (d, Gal6, 6'-H₁), 4.24 (d, Man3-H₂), 4.19 (d, Man4'-H₂), 4.11 (d, Man4-H₂), 2.97 (bdd, Asn-β CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H_{3eq}, NeuAc7-H_{3eq}), 2.64 (bdd, Asn-β CH), 2.15 (s×5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H_{3ax}, NeuAc7'-H_{3ax})

又, 所得到之化合物 10, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.93 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 3.03 (1H, bdd, Asn-β

CH), 3.00 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac); HRMS $C_{81}H_{120}N_6NaO_{50}$ [M+Na⁺] 理論值 1999.6930, 實測值 1999.6939。

實施例 3 化合物 3 及 7 之合成

將實施例 2 所得到之化合物 2 及 6 的混合物 (224 毫克, 97 μ mol) 及牛血清白蛋白 24 毫克, 溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 22 毫升中, 進一步再加入由 *Diplococcus pneumoniae* 衍生的 β -半乳糖酵素 (1.35U)。將該溶液於 37 $^{\circ}$ C 下靜置 15 小時後, 冷凍乾燥。殘留物質再以 HPLC (ODS 管柱, 2.0 ϕ $\times$ 25 cm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 乙腈 = 85:15, 流速為 3 毫升/分) 進行純化, 其分別之分離時間為, 圖 2 所示之化合物 3 為 129 分鐘後; 化合物 7 為 134 分鐘後。將其各自分取並進行冷凍乾燥後, 再以 HPLC (ODS 管柱, 2.0 ϕ $\times$ 25 cm, 展開溶劑為最初 15 分鐘為水, 16 分鐘至 30 分鐘為水: 乙腈 (容量比) = 10:0 至 85:15, 31 分鐘至 45 分鐘為水: 乙腈 = 85:15 至 80:20 的梯度, 流速為 3.0 毫升/分) 進行脫鹽處理, 而得到目的之化合物 3 為 81 毫克, 化合物 7 則為 75 毫克。

又, 所得到之化合物 3, 其物理性質係如下所示。

1 H-NMR (D_2O , 30 $^{\circ}$ C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4- H_1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1- H_1), 4.95 (1H, s, Man4'- H_1), 4.82 (1H, s, Man3- H_1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2- H_1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'- H_1), 4.53 (1H,

d, Gal6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2.61 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.15 (15H, s×5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}); HRMS C₈₆H₁₂₇N₇NaO₅₃ [M+Na⁺] 理論值 2128.7356, 實測值 2128.7363。

又, 所得到之化合物 7, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (1H, d, Gal6-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 4.19 (1H, d, Man4-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H_{3eq}), 2.60 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.15 (15H, s×5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7-H_{3ax}); HRMS C₈₆H₁₂₅N₇Na₃O₅₃ [M+Na⁺] 理論值 2172.6995, 實測值 2172.7084。

實施例 4 化合物 4 及 8 之合成

將實施例 3 所得到之化合物 3 及 7 的混合物 (90 毫克, 47.3 μmol) 不各自分離, 與牛血清白蛋白 8 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 8.1 毫升中, 進一步再加入由牛腎衍生的 β-葡糖胺酵素 (西格瑪亞德利奇公司製) 2.88U。將該溶液於 37°C 下靜置 18 小時後, 冷凍乾燥。殘

留物質再以 HPLC (ODS 管柱, $2.0 \phi \times 25 \text{ cm}$, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 甲醇 = 65:35, 流速為 3 毫升/分) 進行純化, 其分別之溶離時間為, 圖 2 所示之化合物 4 為 117 分鐘後; 化合物 8 為 127 分鐘後。將其各自分取並進行冷凍乾燥後, 再以 HPLC (ODS 管柱, $2.0 \phi \times 25 \text{ cm}$, 展開溶劑為最初 15 分鐘為水, 16 分鐘至 30 分鐘為水: 乙腈 = 10:0 至 85:15, 31 分鐘至 45 分鐘為水: 乙腈 = 85:15 至 80:20 的梯度, 流速為 3 毫升/分) 進行脫鹽處理, 而得到目的之化合物 4 為 40 毫克, 化合物 8 則為 37 毫克。

又, 所得到之化合物 4, 其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4- H_1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1- H_1), 4.94 (1H, s, Man4'- H_1), 4.84 (1H, s, Man3- H_1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2- H_1), 4.67 (1H, d, GlcNAc5- H_1), 4.55 (1H, d, Gal6- H_1), 4.33 (1H, dd, Man3- H_2), 4.20 (1H, dd, Man4- H_2), 4.15 (1H, dd, Man4'- H_2), 2.97 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3eq}), 2.62 (1H, bdd, Asn- β CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'- H_{3ax}); HRMS $\text{C}_{78}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{NaO}_{48}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 理論值 1925.6562, 實測值 1925.6539。

又, 所得到之化合物 8, 其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m,

Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H₁), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.82 (1H, s, Man3-H₁), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.27 (1H, d, Man4'-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn-β CH₂), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2.61 (1H, bdd, Asn-β CH₂), 2.15 (12H, s×4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}); HRMS C₇₈H₁₁₄N₆NaO₄₈ [M+Na⁺]理論值 1925.6562, 實測值 1925.6533。

實施例 5 化合物 5 之合成

將實施例 4 所得到之化合物 4 (30 毫克, 473 μmol) 與牛血清白蛋白 3 毫克, 溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 6 毫升中, 進一步再加入由 Jack 豆衍生的 α-甘露糖苷酵素 10U。將該溶液於 37°C 下靜置 21 小時後, 冷凍乾燥。再以 HPLC (ODS 管柱, 2.0 φ × 25 cm, 展開溶劑為最初 15 分鐘為水, 16 分鐘至 30 分鐘為水: 乙腈 = 10: 0 至 85: 15, 31 分鐘至 45 分鐘為水: 乙腈 = 85: 15 至 80: 20 之梯度, 流速為 3 毫升/分) 進行純化, 而得到目的之圖 1 所示的化合物 5 為 20 毫克。

又, 所得到之化合物 5, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.95 (1H, s, Man4'-H₁), 4.84 (1H, s, Man3-H₁), 4.67 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4.56 (1H, d, GlcNAc5-H₁), 4.44 (1H, d, Gal6-H₁), 4.11 (1H, dd,

Man4'-H₂), 4.07 (1H, dd, Man3-H₂), 2.97 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2.62 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.15 (12H, s×4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}) ; HRMS C₇₂H₁₀₄N₆NaO₄₃ [M+Na⁺]理論值 1763.6034, 實測值 1763.6074。

實施例 6 化合物 9 之合成

將實施例 4 所得到之化合物 8 (40 毫克, 630 μmol) 與牛血清白蛋白 5 毫克, 溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 7.8 毫升中, 進一步再加入由 Jack 豆衍生的 α-甘露糖苷酶 38U。將該溶液於 37℃ 下靜置 63 小時後, 冷凍乾燥。再以 HPLC (ODS 管柱, 2.0 φ × 25 cm, 展開溶劑為最初 15 分鐘為水, 16 分鐘至 30 分鐘為水: 乙腈 = 10: 0 至 85: 15, 31 分鐘至 45 分鐘為水: 乙腈 = 85: 15 至 80: 20 之梯度, 流速為 3 毫升/分) 進行純化, 而得到目的之化合物 9 為 30 毫克。

又, 所得到之化合物 9, 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (D₂O, 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4.53 (1H, d, Gal6-H₁), 4.32 (1H, dd, Man3-H₂), 4.28 (1H, dd, Man4-H₂), 2.81 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H_{3eq}), 2.59 (1H, bdd, Asn-β CH), 2.13 (12H, s×4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7H_{3ax}) ; HRMS C₇₂H₁₀₄N₆NaO₄₃ [M+Na⁺]理論值 1763.6034, 實測值 1763.6041。

實施例 7 Fmoc 基之脫保護 (化合物 33 之合成)

將實施例 2 所得到之化合物 10 (10.5 毫克, 5.27 μmol) 溶解於 50% 嗎啉 / N,N-二甲基亞砷溶液 1.4 毫升中, 於室溫 • 氫氣環境下, 使其反應二小時。在該溶液上加入甲苯 3 毫升, 再置入 35°C 下之蒸發器中。重複該步驟三次, 以除去反應溶劑。將殘留物質以凝膠過濾層析管柱 (Sephadex G-25, 2.5 ϕ $\times$ 30 cm, 展開溶劑為水, 流速為 1.0 毫升/分) 進行純化, 而得到如圖 3 所示, 7 毫克的化合物 33 (產率為 76%)。又, 所得到之化合物構造, 基於 ^1H -NMR 光譜分析與實施例 2 所得之化合物 33 一致的緣故, 確認係化合物 33。

所得到之化合物 33, 其物理性質係如下所示。

^1H -NMR (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, GlcNAc5, 5'-H-1), 4.47 (d, 2H, $J=7.9$ Hz, Gal6, 6'-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, $J=3.2$ Hz, 1.4 Hz, Man4'-H-2), 4.12 (bdd, 1H, $J=3.2$ Hz, 1.4 Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H, $J=4.5$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.93 (dd, 1H, $J=6.8$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, $\text{Ac} \times 2$), 2.01 (s, 3H, Ac)

實施例 8 化合物 14 之合成

將化合物 3 (28 毫克, 21.3 μmol) 與牛血清白蛋白 1.0 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 454 μL) 中, 進一步再加入神經胺酸酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 *Vibrio Cholerae*, 198 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 20 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 $\times$ 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 乙腈 = 80:20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 $\times$ 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 14 (17 毫克, 產率 70%)。所得到之化合物 14 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.4 Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J=1.9 Hz, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.4 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 4.11 (bdd, 1H, J=1.4 Hz, 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.0 Hz, 15.7 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.7

Hz, 15.7 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS $C_{75}H_{110}N_6NaO_{45}$ $[M+Na^+]$ 理論值 1837.6402, 實測值 1837.6471。

實施例 9 化合物 19 之合成

將化合物 7 (20 毫克, 9.4 μ mol) 與牛血清白蛋白 1.6 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 323 μ L) 中, 進一步再加入神經胺酸酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 Vibrio Cholerae, 141 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 18 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。然後, 以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 $\times$ 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 乙腈 = 80:20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 $\times$ 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 19 (13 毫克, 產率 76%)。所得到之化合物, 由於其 ¹H-NMR 之結果與標準品一致之故, 而確認其構造。

實施例 10 化合物 15 之合成

將化合物 4 (45 毫克, 24 μ mol) 與牛血清白蛋白 1.7 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 820 μ L) 中, 進一步再加入神經胺酸酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 Vibrio Cholerae, 134 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 14 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。然後, 將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 $\times$ 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液

：乙腈 = 80 : 20，流速為 4 毫升 / 分) 進行純化。更進一步，以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN，15 × 100 mm，最初以 50 毫升 H₂O 溶離，再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽，而得到目的之化合物 15 (28 毫克，產率 74%)。所得到之化合物 15 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=8.0 Hz, Gal6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J=1.9 Hz, Man3-H-2), 4.11 (bs, 1H, =Man4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.7 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS C₆₇H₉₇N₅NaO₄₀ [M+Na⁺] 理論值 1634.5608，實測值 1634.5564

實施例 11 化合物 70 之合成

將化合物 15 (11 毫克，6.8 μmol) 與牛血清白蛋白 1.5 毫克，一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM，pH 5.0，269 μL) 中，進一步再加入 β-半乳糖酵素 (生化學工業公司製，由 Jack 豆，11 μL，275 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 14 小時後，以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178，20 ×

250 mm，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈＝80：20，流速為4毫升/分)進行純化。更進一步，以ODS管柱(科思摩基75C₁₈-OPN，15×100 mm，最初以50毫升H₂O溶離，再以25%乙腈溶離)進行脫鹽，而得到目的之化合物70(6.3毫克，產率64%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.32 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 4.06 (bs, 1H, J=1.3 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=14.0 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.5 Hz, 14.8 Hz, Asn-β CH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₆₁H₈₈N₅O₃₅ [M+H⁺]理論值1450.5，實測值1450.4

實施例12 化合物20之合成

將化合物8 (47毫克，25 μmol)與牛血清白蛋白1.9毫克，一同溶解於HEPES緩衝溶液(50 mM，pH 5.0，840 μL)中，進一步再加入神經胺酸酵素(西格瑪亞德利奇公司製，由Vibrio Cholerae，369 mU)。將該溶液於37°C下靜置37小時後，以HPLC分析確認反應已經終了。將反應溶液冷凍乾燥，再以HPLC(YMC包裝管柱D-ODS-5 S-5 120A

ODS No. 2020178, 20×250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液：乙腈 = 80：20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15×100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 20 (26 毫克, 產率 65%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.5 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS C₆₇H₉₇N₅NaO₄₀ [M+Na⁺] 理論值 1634.5608, 實測值 1634.5644

實施例 13 化合物 71 之合成

將化合物 20 (12 毫克, 7.4 μ mol) 與牛血清白蛋白 1.0 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 330 μ L) 中, 進一步再加入 β -半乳糖酵素 (生化學工業公司製, 由 Jack 豆, 12 μ L, 297 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 46 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC

(YMC包裝管柱D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈 = 80：20, 流速為4毫升/分)進行純化。更進一步, 以ODS管柱(科思摩基75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以50毫升H₂O溶離, 再以25%乙腈溶離)進行脫鹽, 而得到目的之化合物71 (6.6毫克, 產率61%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.90 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.31 (b, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.8 Hz, 3.3 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.0 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.06, 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₆₁H₈₈N₅O₃₅ [M+H⁺]理論值1450.5, 實測值1450.3

實施例14 化合物16之合成

將化合物5 (32毫克, 18.4 μmol)與牛血清白蛋白2.5毫克, 一同溶解於HEPES緩衝溶液(50 mM, pH 5.0, 713 μL)中, 進一步再加入神經胺酸酵素(西格瑪亞德利奇公司製, 由Vibrio Cholerae, 134 mU)。將該溶液於37°C下靜置17小時後, 以HPLC分析確認反應已經終了。將反應溶液

再以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20×250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液: 乙腈 = 80:20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15×100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 16 (13 毫克, 產率 52%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.5 Hz, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5 Hz, Asn- β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2 Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₆₁H₈₈N₅O₃₅ [M+H⁺] 理論值 1450.5, 實測值 1450.3。

實施例 15 化合物 17 之合成

將化合物 16 (9 毫克, 6.2 μ mol) 與牛血清白蛋白 1.6 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 613 μ L) 中, 進一步再加入 β -半乳糖酵素 (生化學工業公司製, 由 Jack 豆, 186 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 32 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC

包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液 : 乙腈 = 80 : 20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 17 (5.4 毫克, 產率 68%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.89 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.1 Hz, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.09, 4.07 (s, 1H, Man4'-H-2, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.56 (bdd, 1H, J=8.1 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) 理論值 C₅₅H₇₇N₅NaO₃₀ [M+Na⁺] 理論值 1310.5, 實測值 1310.2

實施例 16 化合物 18 之合成

將化合物 17 (3.4 毫克, 2.6 μmol) 與牛血清白蛋白 1.1 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 257 μL) 中, 進一步再加入 N-乙醯基-β-D-葡糖胺酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 Jack 豆, 144 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 24 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No.

2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液 : 乙腈 = 80 : 20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 18 (2.1 毫克, 產率 75%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, 7.5 Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (d, 1H, J=1.6 Hz, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=7.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.07 (d, 1H, J=2.7 Hz, Man4'-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 3.7 Hz, Man3-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.2 Hz, 15.1 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.9 Hz, 15.1 Hz, Asn-β CH), 2.07, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₄₇H₆₅N₄O₂₅ [M+Na⁺] 理論值 1085.4, 實測值 1085.3

實施例 17 化合物 21 之合成

將化合物 9 (28 毫克, 16 μmol) 與牛血清白蛋白 1.7 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 624 μL) 中, 進一步再加入神經胺酸酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 *Vibrio Cholerae*, 117 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 17 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。然後, 將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No.

2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液 : 乙腈 = 80 : 20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 21 (14.6 毫克, 產率 68%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H, J=7.2 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (bd, 1H, J=2.7 Hz, Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.8 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.89 (s, 3H, Ac); MS (Fab) C₆₁H₈₈N₅O₃₅ [M+H⁺] 理論值 1450.5, 實測值 1450.3

實施例 18 化合物 22 之合成

將化合物 21 (10 毫克, 6.9 μmol) 與牛血清白蛋白 1.6 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 672 μL) 中, 進一步再加入 β-半乳糖酵素 (生化學工業公司製, 由 Jack 豆, 205 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 20 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 × 250

mm，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=80：20，流速為4毫升/分)進行純化。更進一步，以ODS管柱(科思摩基75C₁₈-OPN，15×100 mm，最初以50毫升H₂O溶離，再以25%乙腈溶離)進行脫鹽，而得到目的之化合物22(5.6毫克，產率64%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30℃)

δ 7.87 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.67 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.48 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.41 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, J=8.6 Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.26 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, J=2.2 Hz, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.3 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.54 (bdd, 1H, J=9.5 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac); MS (Fab) C₅₅H₇₈N₅O₃₀ [M+H⁺] 理論值1288.5，實測值1288.3

實施例19 化合物23之合成

將化合物22(3.6毫克，2.8 μmol)與牛血清白蛋白1.2毫克，一同溶解於HEPES緩衝溶液(50 mM，pH 5.0，277 μL)中，進一步再加入N-乙酰基-β-D-葡萄糖胺酵素(西格瑪亞德利奇公司製，由Jack豆，195 mU)。將該溶液於37℃下靜置24小時後，以HPLC分析確認反應已經終了。將反應溶液以HPLC(YMC包裝管柱D-ODS-5 S-5 120A ODS No.

2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液 : 乙腈 = 80 : 20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化。更進一步, 以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 23 (2.3 毫克, 產率 77%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 1H, J=6.5 Hz, GlcNAc-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, J=3.0 Hz, Man3-H-2), 4.07 (bdd, 1H, J=2.1 Hz, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.9 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₄₇H₆₅N₄O₂₅ [M+H⁺] 理論值 1085.4, 實測值 1085.3

實施例 20 化合物 11 之合成

將化合物 10 (123 毫克, 62 μmol) 與牛血清白蛋白 1.1 毫克, 一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 2.5 mL) 中, 進一步再加入 β-半乳糖酵素 (生化學工業公司製, 由 Jack 豆, 24 μL, 612 mU)。將該溶液於 37°C 下靜置 61 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液冷凍乾燥, 再以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液

：乙腈 = 80 : 20，流速為 3.5 毫升/分) 進行純化。更進一步，以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN，15 × 100 mm，最初以 50 毫升 H₂O 溶離，再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽，而得到目的之化合物 11 (71 毫克，產率 70%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (1H, d, J=9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, J=8.6 Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.51 (bdd, 1H, J=9.0 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac) ; HRMS C₆₉H₁₀₀N₆NaO₄₀ [M+Na⁺] 理論值 1675.5873，實測值 1675.5841

實施例 21 化合物 12 之合成

將化合物 11 (50 毫克，30 μmol) 與牛血清白蛋白 2.0 毫克，一同溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM，pH 5.0，920 μL) 中，進一步再加入 N-乙醯基-β-D-葡糖胺酵素 (西格瑪亞德利奇公司製，由 Jack 豆，2.1U)。將該溶液於 37°C 下靜置 48 小時後，以 HPLC 分析確認反應已經終了。將反應溶液以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No.

2020178, 20 × 250 mm, 展開溶劑為 50 mM 醋酸銨水溶液 : 乙腈 = 80 : 20, 流速為 4 毫升/分) 進行純化, 再冷凍乾燥。將該殘留物質以 ODS 管柱 (科思摩基 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, 最初以 50 毫升 H₂O 溶離, 再以 25% 乙腈溶離) 進行脫鹽, 而得到目的之化合物 12 (25 毫克, 產率 66%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (bd, 1H, J=1.6 Hz, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58~4.52 (b, 1H, GlcNAc2-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (dd 1H, J=1.6 Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.53 (bdd, 1H, J=9.0 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac)

實施例 22 化合物 13 之合成

將化合物 12 (10 毫克, 11 μmol) 與牛血清白蛋白 0.9 毫克, 溶解於 HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 440 μL) 中, 進一步再加入由 α-甘露糖苷酵素 (西格瑪亞德利奇公司製, 由 Jack 豆, 30 μL, 3.2U) 將該溶液於 37°C 下靜置 21 小時後, 以 HPLC 分析確認反應已經終了。再以 HPLC (YMC 包裝管柱 D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178, 20 × 250 mm

，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈＝80：20，流速為4毫升/分)進行純化。再將其以ODS管柱(科思摩基75C₁₈-OPN，15×100 mm，最初以50毫升H₂O溶離，再以25%乙腈溶離)進行脫鹽，而得到目的之化合物13(3毫克，產率43%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (1H, GlcNAc2-H-1), 4.06 (d, 1H, J=3.2 Hz, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-β CH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.3 Hz, 15.5 Hz, Asn-β CH), 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac)

(糖鏈天門冬醯胺酸衍生物之Fmoc基的脫保護)

以下，在全部的糖鏈天門冬醯胺酸衍生物上，以下列順序進行Fmoc基的脫保護。首先，對於每糖鏈天門冬醯胺Fmoc體1 μmol，加入240 μL的N,N-二甲基甲醯胺及160 μL的嗎啉，並使其於室溫、氬氣環境下進行反應。以TLC(展開溶劑為1M醋酸銨：異丙醇＝8：5)確認反應終了之後，以冰水使其冷卻。在其上加入反應溶液10倍量之二甲醚，攪拌15分鐘之後，過濾該析出之沉澱物。所得到之殘渣溶解於水中，並於35℃使其氣化。再加入3毫升之二甲苯，重複三次前述蒸發氣化之步驟。將殘留物於逆相管柱層析(科思摩基75C₁₈-OPN，15×100 mm，展開溶劑為水)

中進行純化。

實施例 23 化合物 33 之合成

將化合物 10 (10.5 毫克, 5.3 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 7 小時, 得到目的之化合物 33 (7 毫克, 產率 76%)。所得之化合物並以 $^1\text{H-NMR}$ 確認與標準品一致。

實施例 24 化合物 26 之合成

將化合物 3 (8.0 毫克, 3.8 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 21 小時, 得到目的之化合物 26 (6.3 毫克, 產率 88%)。

所得之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30 $^{\circ}\text{C}$)

δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.9$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.56 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, GlcNAc5-H-1), 4.52 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.12 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H, $J=4.5$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, $J=6.8$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 12.4 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.08, 2.07, 2.06, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H, $J=12.1$ Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}) ; MS (Fab) $\text{C}_{71}\text{H}_{118}\text{N}_7\text{O}_{51}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 理論值 1884.7, 實測值 1884.5

實施例 25 化合物 27 之合成

將化合物 4 (11.0 毫克, 5.8 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 23 小時, 得到目的之化合物 27 (8.5 毫克, 產率 88%)

。所得到之化合物，其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.08 (d, 1H, $J=9.7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 2H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.45 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, Gal6'-H-1), 4.26 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4'-H-2), 4.08 (bdd, 1H, $J=1.6$ Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H, $J=4.0$ Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, $J=7.2$ Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, $J=4.1$ Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.09, 2.07, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac), 1.72 (dd, 1H, $J=12.1$ Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); MS (Fab) $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{46}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 理論值 1703.6, 實測值 1703.1

實施例 26 化合物 28 之合成

將化合物 5 (7.0 毫克, 4.0 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 21 小時, 得到目的之化合物 28 (5.3 毫克, 產率 87%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J=9.4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.94 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.44 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.10, 4.07 (each 1H, Man4', 3-H-2), 2.93 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 17.5 Hz, Asn- β CH), 2.85 (dd, 1H, $J=7.0$ Hz, 17.5 Hz, Asn- β CH), 2.67 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 12.2 Hz,

NeuAc7'-H-3_{eq}), 2.08, 2.06, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (2H, dd, J=12.2 Hz, 12.2 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); MS (Fab) C₅₇H₉₄N₆NaO₄₁ [M+Na⁺]理論值 1541.5, 實測值 1541.3

實施例 27 化合物 30 之合成

將化合物 7 (13.9 毫克, 6.6 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 7 小時, 得到目的之化合物 30 (8.0 毫克, 產率 64%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J=9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H, J=8.0 Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.4 Hz, GlcNAc5'-H-1), 4.44 (d, 1H, J=8.0 Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, J=1.3 Hz, 3.2 Hz, Man4'-H-2), 4.10 (bdd, 1H, J=1.4 Hz, 3.2 Hz, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H, J=4.5 Hz, 16.7 Hz, Asn-β CH), 2.80 (dd, 1H, J=7.5 Hz, 16.7 Hz, Asn-β CH), 2.66 (dd, 1H, J=4.6 Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.07, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H, J=12.4 Hz, 12.4 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS (Fab) C₇₁H₁₁₇N₇NaO₅₁ [M+Na⁺]理論值 1906.7, 實測值 1906.1

實施例 28 化合物 31 之合成

將化合物 8 (8.0 毫克, 4.2 μmol) 以上述之步驟, 進行反

應 12 小時，得到目的之化合物 31 (6.0 毫克，產率 86%)。所得之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each, d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.43 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, Man4'-H-2), 2.91 (bd, 1H, $J=17.0$ Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, $J=6.5$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.66 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 12.6 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.06, 2.06, 2.02, 2.00 (each s, each 3H, Ac), 1.70 (dd, 1H, $J=12.6$ Hz, 12.6 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS (Fab) $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{46}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 理論值 1703.6，實測值 1703.0

實施例 29 化合物 32 之合成

將化合物 9 (7.7 毫克，4.4 μmol) 以上述之步驟，進行反應 23 小時，得到目的之化合物 32 (5.2 毫克，產率 78%)。所得之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.14 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.60 (each, d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.44 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, Gal6-H-1), 4.23 (d, 1H, $J=3.0$ Hz, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, $J=1.3$ Hz, 2.9 Hz, Man4-H-2), 2.92 (dd, 1H, $J=4.1$ Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.83 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, 12.7 Hz,

Asn- β CH), 2.67 (dd, 1H, $J=4.6$ Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.06 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.03, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H, $J=12.7$ Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); MS (Fab) C₅₇H₉₄N₆NaO₄₁ [M+Na⁺]理論值 1541.5, 實測值 1541.2

實施例 30 化合物 37 之合成

將化合物 14 (9.1 毫克, 5.0 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 13 小時, 得到目的之化合物 37 (6.5 毫克, 產率 77%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57, 4.55 (each d, each 1H, $J=7.5$ Hz, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, Gal6'-H-1), 4.23 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.87 (dd, 1H, $J=4.8$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.76 (dd, 1H, $J=7.2$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab) C₆₀H₁₀₀N₆NaO₄₃ [M+Na⁺]理論值 1615.6, 實測值 1615.0

實施例 31 化合物 42 之合成

將化合物 19 (9.8 毫克, 5.4 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 13 小時, 得到目的之化合物 42 (8.0 毫克, 產率 88%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.57, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, Gal6-H-1), 4.28 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4-H-2), 2.88 (dd, 1H, $J=4.0$ Hz, 16.6 Hz, Asn- β CH), 2.77 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, 16.6 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H, $\text{Ac}\times 2$), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab) $\text{C}_{60}\text{H}_{101}\text{N}_6\text{O}_{43}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 理論值 1593.6, 實測值 1593.8

實施例 32 化合物 38 之合成

將化合物 15 (5.1 毫克, 3.2 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 11 小時, 得到目的之化合物 38 (4.0 毫克, 產率 91%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, $J=7.8$ Hz, GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (d, 1H, $J=2.3$ Hz, Man3-H-2), 4.10, 4.06 (each bd, each 1H, Man4', 4-H-2), 2.90 (dd, 1H, $J=4.2$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, $J=7.3$ Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{38}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 理論值 1390.5, 實測值 1390.1

實施例 33 化合物 72 之合成

將化合物 70 (4.0 毫克, 2.8 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 13 小時, 得到目的之化合物 72 (2.9 毫克, 產率 85%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.09 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J=9.8$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.10, 4.06 (each bs, each 1H, Man4, 4'-H-2), 2.87 (dd, 1H, $J=17.2$ Hz, Asn- β CH), 2.76 (dd, 1H, $J=6.5$ Hz, 17.2 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}$ $[\text{M}+\text{H}^+]$ 理論值 1228.5, 實測值 1228.3

實施例 34 化合物 43 之合成

將化合物 20 (5.4 毫克, 3.3 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 11 小時, 得到目的之化合物 43 (4.1 毫克, 產率 87%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, Gal6-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H, $J=4.0$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.80 (dd, 1H, $J=7.3$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07,

2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{52}H_{88}N_5O_{38}$ [M+H⁺] 理論值 1390.5, 實測值 1390.2

實施例 35 化合物 73 之合成

將化合物 71 (4.0 毫克, 2.8 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 13 小時, 得到目的之化合物 73 (2.9 毫克, 產率 85%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J=9.9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.54 (each d, each 1H, J=7.9 Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 1.6 Hz, Man4-H-2), 3.96 (1H, dd, J=1.6 Hz, 1.6 Hz, Man4-H-2), 2.88 (dd, 1H, J=4.3 Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.77 (dd, 1H, J=7.2 Hz, 16.8 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.04 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{46}H_{78}N_5O_{33}$ [M+H⁺] 理論值 1228.5, 實測值 1228.3

實施例 36 化合物 39 之合成

將化合物 16 (2.2 毫克, 1.5 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 7 小時, 得到目的之化合物 39 (1.6 毫克, 產率 84%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.07 (s, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62, 4.58 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.09, 4.08 (each s, each 1H,

Man3, 4'-H-2), 2.91 (dd, 1H, $J=4.1$ Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.81 (dd, 1H, $J=6.8$ Hz, 16.9 Hz, Asn- β CH), 2.08, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{46}H_{77}N_5NaO_{33}$ $[M+Na^+]$ 理論值 1250.4, 實測值 1250.3

實施例 37 化合物 40 之合成

將化合物 17 (1.5 毫克, 1.2 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 14 小時, 得到目的之化合物 40 (1.1 毫克, 產率 89%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

1H -NMR (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.10, 4.07 (each s, each, 1H, Man4', 3-H-2), 2.89 (dd, 1H, $J=3.7$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.79 (dd, 1H, $J=7.0$ Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.05, 2.01 (each, s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{40}H_{67}N_5NaO_{28}$ $[M+Na^+]$ 理論值 1088.4, 實測值 1088.2

實施例 38 化合物 41 之合成

將化合物 18 (1.3 毫克, 1.2 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 14 小時, 得到目的之化合物 41 (0.8 毫克, 產率 80%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

1H -NMR (30°C)

δ 5.07 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4.08 (d, 1H, $J=2.9$ Hz, Man3-H-2),

2.92 (dd, 1H, $J=3.9$ Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.83 (dd, 1H, $J=7.0$ Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{32}H_{55}N_4O_{27}$ $[M+H^+]$ 理論值 863.3, 實測值 863.2

實施例 39 化合物 44 之合成

將化合物 21 (2.3 毫克, 1.6 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 7 小時, 得到目的之化合物 44 (1.6 毫克, 產率 84%)。所得之化合物, 其物理性質係如下所示。

1H -NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, $J=9.8$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, Gal-H-1), 4.22, 4.18 (each bs, each 1H, Man3, 4-H-2), 2.91 (dd, 1H, $J=4.1$ Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.82 (dd, 1H, $J=7.0$ Hz, 17.3 Hz, Asn- β CH), 2.05, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) $C_{46}H_{78}N_5O_{33}$ $[M+H^+]$ 理論值 1228.5, 實測值 1228.3

實施例 40 化合物 45 之合成

將化合物 22 (1.6 毫克, 1.3 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 14 小時, 得到目的之化合物 45 (1.1 毫克, 產率 85%)。所得之化合物其物理性質係如下所示。

1H -NMR (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each

1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.22 (d, 1H, J=2.5 Hz, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H, J=1.4 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.89 (dd, 1H, J=4.3 Hz, 16.9 Hz, Asn-β CH), 2.78 (dd, 1H, J=7.5 Hz, 16.9 Hz, Asn-β CH), 2.06, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac) ; MS (Fab) C₄₀H₆₇N₅NaO₂₈ [M+Na⁺]理論值 1088.4, 實測值 1088.3。

實施例 41 化合物 46 之合成

將化合物 23 (1.6 毫克, 1.5 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 14 小時, 得到目的之化合物 46 (1.1 毫克, 6.4 μmol, 產率 85%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=7.3 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.22 (d, 1H, J=2.4 Hz, Man3-H-2), 4.07 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.90 (dd, 1H, J=4.3 Hz, 17.0 Hz, Asn-β CH), 2.80 (dd, 1H, J=7.0 Hz, 17.2 Hz, Asn-β CH), 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac) ;

MS (Fab) C₃₂H₅₅N₄O₂₃ [M+H⁺]理論值 863.3, 實測值 863.3

實施例 42 化合物 34 之合成

將化合物 11 (12.4 毫克, 7.5 μmol) 以上述之步驟, 進行反應 11 小時, 得到目的之化合物 34 (9.2 毫克, 產率 86%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=10.0 Hz,

GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=6.8 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc5, 5'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.80 (dd, 1H, J=3.8 Hz, 15.6 Hz, Asn- β CH), 2.63 (dd, 1H, J=8.2 Hz, 15.6 Hz, Asn- β CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.01 (s, 3H, Ac); MS (Fab) C₅₄H₉₀N₆NaO₃₈ [M+Na⁺] 理論值 1453.5, 實測值 1453.2

實施例 43 化合物 35 之合成

將化合物 12 (12.0 毫克, 8.4 μ mol) 以上述之步驟, 進行反應 11 小時, 得到目的之化合物 35 (7.0 毫克, 產率 81%)。所得到之化合物其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30°C)

δ 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.06 (bs, 1H, Man4'-H-2), 3.97 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.79 (dd, 1H, J=5.0 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.61 (dd, 1H, J=7.3 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab) C₃₈H₆₅N₄O₂₈ [M+H⁺] 理論值 1025.4, 實測值 1025.2

實施例 44 化合物 76、77 之合成及分離

將化合物 2、6 (5.0 毫克, 2.2 μ mol) 溶解於 220 μ L 之水中, 加入 22 mM 的碳酸鈉水溶液 100 μ L, 調整 pH 為 7.0。

將該溶液冷凍乾燥，在乾燥後之固形物上加入N,N-二甲基亞砜430 μL ，再加入6.6 μmol 之苄基溴化物/N,N-二甲基亞砜溶液20 μL 。於氫氣的環境下將此溶液加以攪拌。48小時後，以TLC(展開溶劑為1M NH_4OAc ：異丙醇=2：1)確認原料消失之後，加入4.4毫升之二乙醚使化合物沉澱。過濾該沉澱之糖鏈，將殘餘的糖鏈溶解於水中，冷凍乾燥。分取該冷凍乾燥後之殘留物，以HPLC (YMC包裝管柱D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178，20 $\times$ 250 mm，展開溶劑為50 mM醋酸銨水溶液：乙腈=78：22，流速為4.0毫升/分)進行純化時，分別於88分鐘後溶離出化合物77，以及91分鐘後溶離出化合物76。將其各自分取，再進一步進行ODS管柱(科思摩基75C₁₈-OPN，15 $\times$ 100 mm，最初以50毫升 H_2O 溶離，再以25%乙腈溶離)進行脫鹽，而得到目的之1.6毫克的化合物76，以及1.8毫克的化合物77。所得之化合物其物理性質係如下所示。

化合物76之數據

$^1\text{H-NMR}$ (30 $^\circ\text{C}$)

δ 7.92 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, $J=7.5$ Hz, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Fmoc, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$), 5.38 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{Ph}$), 5.31 (d, 1H, $J=12.1$ Hz, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{Ph}$), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, $J=9.5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, Gal6'-H-1), 4.33 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bs,

1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J=4.6 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.52 (dd, 1H, J=8.7 Hz, 15.0 Hz, Asn- β CH), 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J=12.7 Hz, 12.7 Hz, NeuAc7-H3_{ax}) ; MS (Fab) C₉₉H₁₄₃N₁₇NaO₃₈ [M+H⁺] 理論值 2380.8 , 實測值 2380.0 。

化合物 77 之數據

¹H-NMR (30°C)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.53-7.41 (m, 9H, Fmoc, -CH₂-Ph), 5.37 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.31 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH₂-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.8 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.93 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (1H, d, J=7.8 Hz, Gal6-H-1), 4.33 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.68 (dd, 1H, J=4.8 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2.52 (bdd, 1H, J=9.7 Hz, 14.1 Hz, Asn- β CH), 2.06, 2.05, 2.04, 2.02, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J=13.0 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}) ; MS (Fab) C₉₉H₁₄₃N₇NaO₅₈ [M+H⁺] 理論值 2380.8 , 實測值 2380.5 。

實施例 45 化合物 78 之合成

在 4℃ 下將化合物 1 (20 毫克) 的冷水溶液供注於冷卻之 Dowex-50Wx8 (H') 管柱 (ϕ 0.5 cm $\times$ 5 cm) 中，再將溶離之水溶液冷凍乾燥。所得到之冷凍乾燥物溶解於 4℃ 的冷水中，在其上加入 Cs₂CO₃ 水溶液 (2.5 毫克 / 1 毫升)，調整 pH 值為 5~6，然後再將該水溶液冷凍乾燥。將冷凍乾燥後之 Fmoc-二唾液酸基糖鏈試劑溶解於 DryDMF (1.3 毫升) 中，加入苺基溴化物 (5.1 μ l)，並於氬氣環境下室溫攪拌 45 小時。以 TLC 確認反應終了之後，將反應溶液冷卻至 0℃，加入 10 毫升之二乙醚，以析出目的物質。將其以濾紙進行過濾。在殘餘的目的物上加入蒸餾水以使其溶解於液體中，再繼續進行減壓濃縮。將所得到之殘渣供注於 ODS 管柱中 (ϕ 1.6 cm $\times$ 14 cm，溶離液：H₂O $\rightarrow$ 40% MeOH 水溶液)，得到純化之化合物 78 (18.2 毫克，產率 85%)。所得到之化合物 78 其物理性質係如下所示。

¹H-NMR (30℃)

7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.70 (d, 2H, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Bn, Fmoc), 5.36 (d, 2H, J=11.6 Hz, CH₂), 5.30 (d, 2H, J=11.6 Hz, CH₂), 5.12 (s, 1H, Man4-H₁), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H₁), 4.93 (s, 1H, Man4'-H₁), 4.75 (s, 1H, Man3-H₁), 4.57 (m, 3H, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5, 5'-H₁), 4.32 (d, 2H, Gal6, 6'-H₁), 4.24 (d, 1H, Man3-H₂), 4.18 (d, 1H, Man4'-H₂), 4.10 (1H, d, Man4-H₂), 2.72 (bd, 1H, Asn- β CH), 2.67 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.51 (bdd, 1H,

Asn- β CH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03, 2.01 (each s, each 6H, Ac $\times$ 2), 1.89 (s, 3H, Ac), 1.83 (2H, dd, J=12.2, 12.2 Hz, NeuAc7, 7'-H_{3ax}); HRMS C₁₁₇H₁₆₅N₈Na₂O₆₆ [M+Na⁺] 理論值 2783.9597, 實測值 2783.9501

產業上可利用性

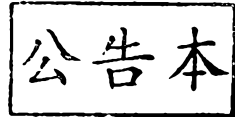
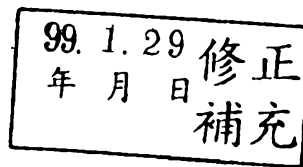
根據本發明，可非常容易、大量地製得具有期望糖鏈構造的各種糖鏈類。因此，可期待將其利用於癌症、發炎症、流行性感冒等治療藥之上。其中特別者，根據本發明所製得之糖鏈天門冬醯胺衍生物、及糖鏈天門冬醯胺，其不會有步驟中混入毒性成分之危險，而具有安全性之優點。

肆、中文發明摘要

本發明係提供一種糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法。依據該製造方法，可將醫藥品開發等領域上有用而被分離的各種糖鏈天門冬醯胺衍生物，以相較於過去而言，非常容易且大量的情況下製得。又，本發明係藉由前述糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造步驟，而提供糖鏈天門冬醯胺之製造方法及糖鏈之製造方法。進一步，本發明並提供一新穎的糖鏈天門冬醯胺衍生物、糖鏈天門冬醯胺及糖鏈。

伍、英文發明摘要

A process for producing a sugar chain asparagine derivative. According to this process, various isolated sugar chain asparagine derivatives which are useful in the field of developing drugs, etc. can be easily obtained in a large amount, compared with the existing processes. A process for producing a sugar chain asparagine via the process for producing a sugar chain asparagine derivative as described above and a process for producing a sugar chain. Novel sugar chain asparagine derivatives, sugar chain asparagines and sugar chains.



拾、申請專利範圍

1. 一種由糖鏈天門冬醯胺衍生的糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其包含：

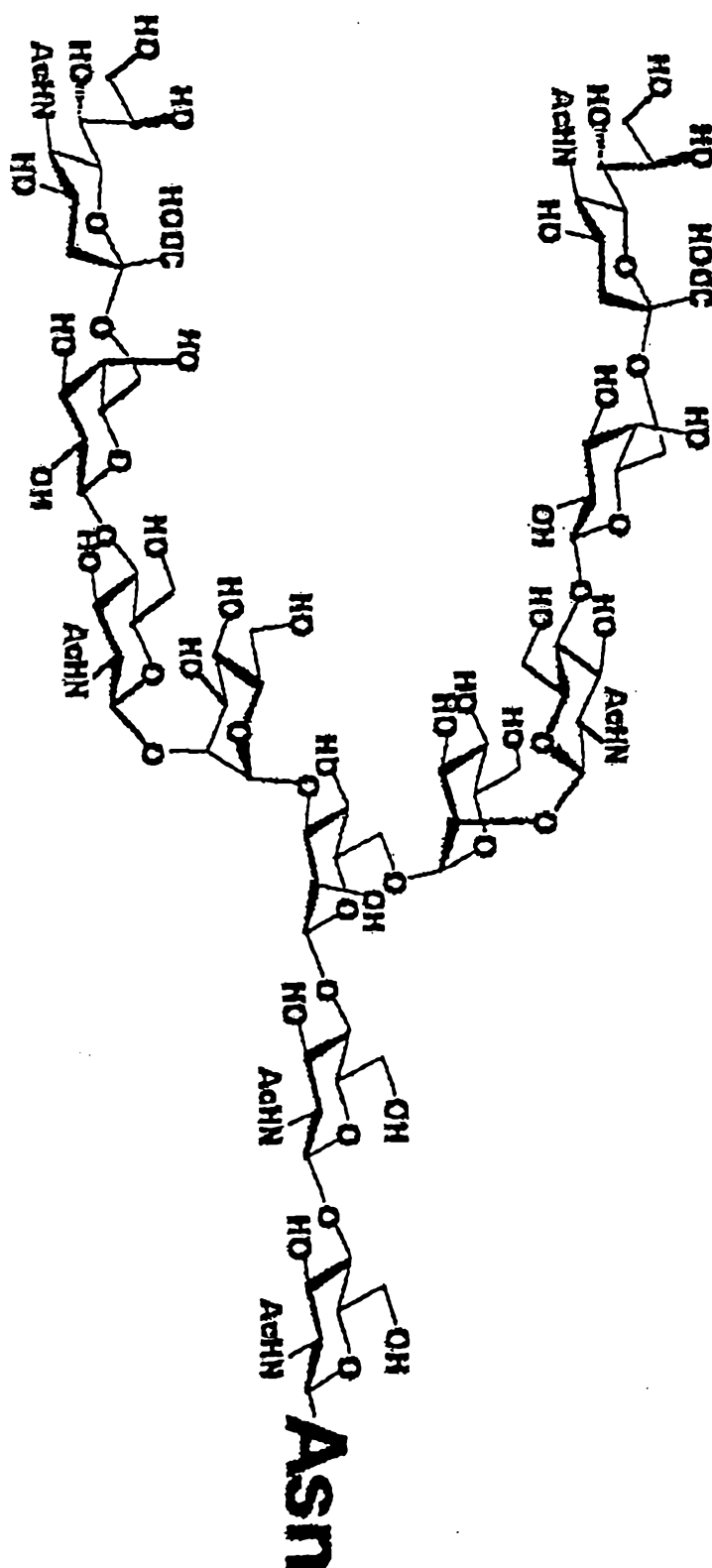
(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於包含 1 種或 2 種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物所包含之該糖鏈天門冬醯胺上，導入苄基甲氧羰(Fmoc)基及第三丁基氧羰(Boc)基；以及

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析。

2. 如申請專利範圍第 1 項所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其進一步包含：

(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所記載之糖鏈天門冬醯胺衍生物之製造方法，其中，該包含 1 種或 2 種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有下列化合物及/或在下列化合物上有缺失 1 個以上糖殘基之化合物：



4. 如申請專利範圍第1項~第3項中任一項所記載之糖鏈
天門冬醯胺衍生物之製造方法，其中，該步驟(a)係在
包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以

上之糖鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物。

5. 一種糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物所含有之該糖鏈天門冬醯胺上，導入苄基甲氧羰(Fmoc)基及第三丁基氧羰(Boc)基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；以及

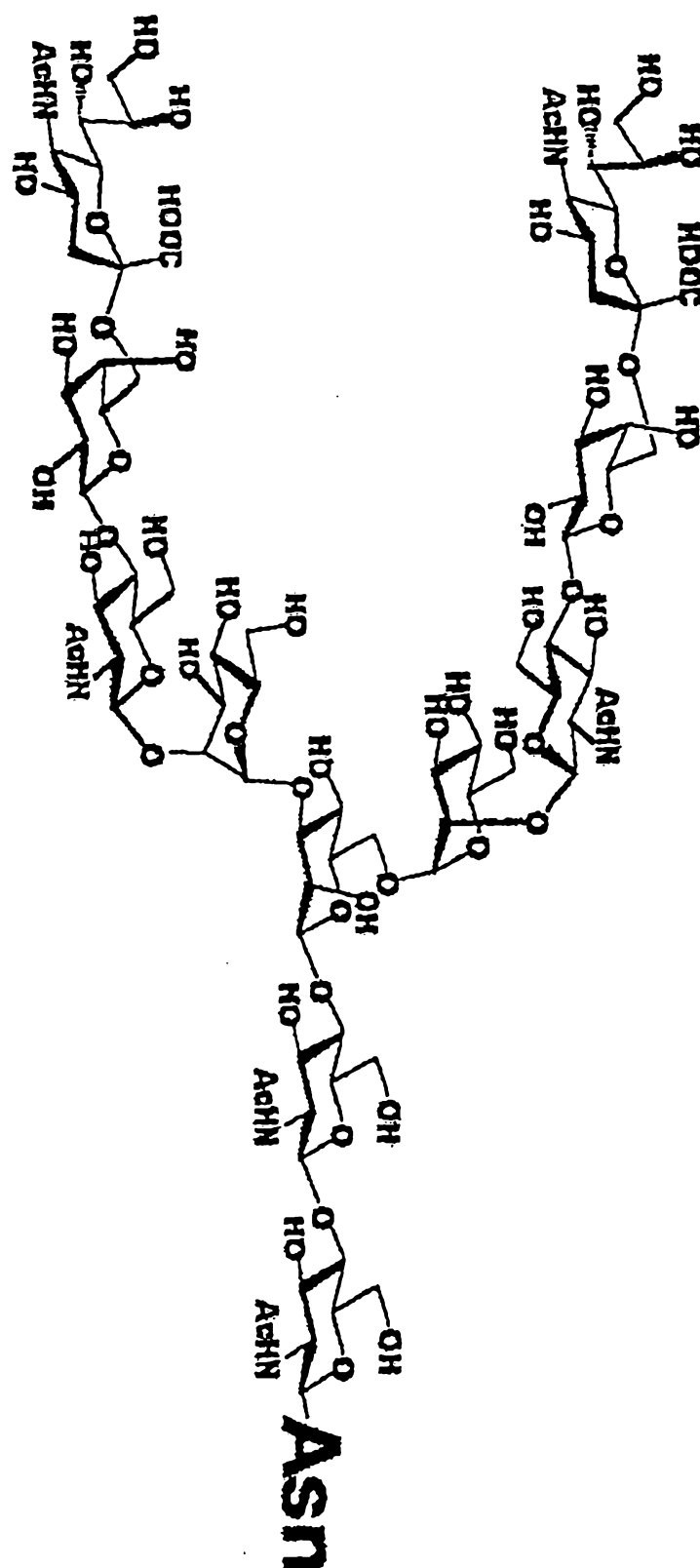
(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係去除步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基。

6. 如申請專利範圍第5項所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其進一步包含：

(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟；及/或

(c')使用糖水解酵素水解步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺之步驟。

7. 如申請專利範圍第5項或第6項所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其中，該包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有下列化合物及/或在下列化合物上有缺失1個以上糖殘基之化合物：



8. 如申請專利範圍第5項~第7項中任一項所記載之糖鏈天門冬醯胺之製造方法，其中，該步驟(a)係在包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以上之糖

鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物。

9. 一種糖鏈之製造方法，其包含：

(a)得到糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物之步驟，其係於包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物所含之該糖鏈天門冬醯胺上，導入苄基甲氧羰(Fmoc)基及第三丁基氧羰(Boc)基；

(b)分離各糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟，其係將該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物或該糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物所包含之糖鏈天門冬醯胺衍生物，進行水解得到一混合物，再將其供注於色層分析；

(c)獲得糖鏈天門冬醯胺之步驟，其係除去步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物的保護基；以及

(d)獲得糖鏈之步驟，其係除去步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺的天門冬醯胺殘基。

10. 如申請專利範圍第9項所記載之糖鏈之製造方法，其進一步包含：

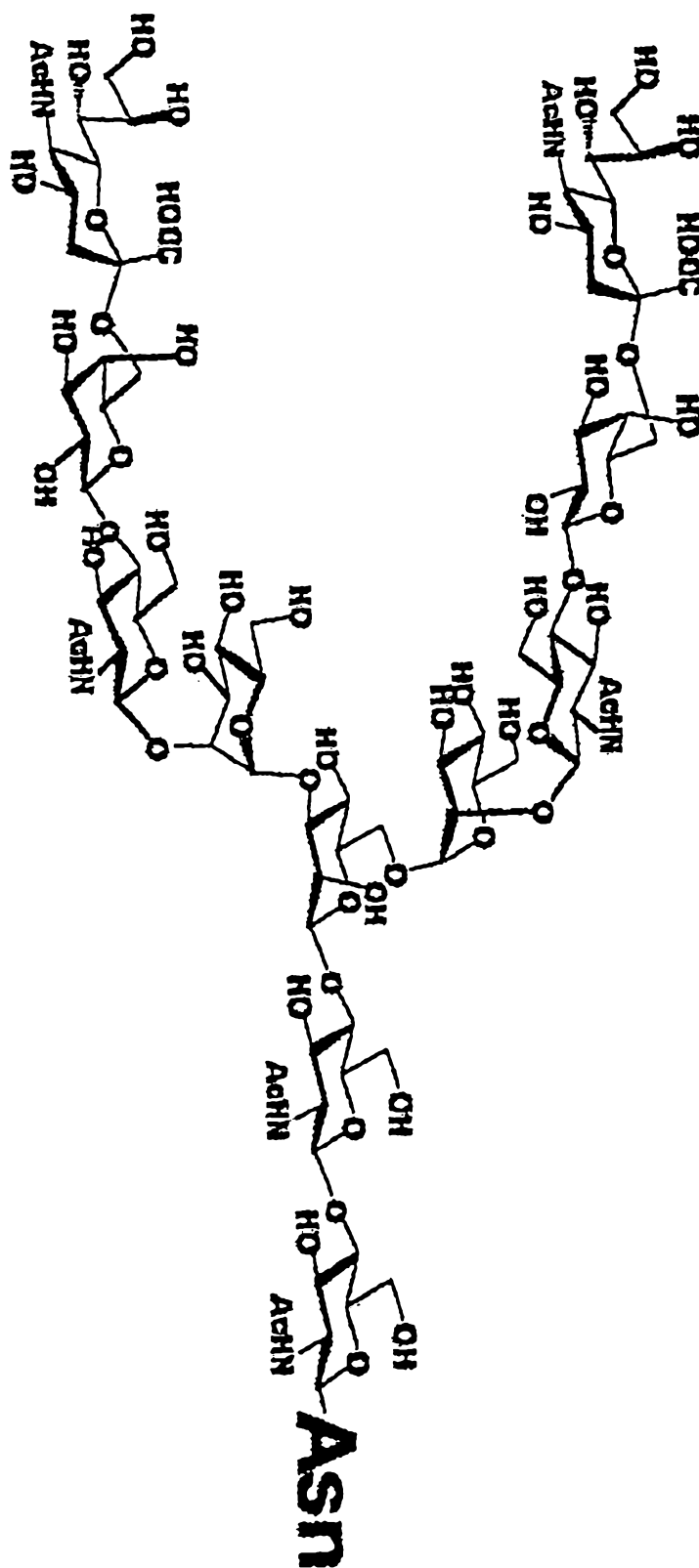
(b')使用糖水解酵素水解步驟(b)所分離之糖鏈天門冬醯胺衍生物之步驟；及/或

(c')使用糖水解酵素水解步驟(c)所得到之糖鏈天門冬醯胺之步驟；及/或

(d')使用糖水解酵素水解步驟(d)所得到之糖鏈之步驟。

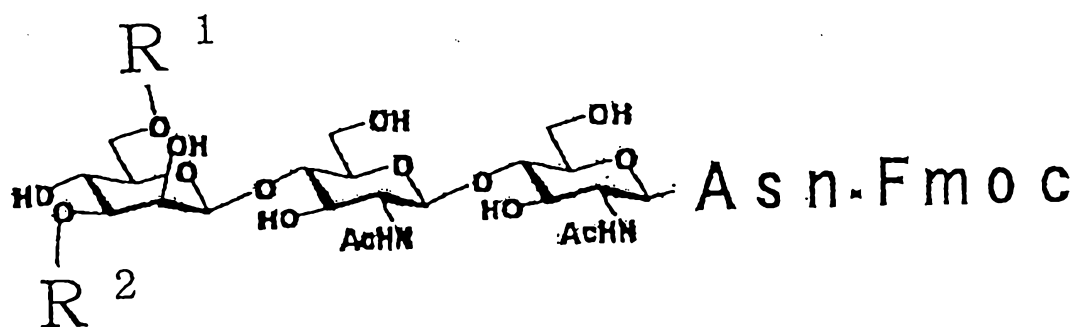
11. 如申請專利範圍第9項或第10項所記載之糖鏈之製造

方法，其中，該包含1種或2種以上糖鏈天門冬醯胺之混合物，係含有下列化合物及/或在下列化合物上有缺失1個以上糖殘基之化合物：

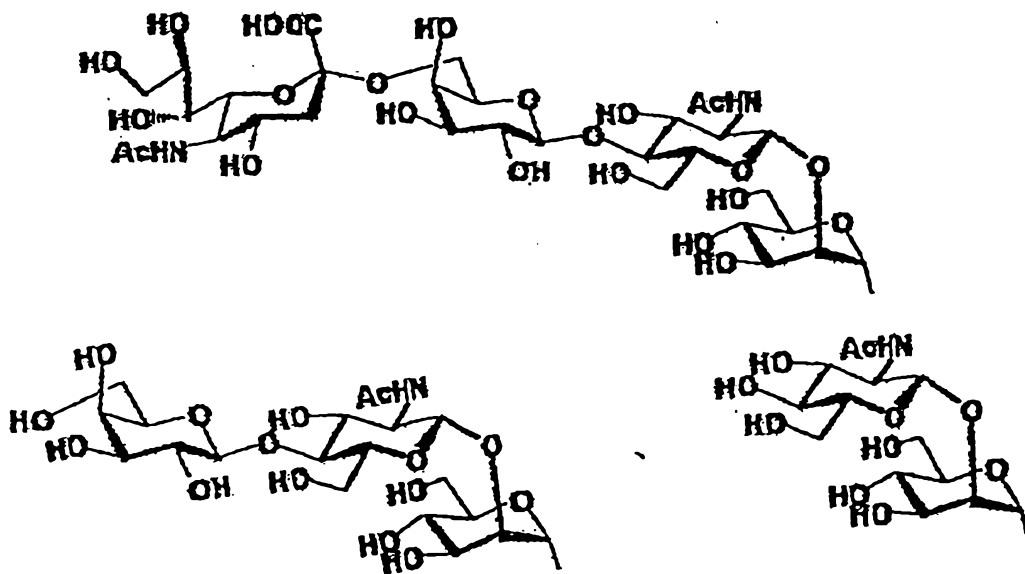


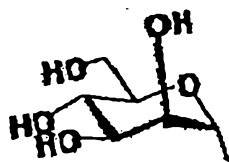
12. 如申請專利範圍第9項~第11項中任一項所記載之糖鏈之製造方法，其中，該步驟(a)係在包含有在非還原末端上具有唾液酸殘基的1種或2種以上之糖鏈天門冬醯胺的混合物中所含有的該糖鏈天門冬醯胺上，導入Fmoc基，同時在唾液酸殘基上導入苄基，而製得糖鏈天門冬醯胺衍生物混合物。

13. 一種糖鏈天門冬醯胺衍生物，其係具有一般式：



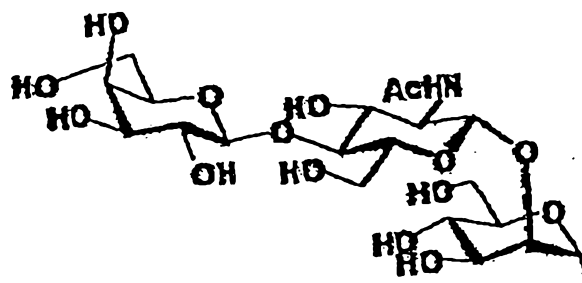
(式中，Asn為天門冬醯胺， R^1 及 R^2 可為相同或相異，而為H、





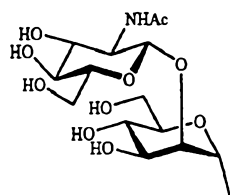
或

但，



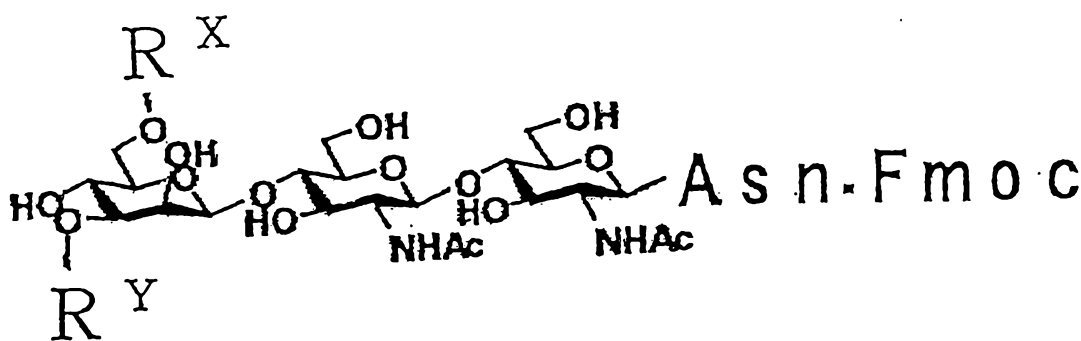
或

R^1 及 R^2 同時為 H、

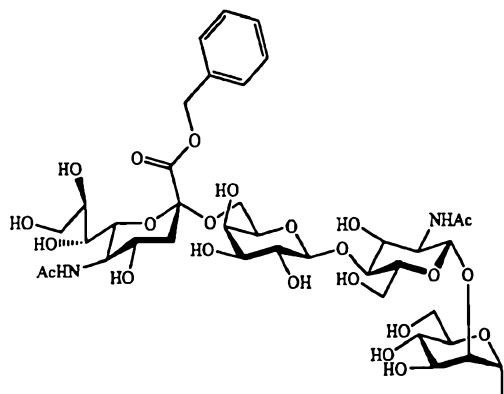


之情況除外)。

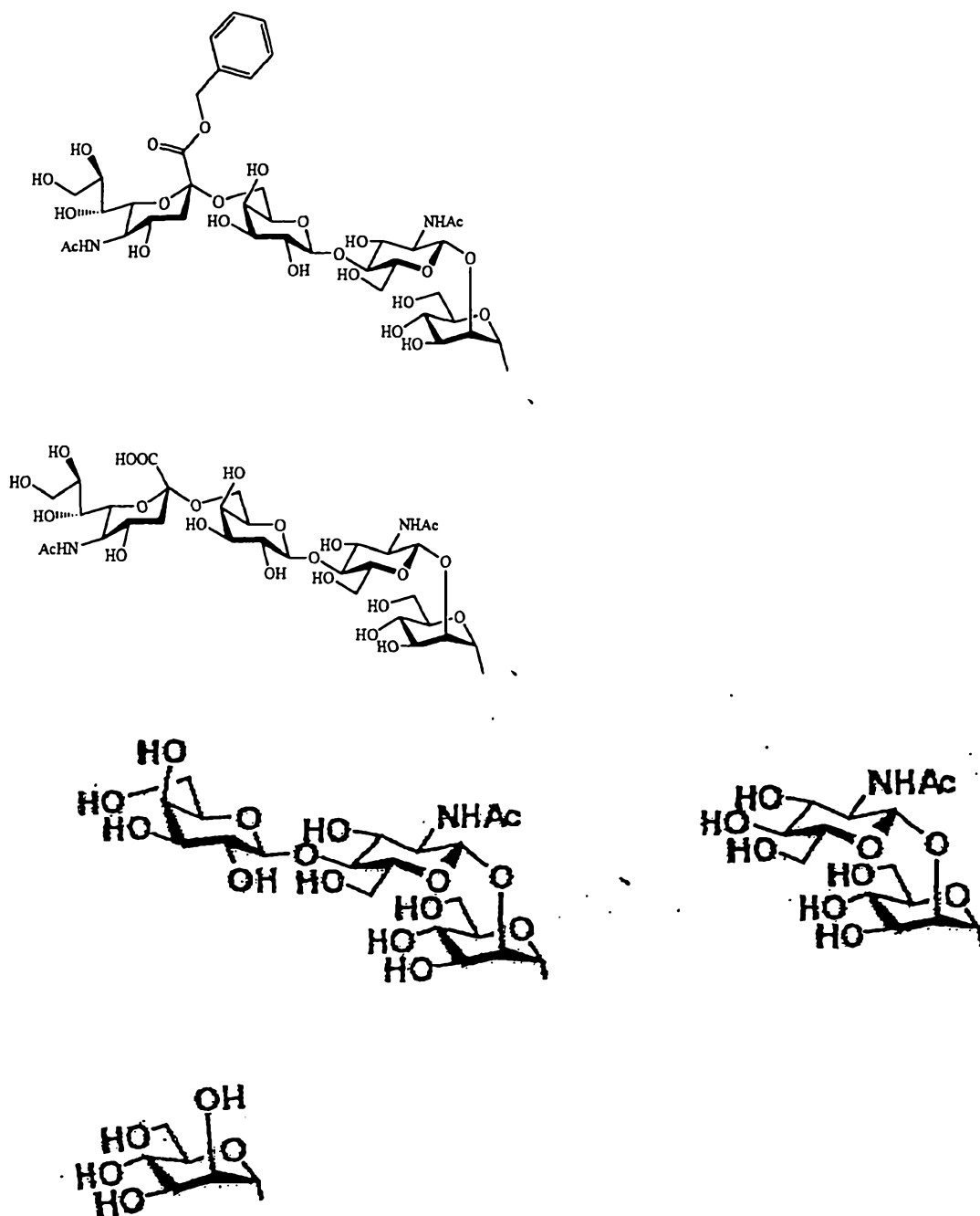
14. 一種糖鏈天門冬醯胺衍生物，其係具有一般式：



(式中， R^X 及 R^Y 中，其一者為

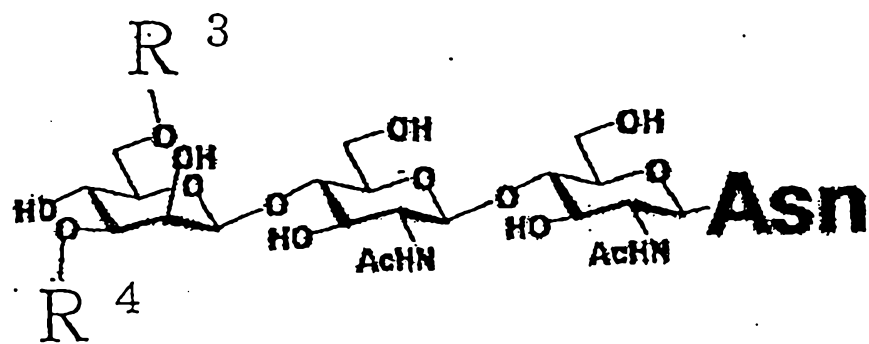


，而另一者為 H、

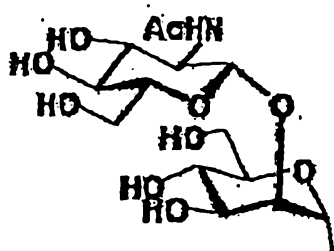
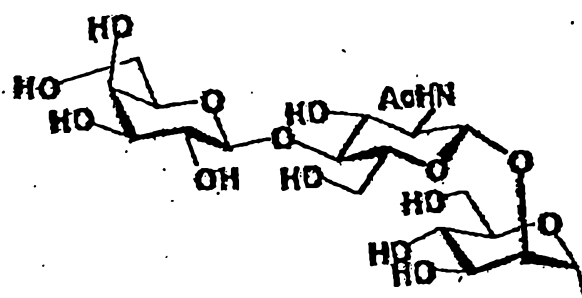
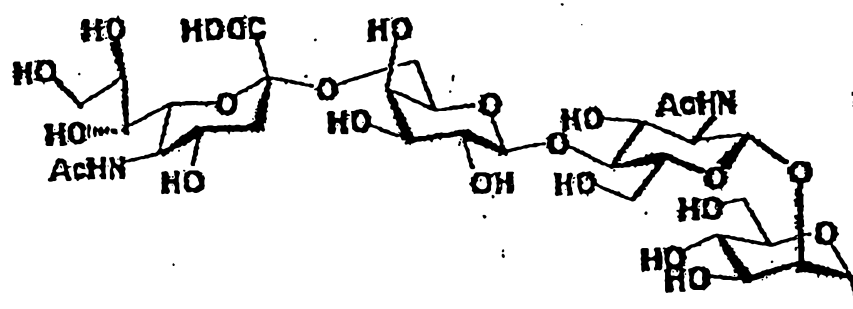


或)。

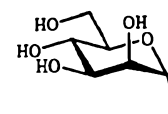
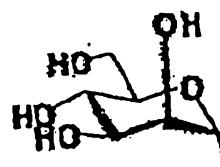
15. 一種糖鏈天門冬醯胺，其係具有一般式：



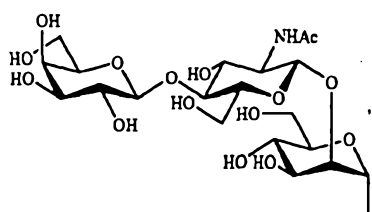
(式中，Asn為天門冬醯胺， R^3 及 R^4 可為相同或相異，而為H、



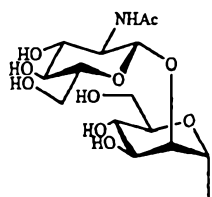
或



，但，(1) R^3 及 R^4 相同之情況；(2) R^3 為、且 R^4

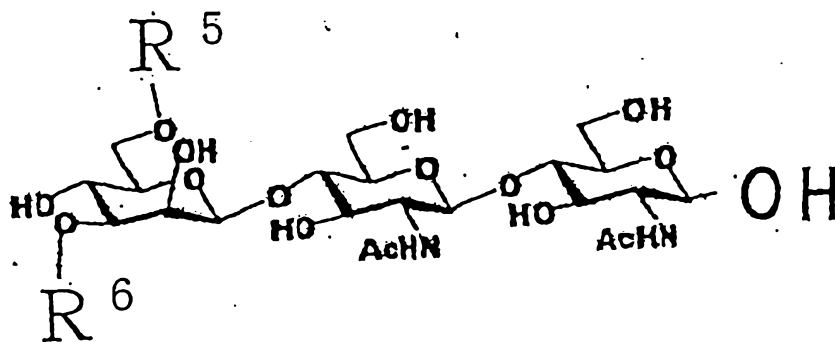


為 H 或 之情況；及 (3) R^3 為 H、且 R^4 為

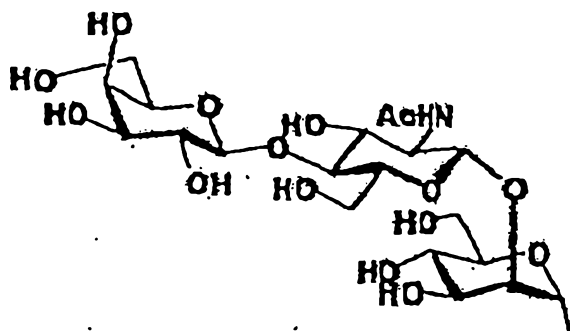
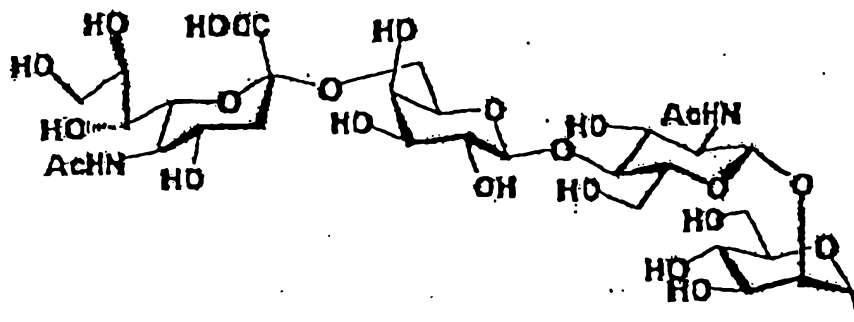


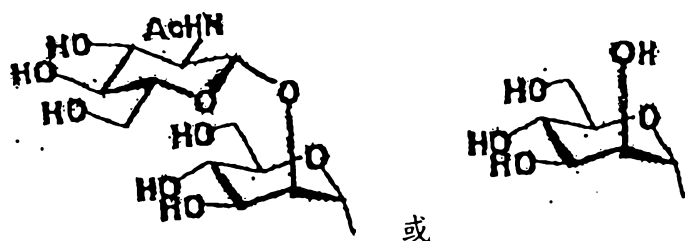
之情況除外)。

16. 一種糖鏈，其係具有一般式：



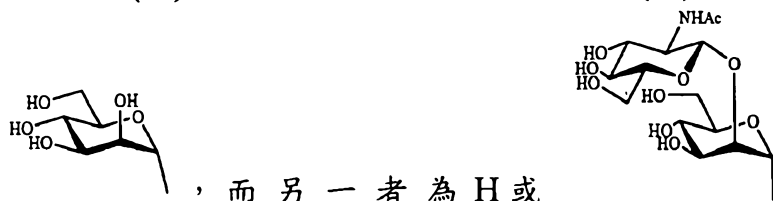
(式中， R^5 及 R^6 可為相同或相異，而為 H、





或

，但，(1) R^5 及 R^6 相同之情況；(2) R^5 及 R^6 中，其一者為



，而另一者為 H 或

之情況；及 (3) R^5

為

The first structure is a disaccharide in a chair conformation, with an acetamido group (AcHN) at C2 and hydroxyl groups (OH) at C1, C3, C4, and C6. The second structure is a monosaccharide in a chair conformation, with an acetamido group (AcHN) at C2 and hydroxyl groups (OH) at C1, C3, C4, and C6.

、且 R^6 為

之情況除外)。

拾壹、圖式

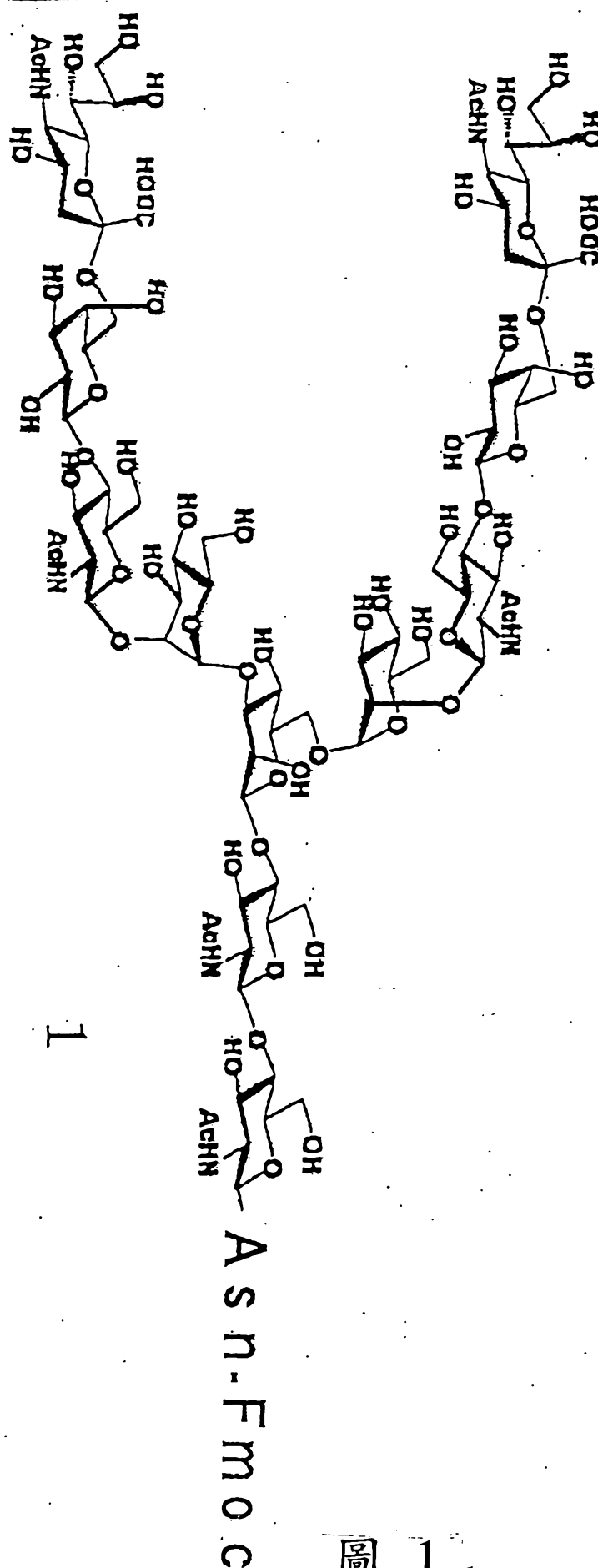
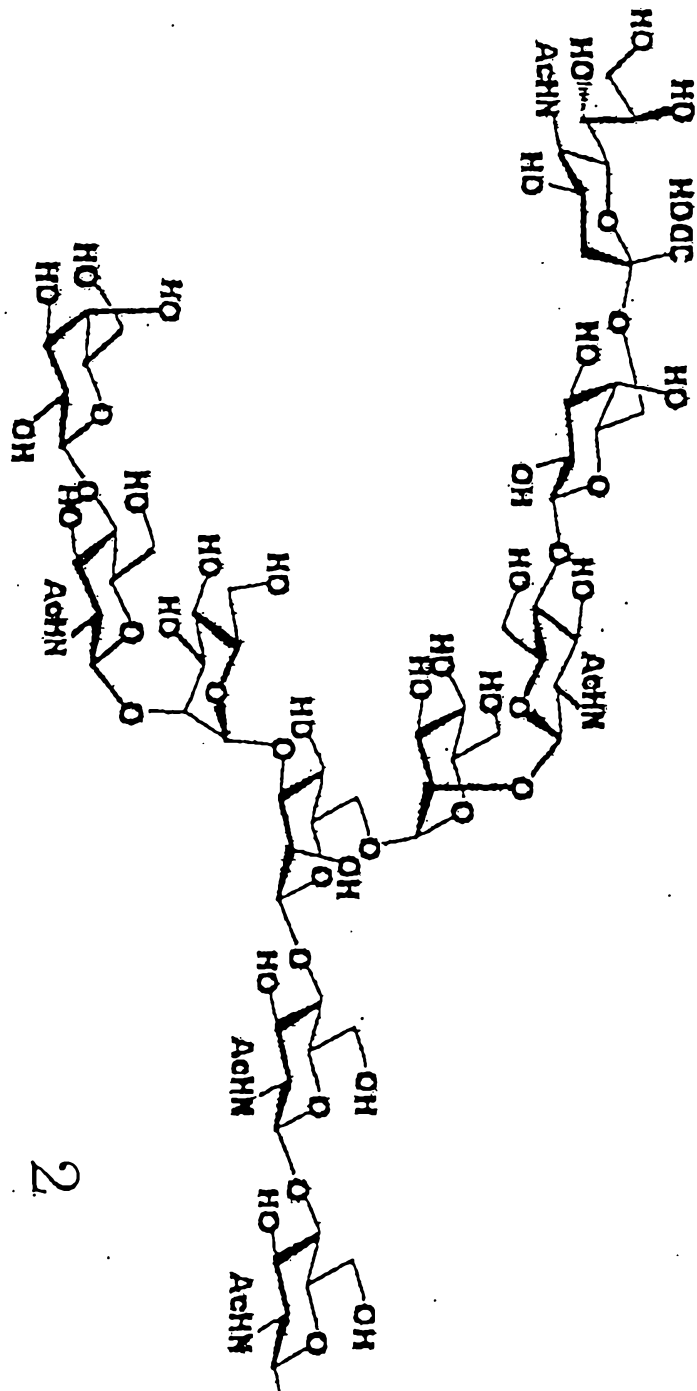


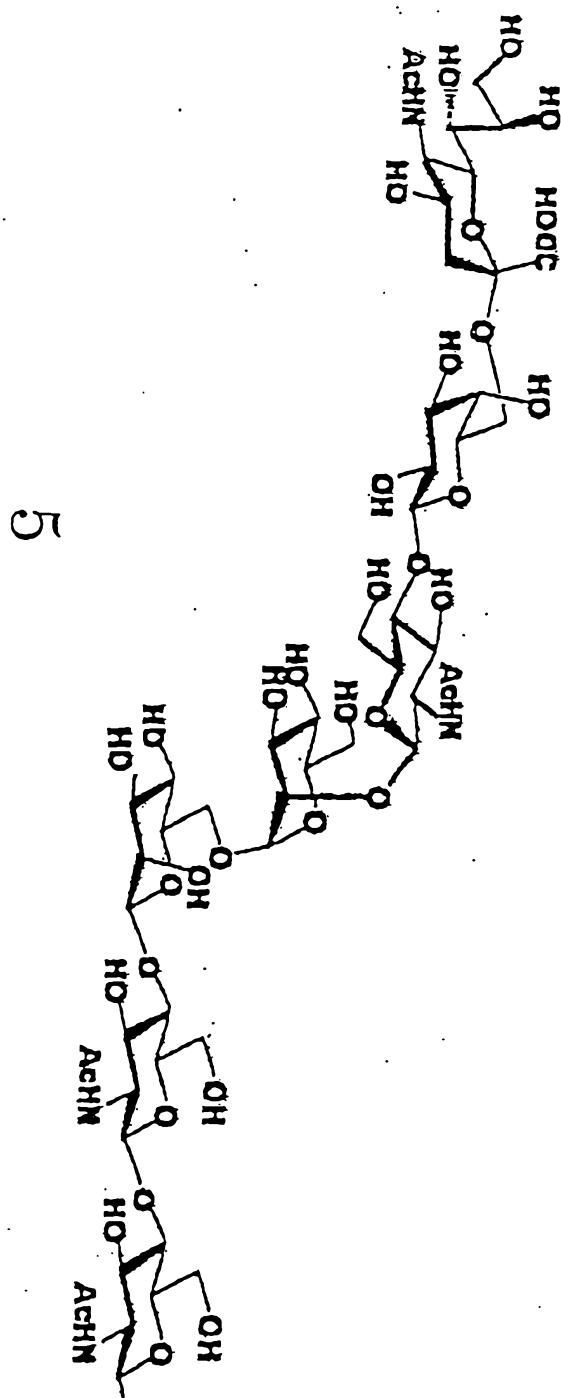
圖 1



Asn-Fmoc

圖 1

2



5

ASn-Fmoc

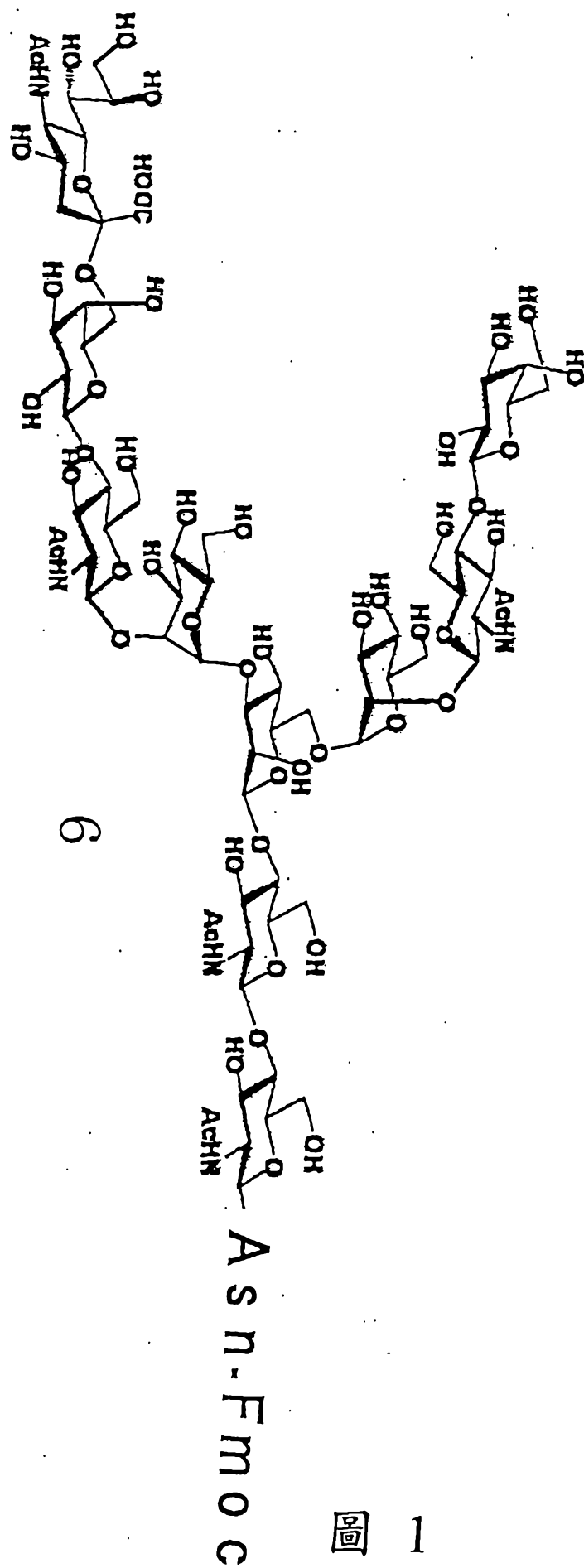
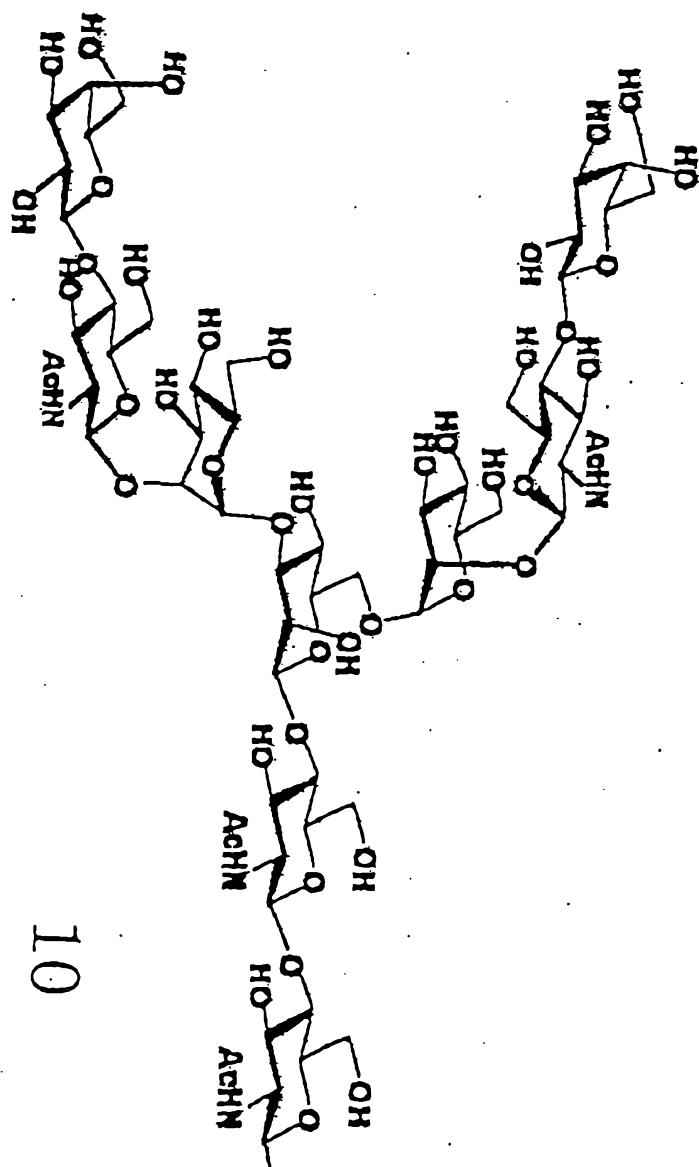


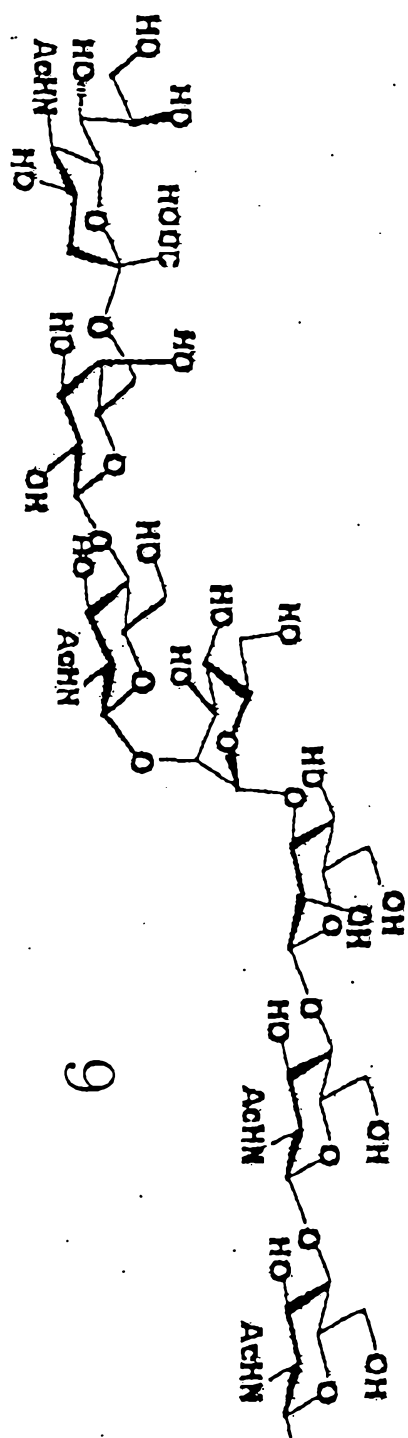
圖 1



10

Asn-Fmoc

圖 1

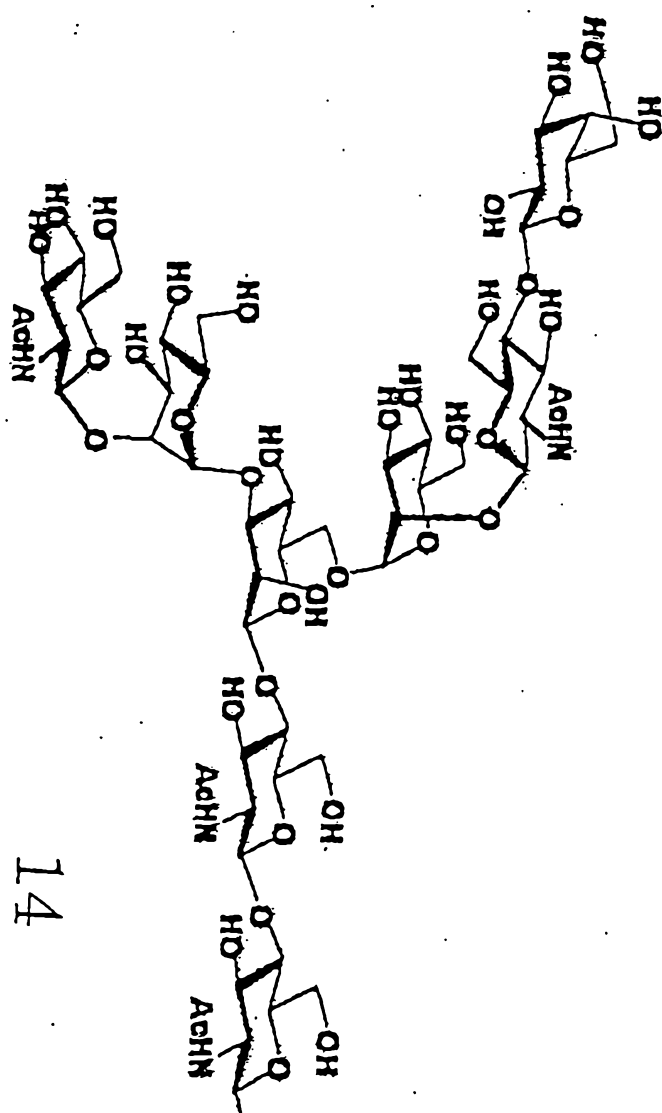


9

Asn-Fmoc

圖

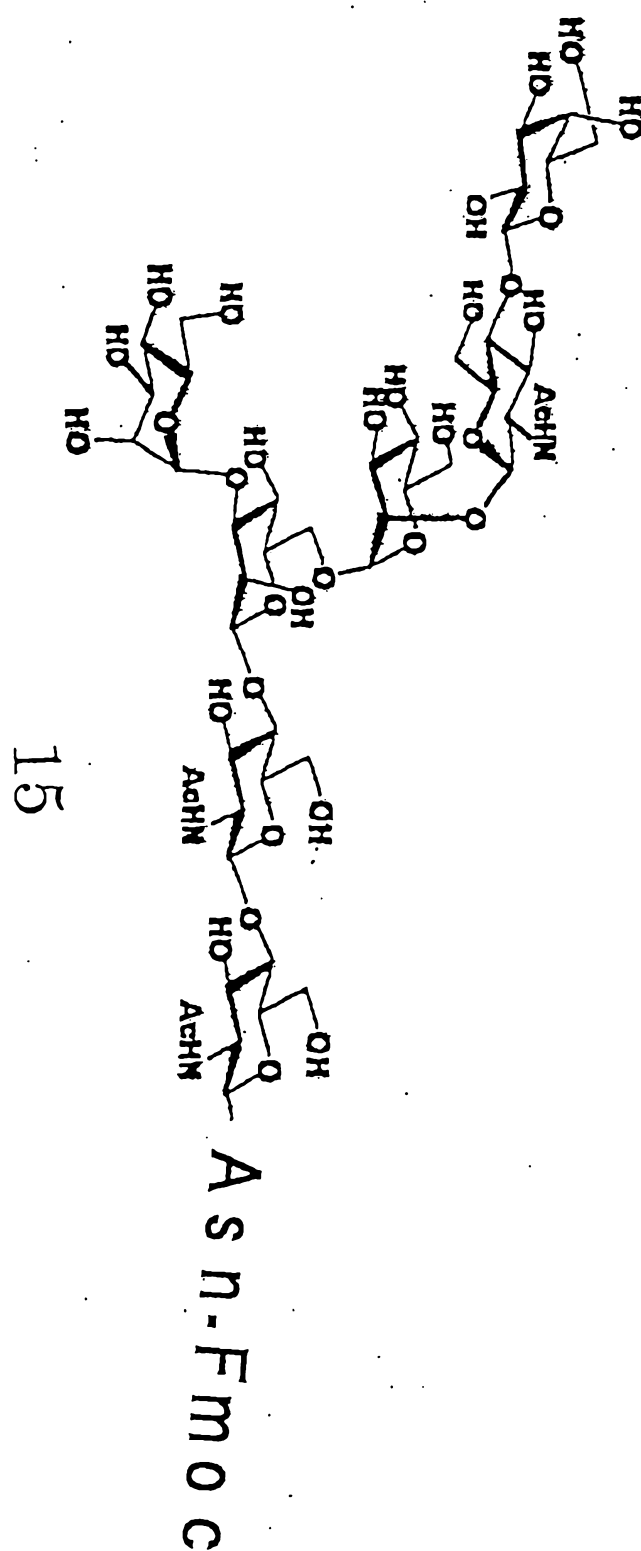
1

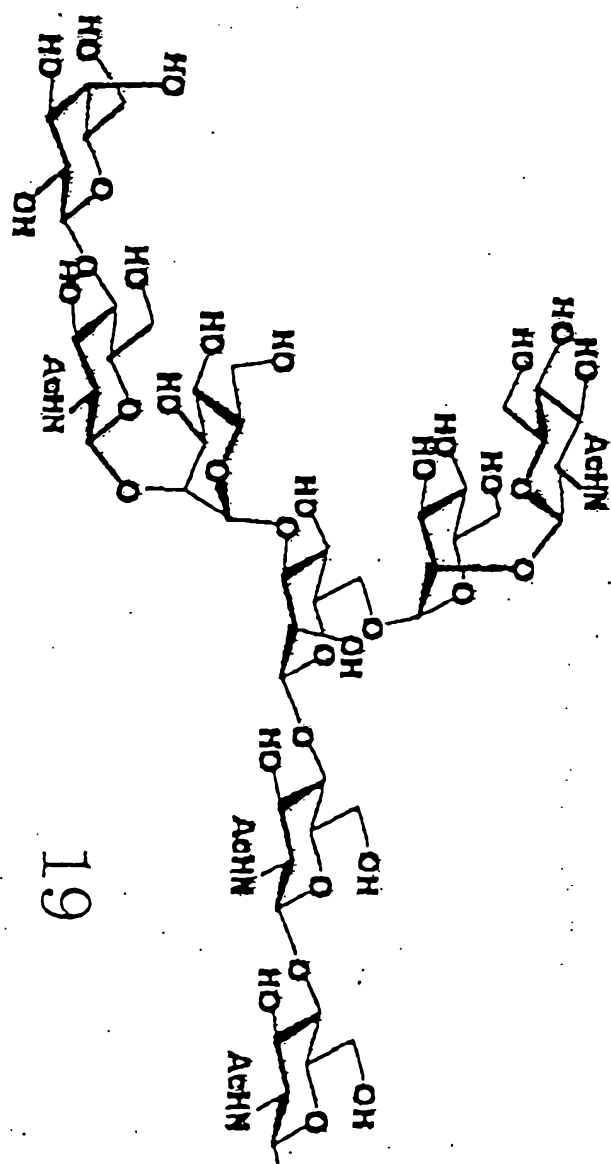


14

Asn-Fmoc

圖 1

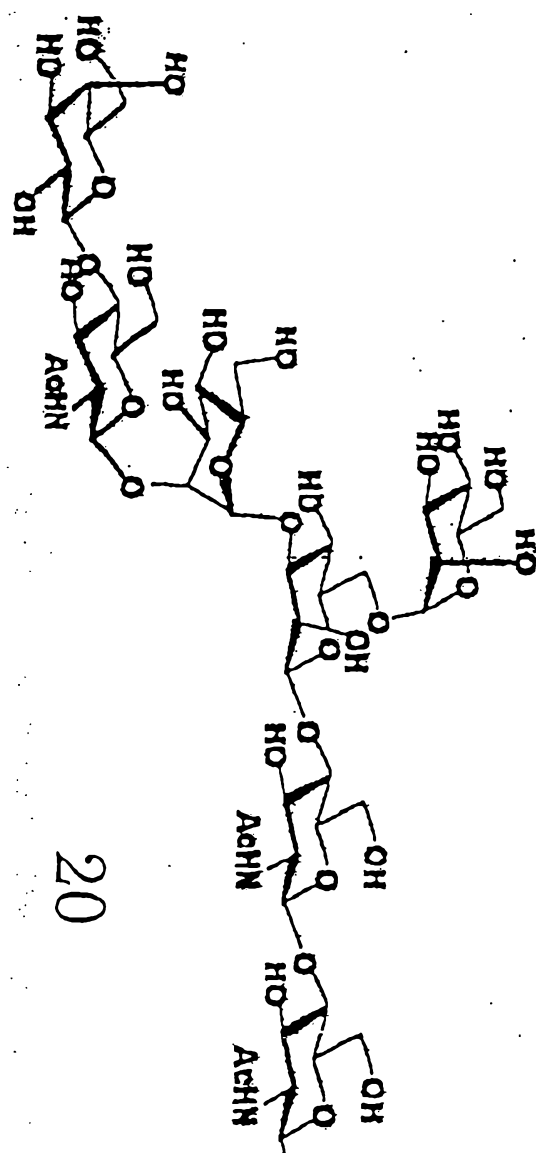




19

Asn-Fmoc

圖 1



Asn-Fmoc

圖 1

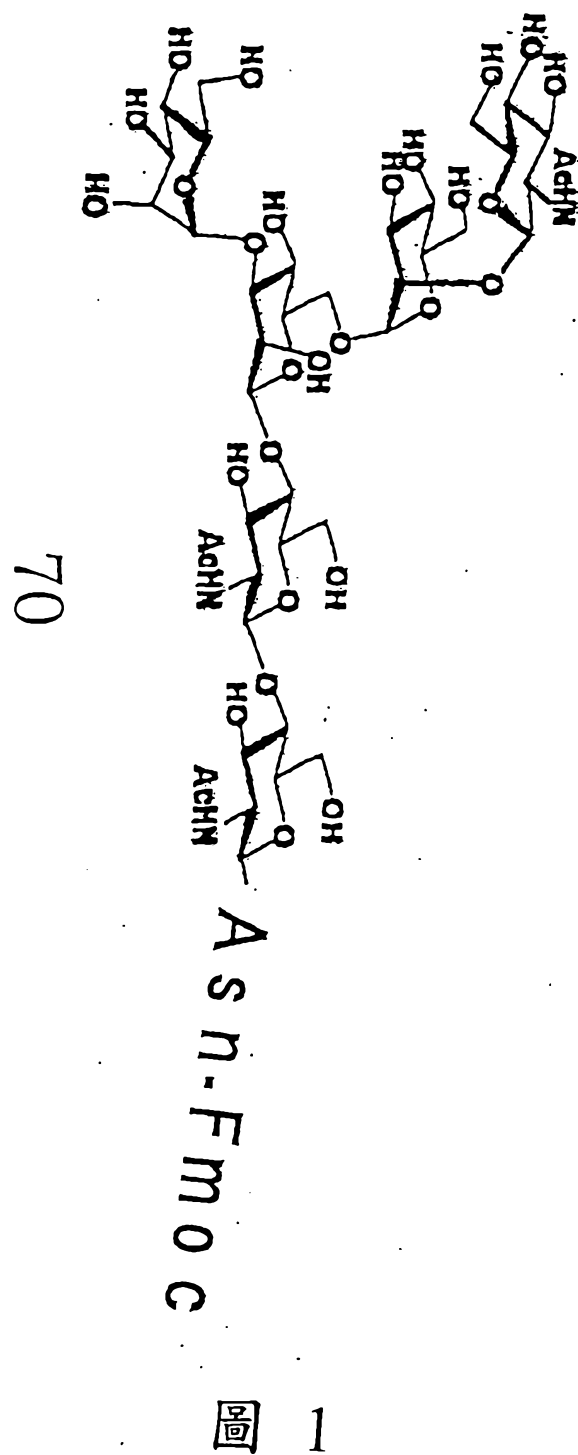
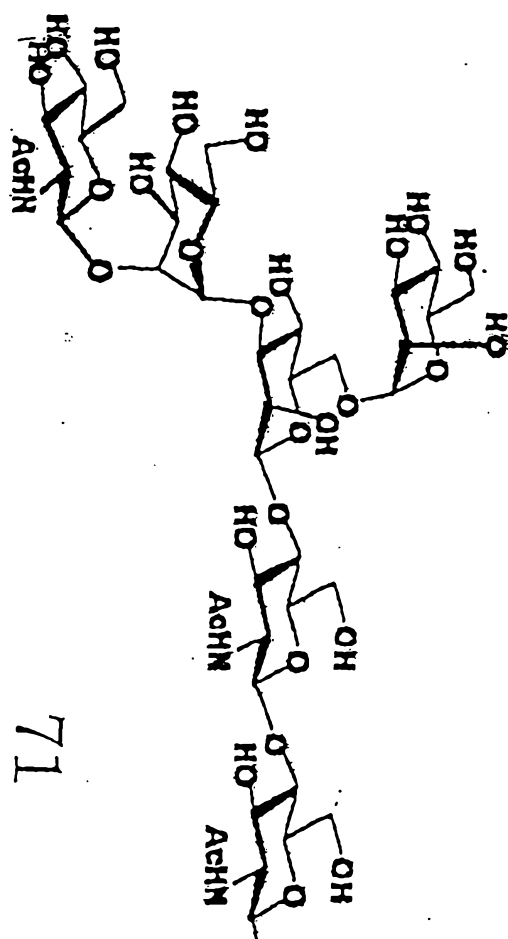


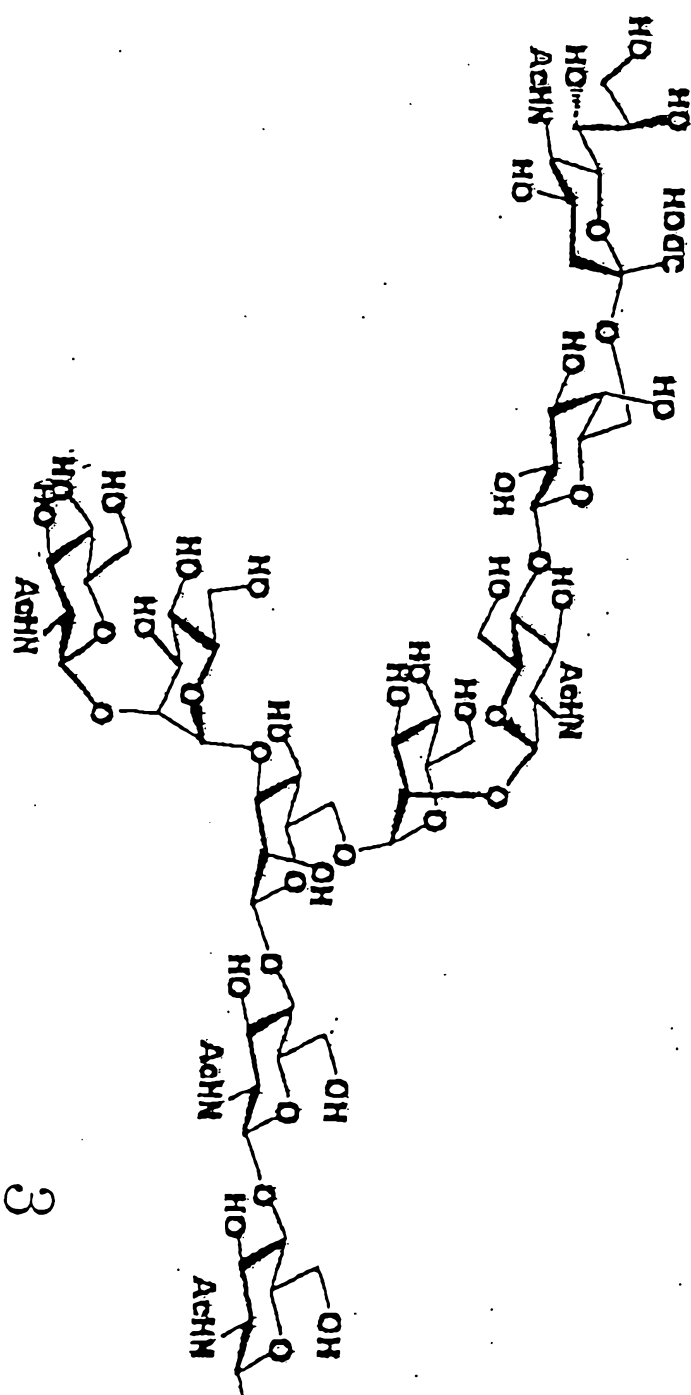
圖 1



71

Asn-Fmoc

圖 1



Asn-Fmoc

圖 2

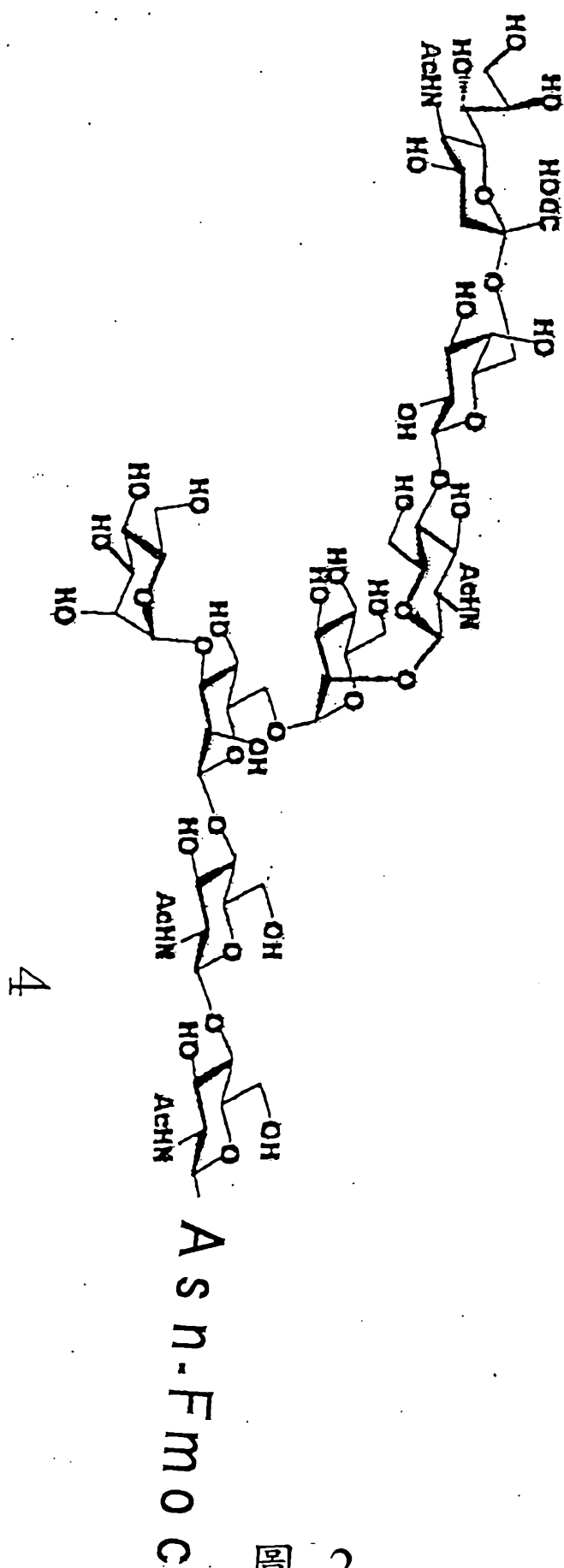


圖 2

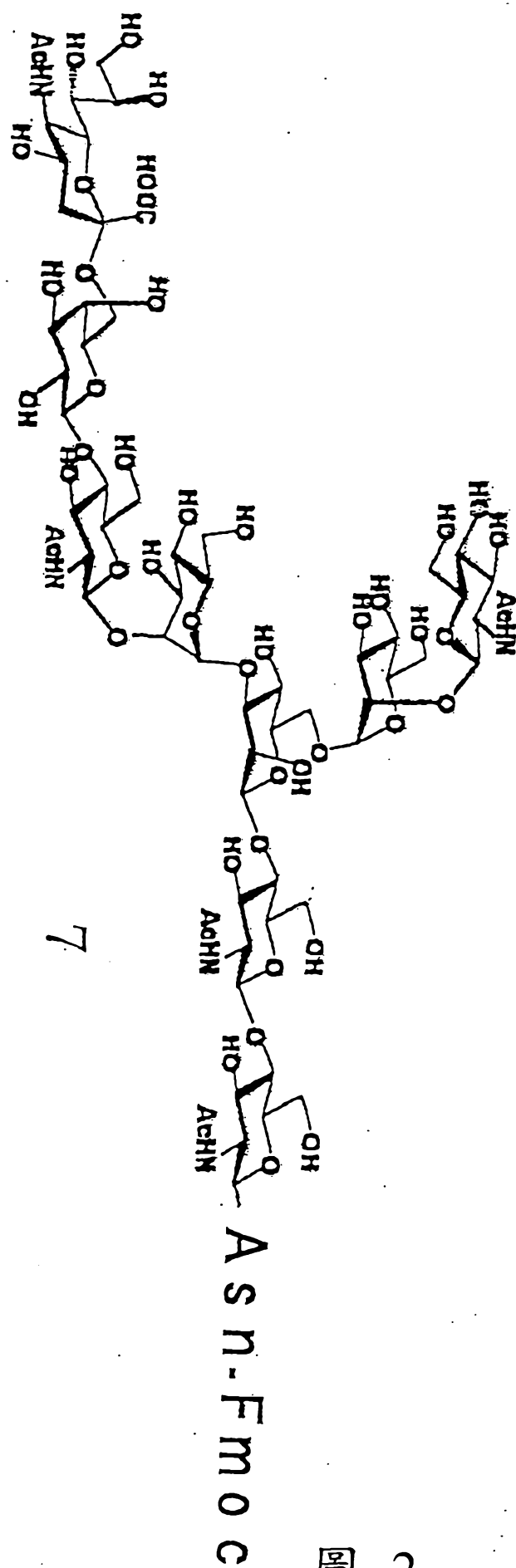
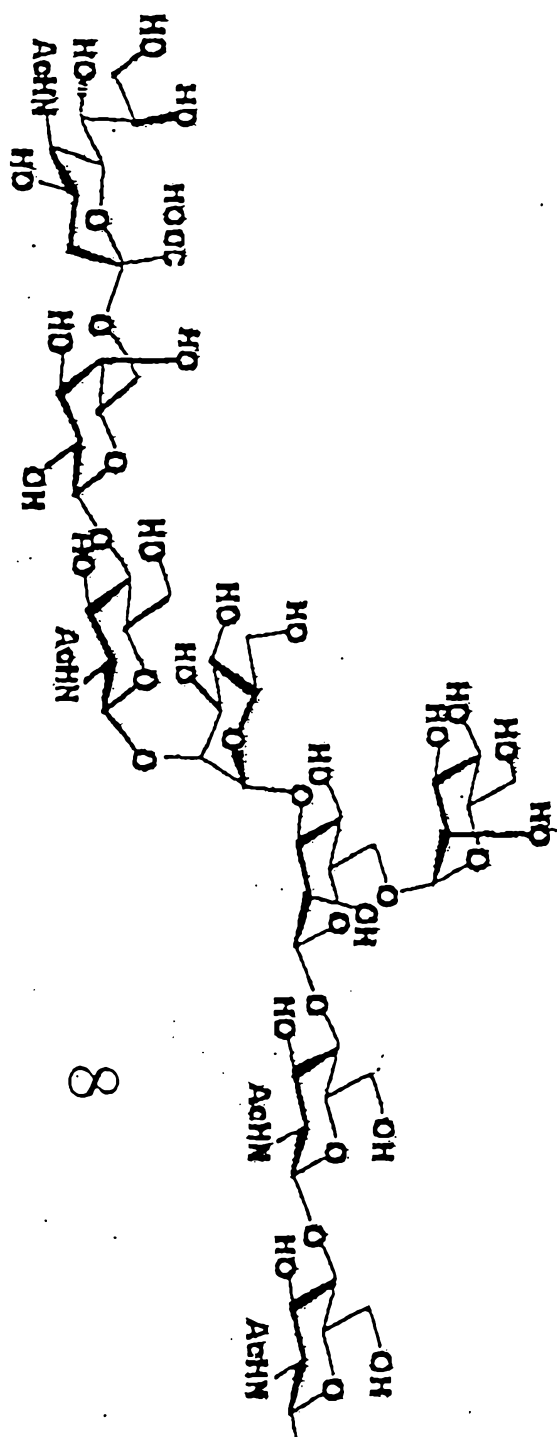


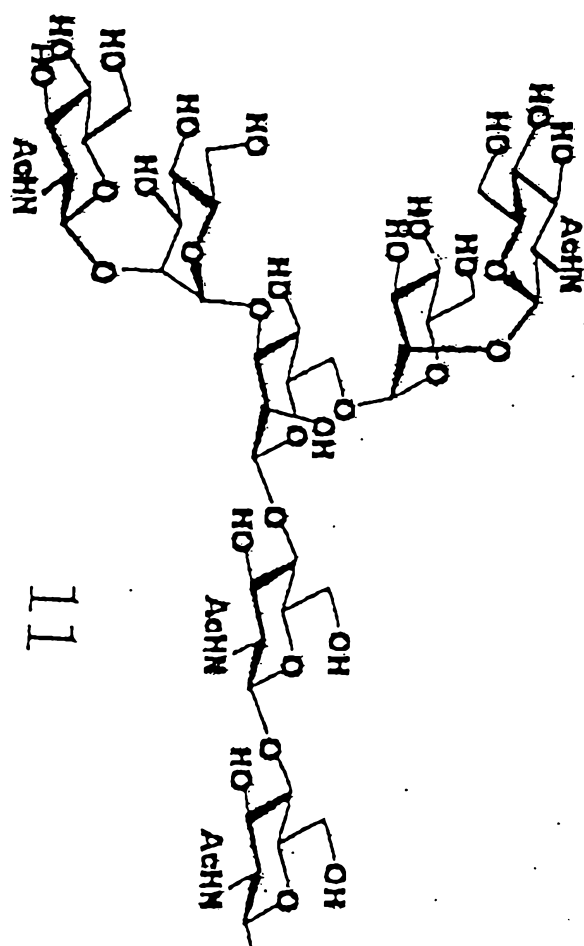
圖 2



8

Asn-Fmoc

圖 2



11

Asn-Fmoc

圖 2

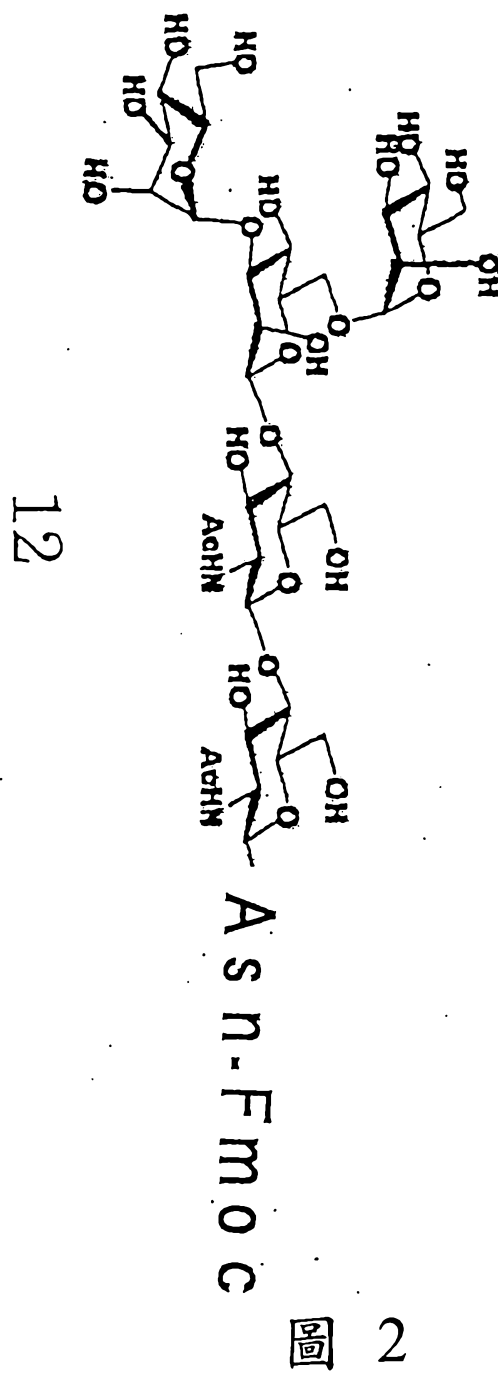


圖 2

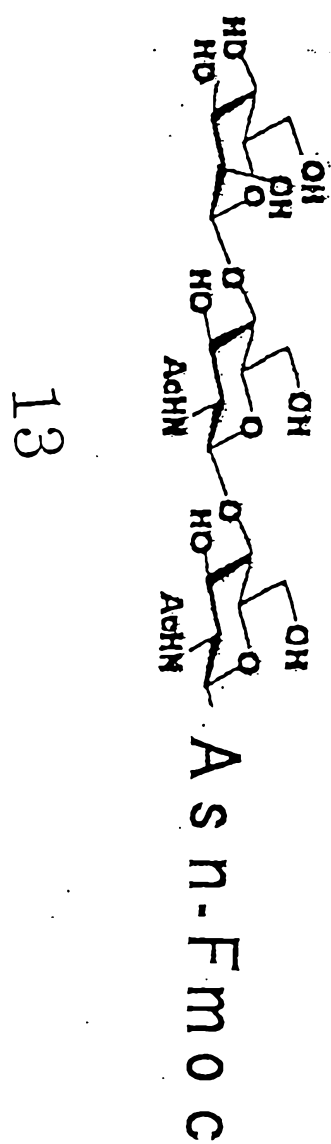
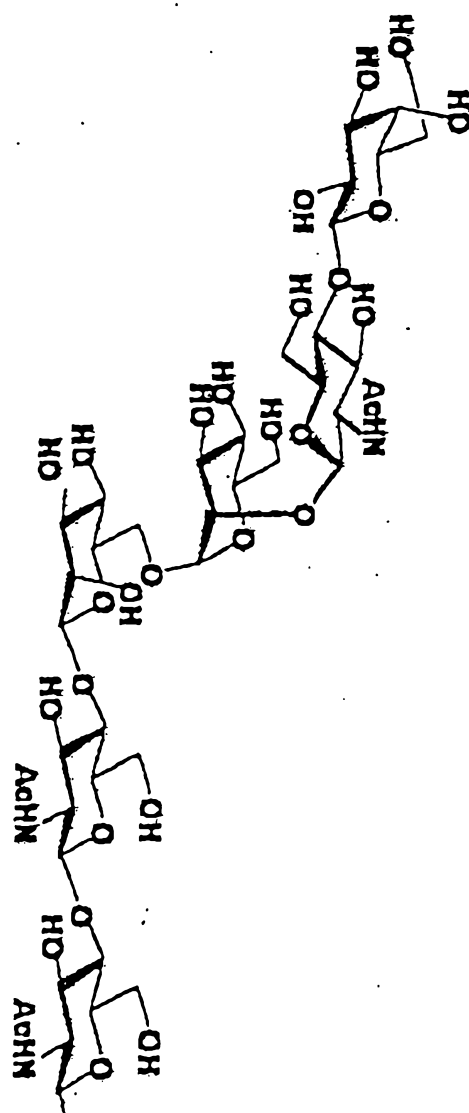


圖 2

16



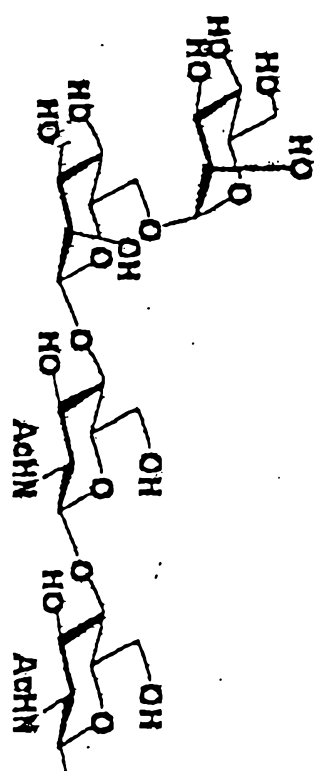
Asn-Fmoc

2



Asn-Fmoc

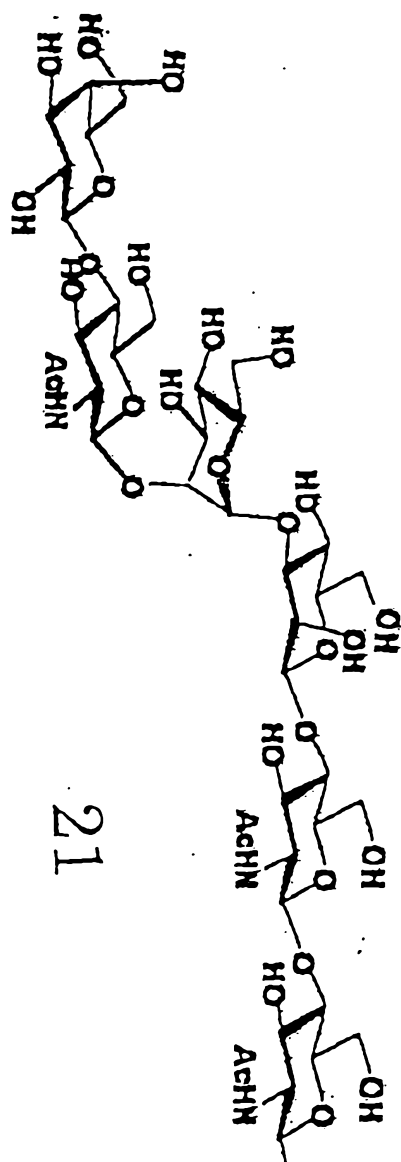
圖 2



Asn-Fmoc

圖 2

18



21

Asn-Fmoc

圖 2

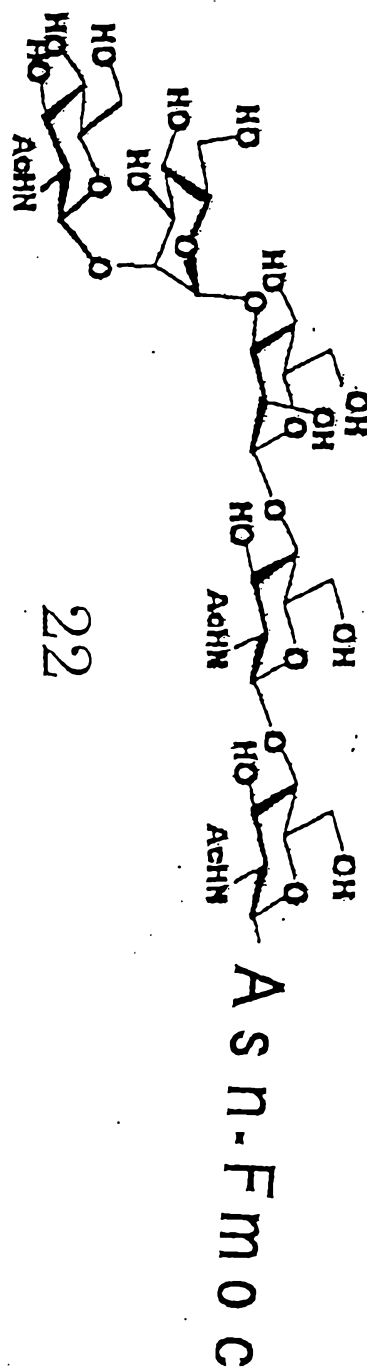


圖 2

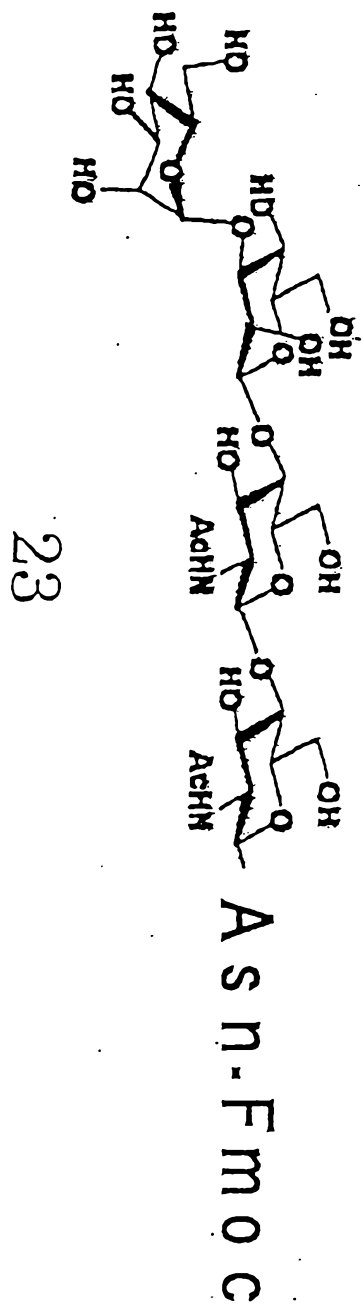
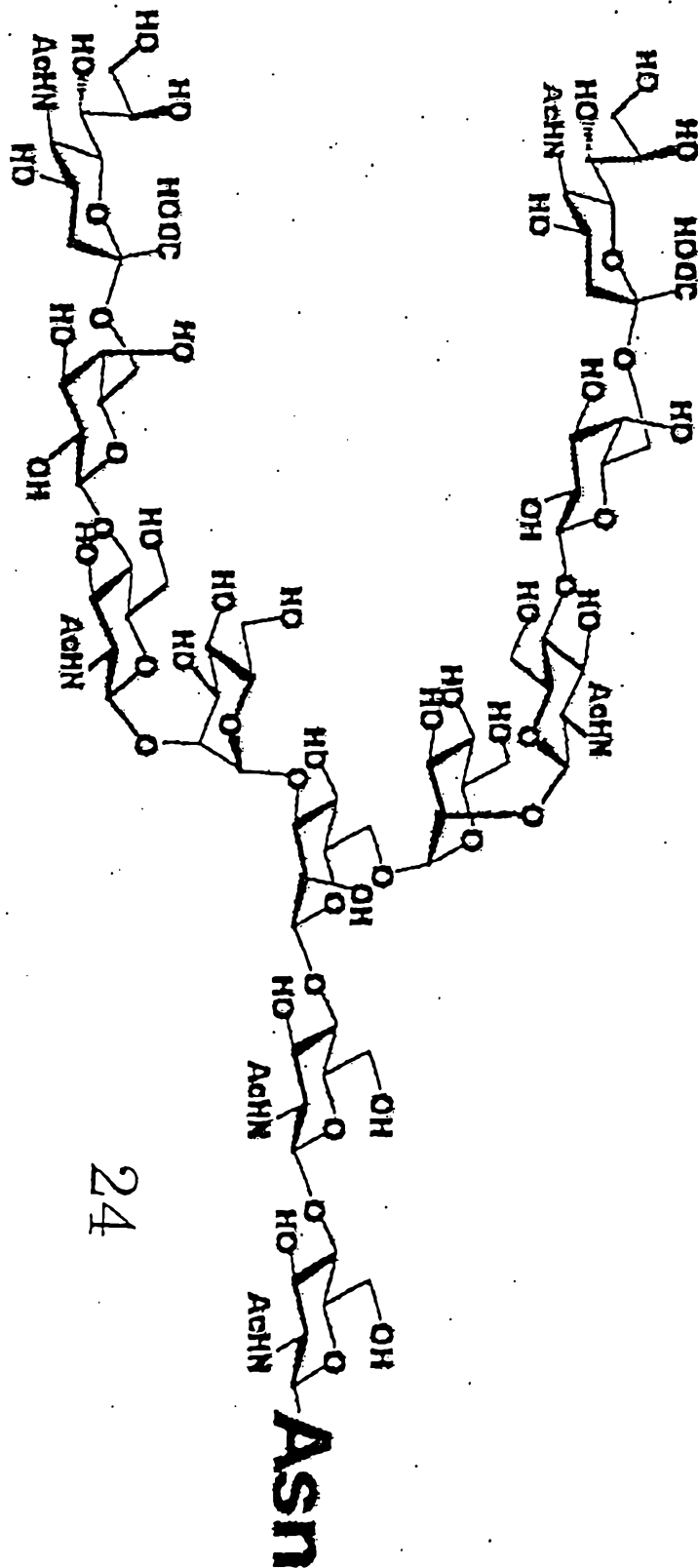


圖 2



24

圖 3

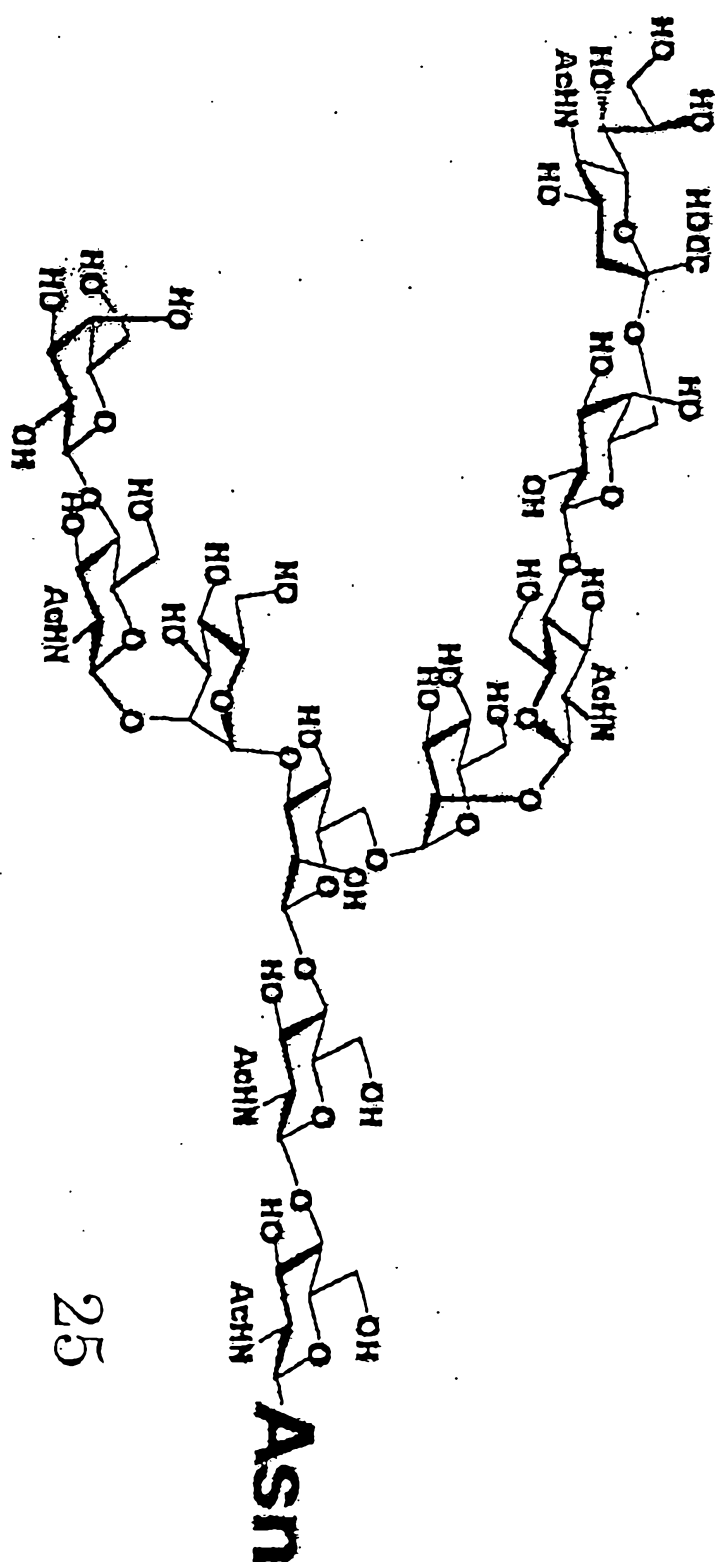


圖 3

28

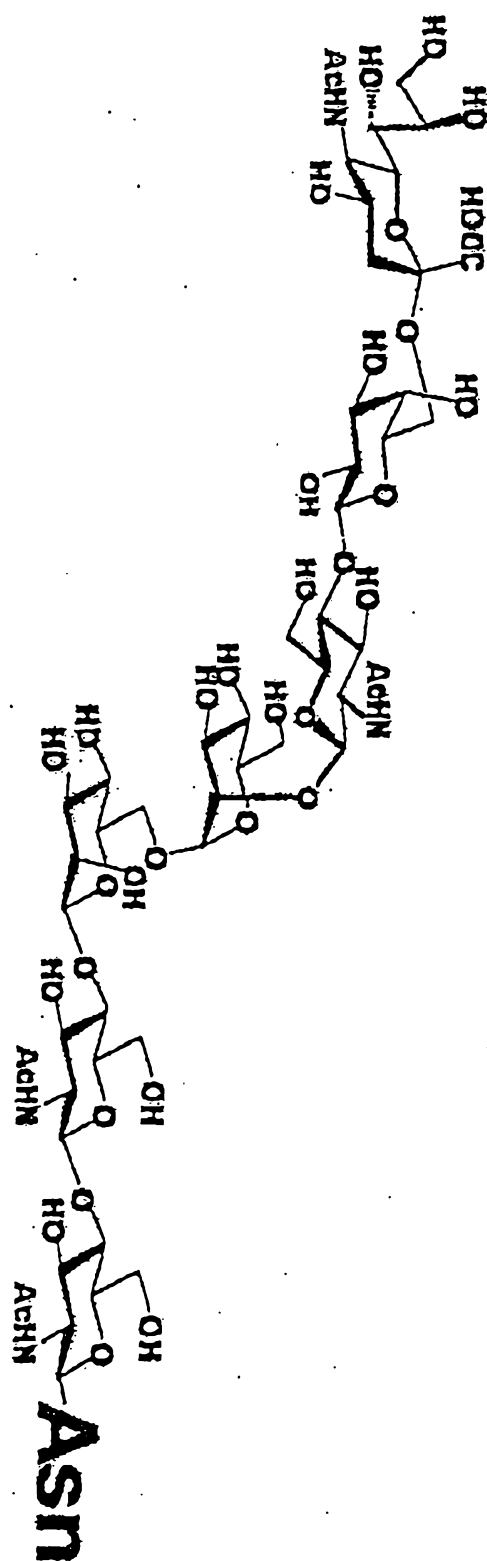


圖 3

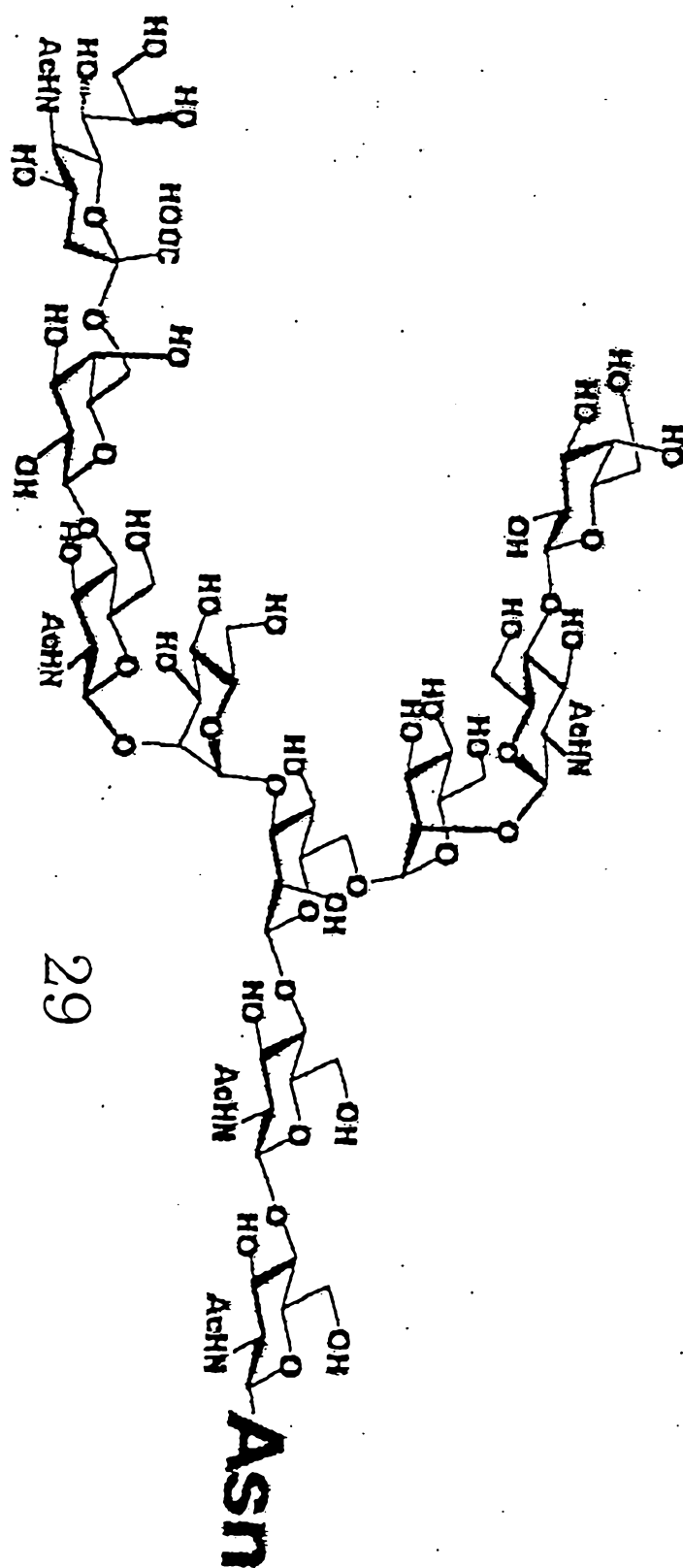
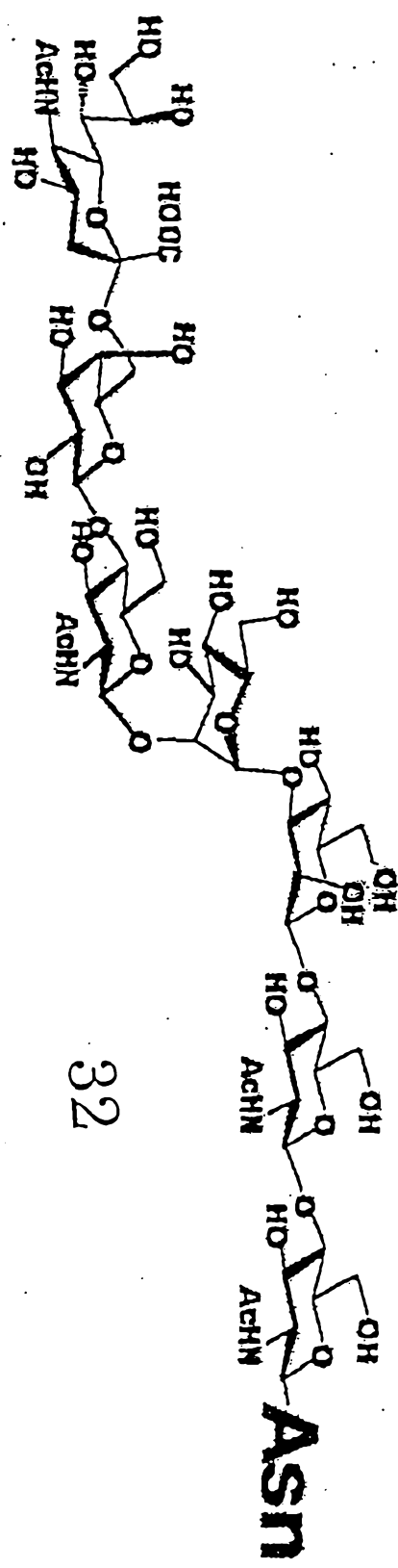
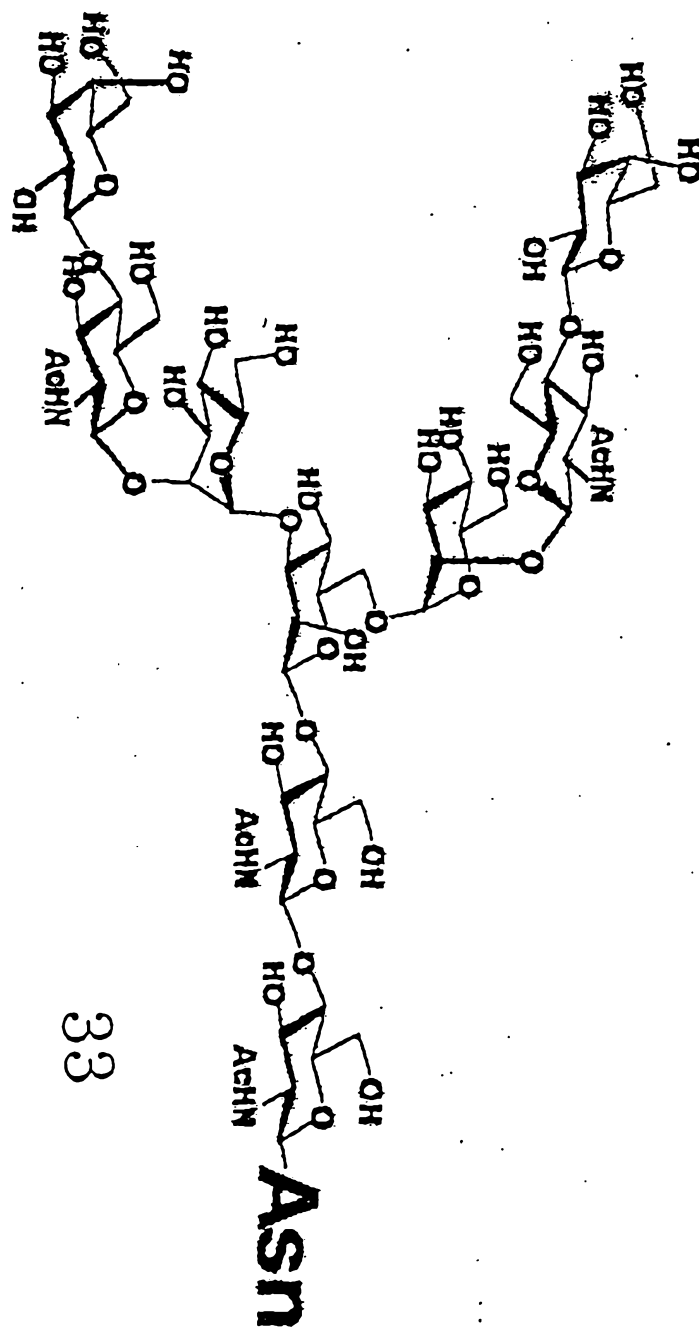


圖 3



Asn

圖 3



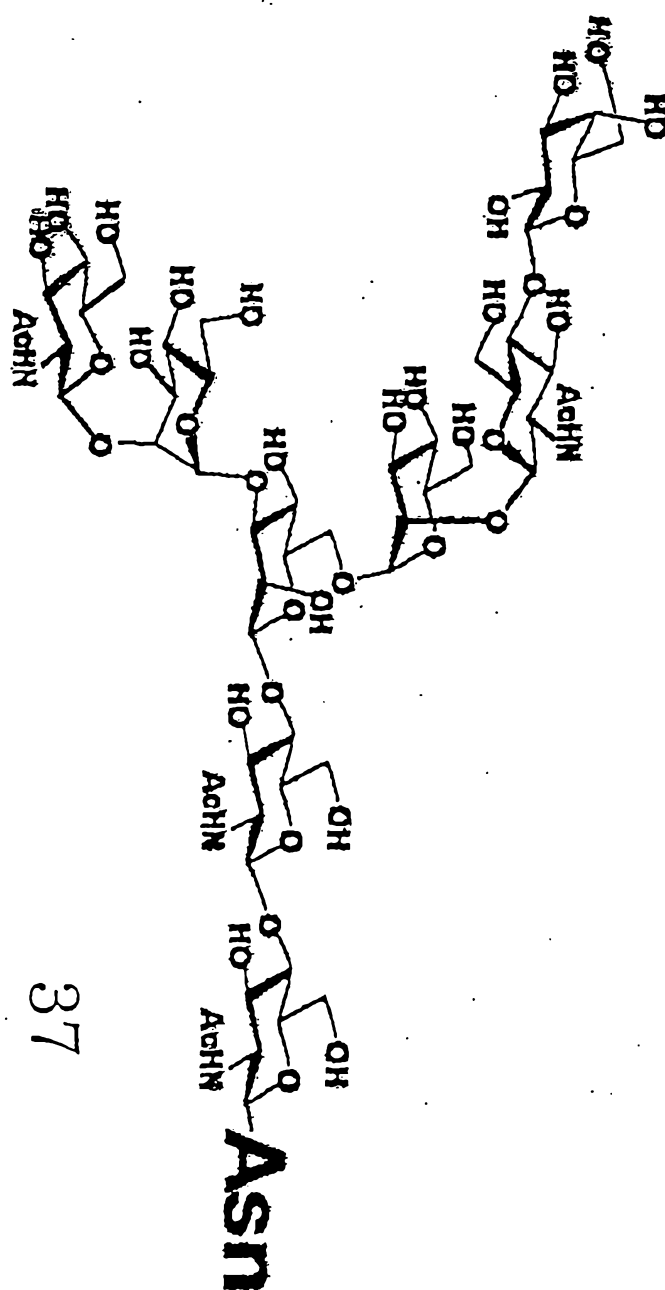
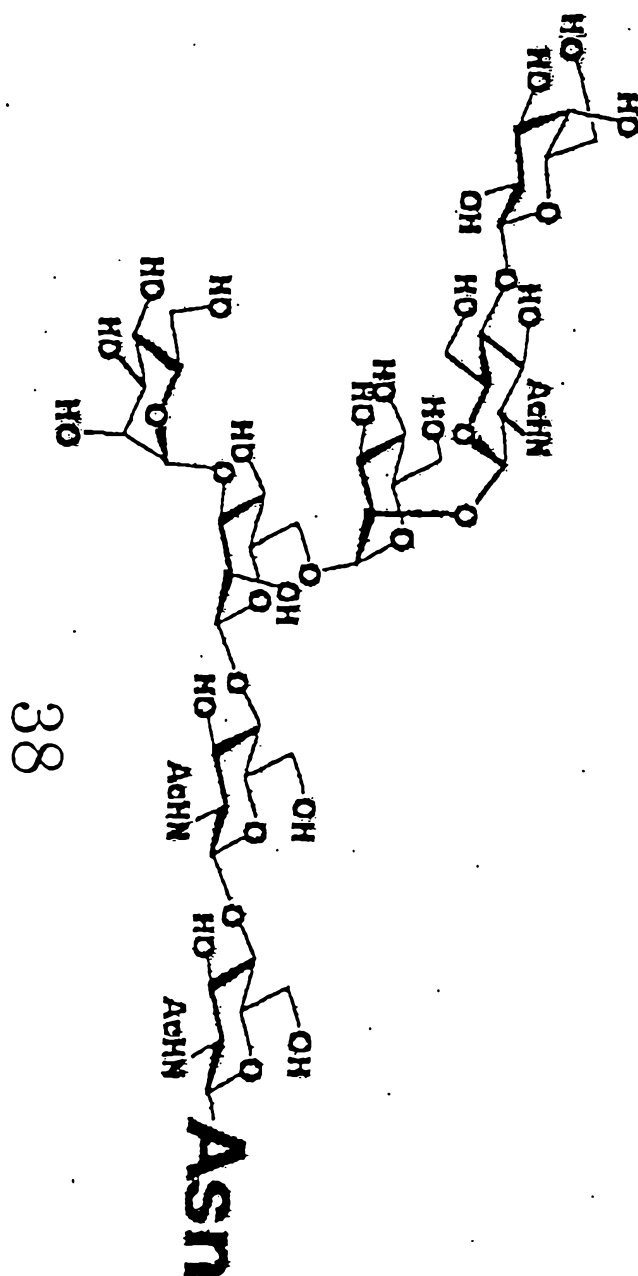
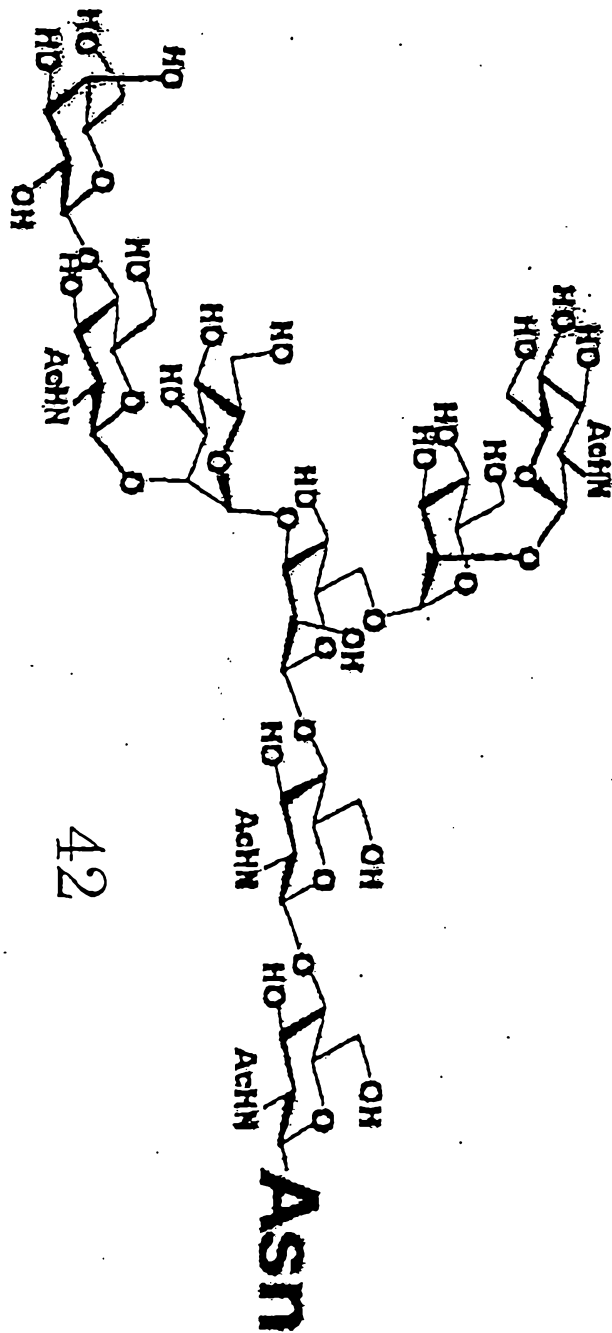


圖 3



3



Asn

圖 3

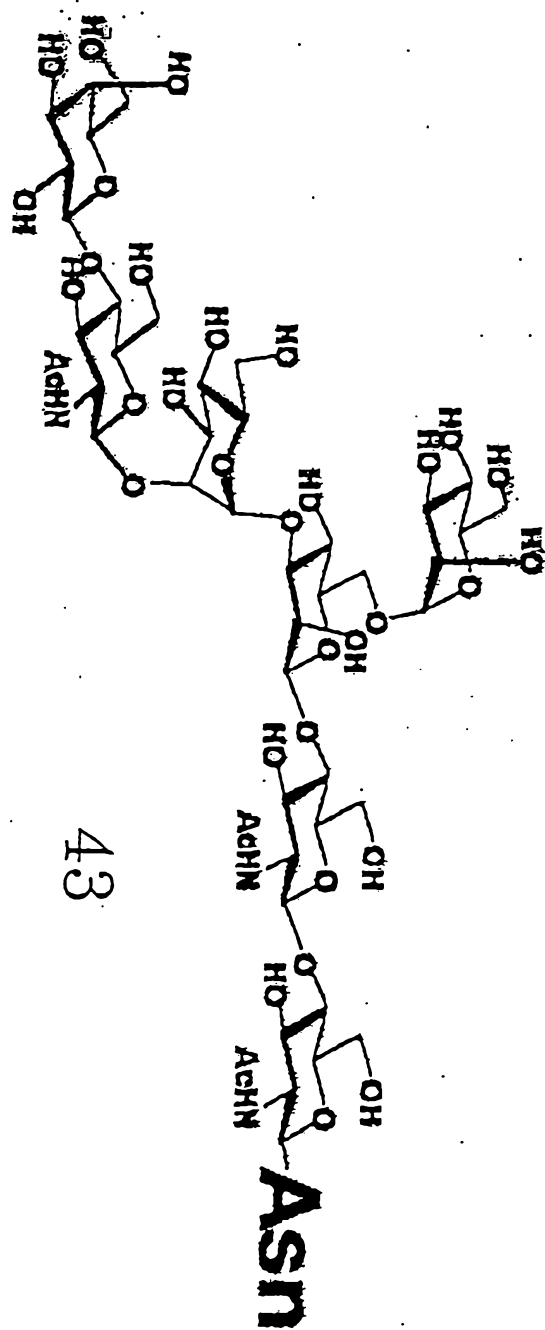


圖 3

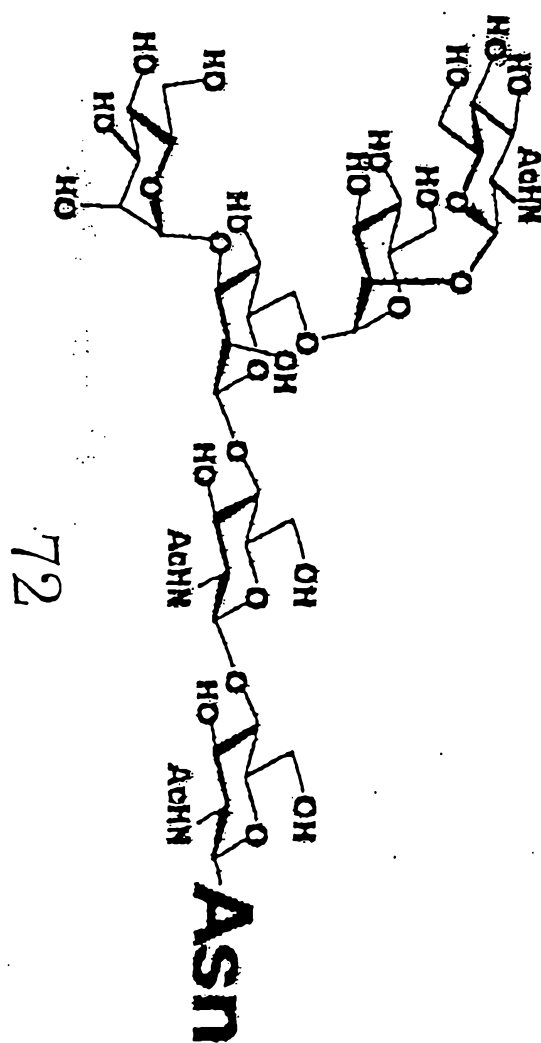
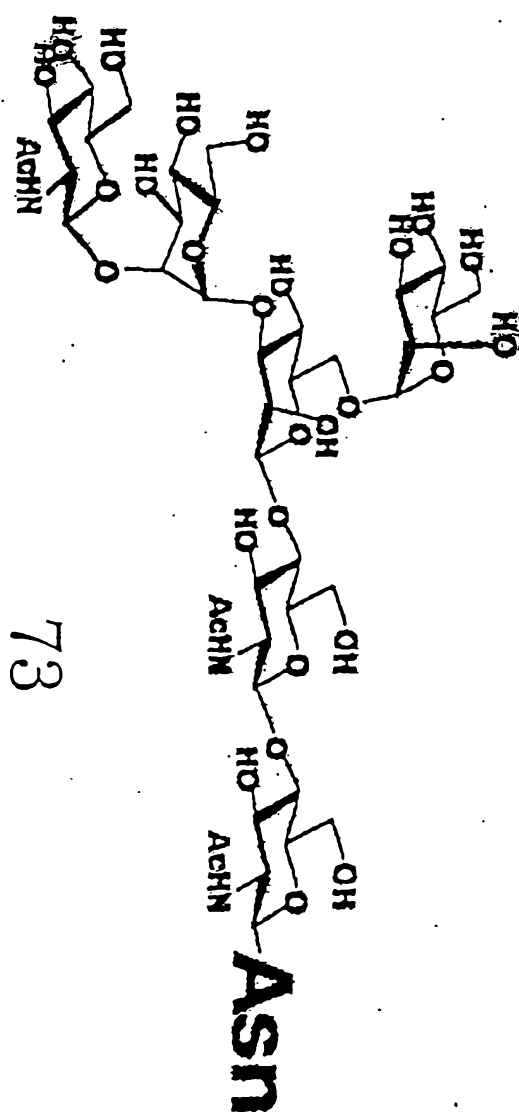
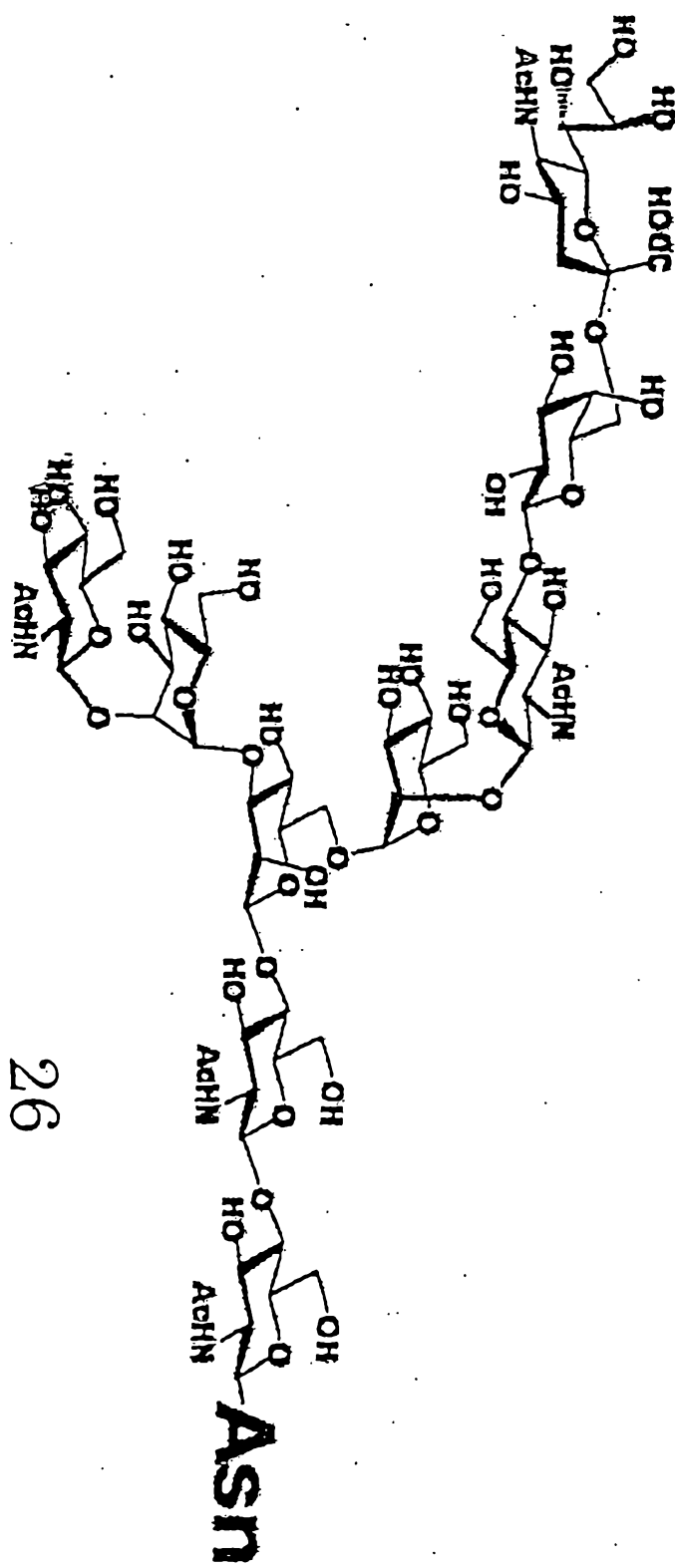


圖 3



73

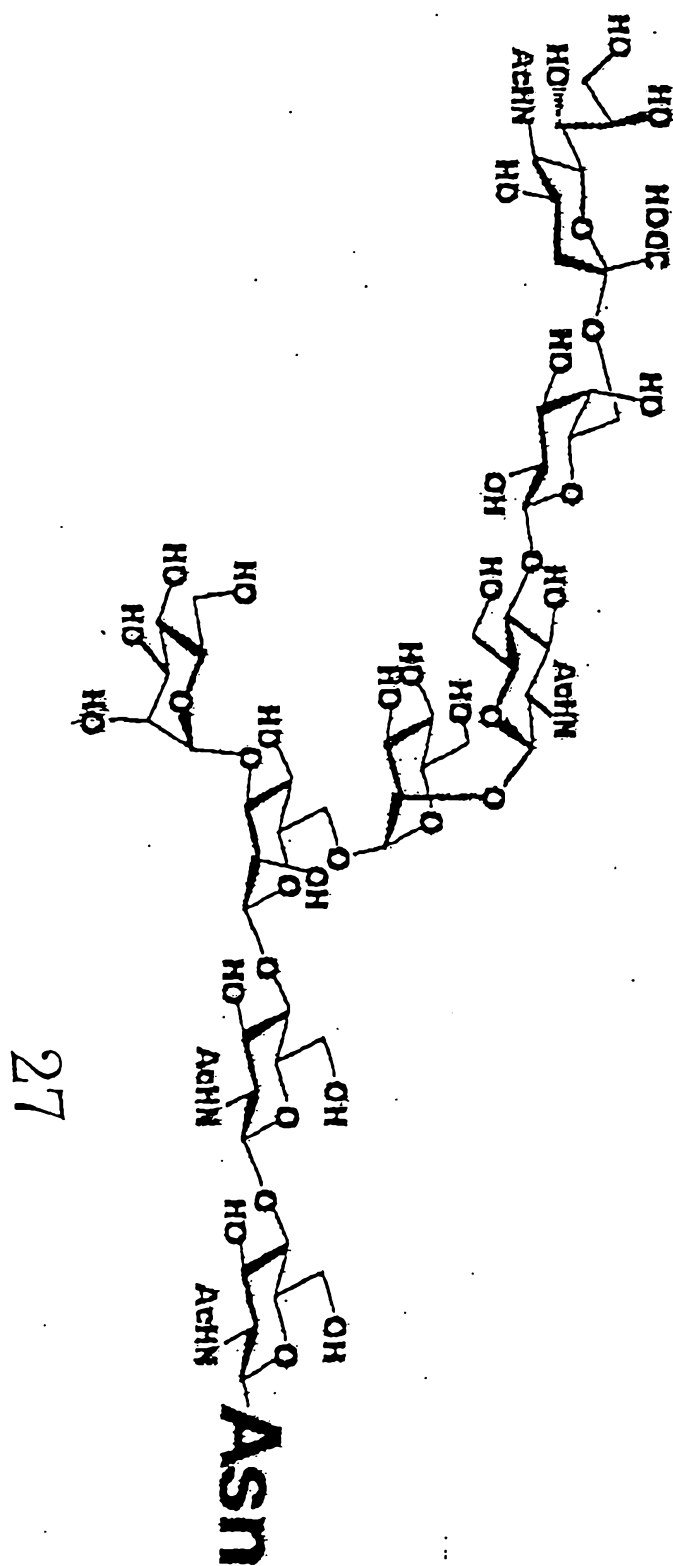
圖 3



26

Asn

圖 4



27

Asn

4

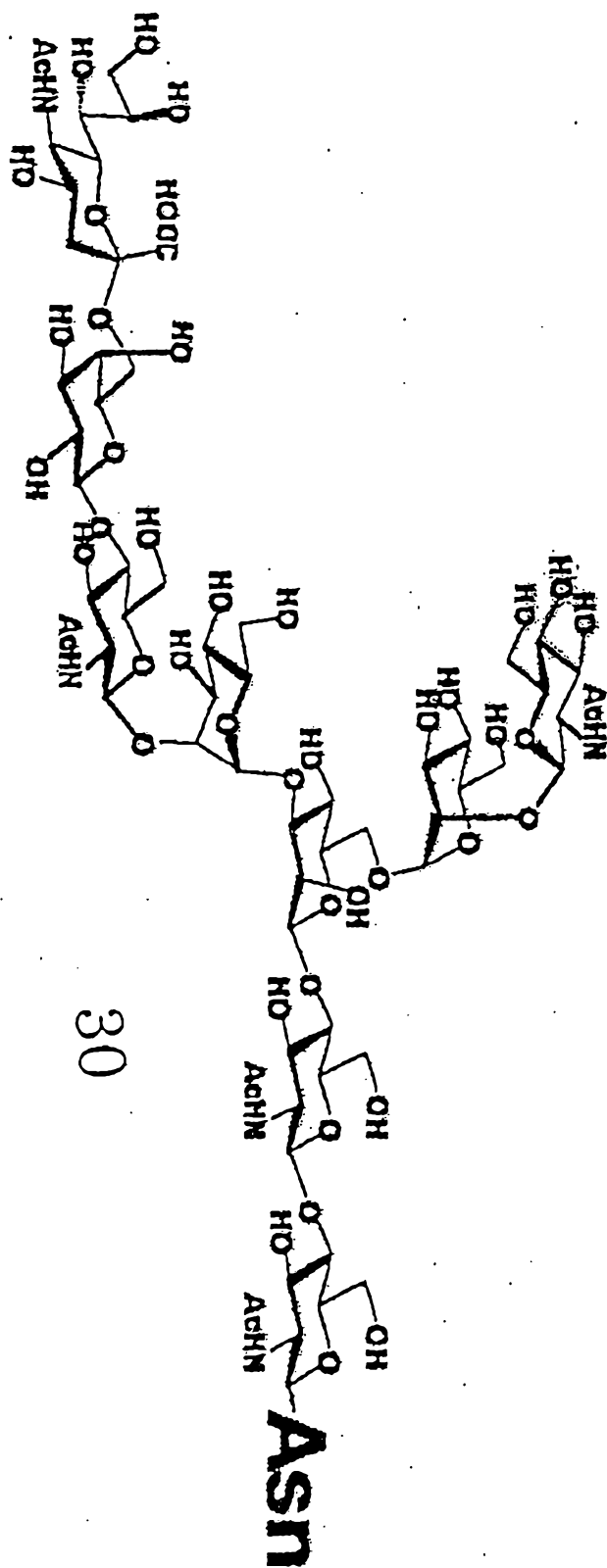


圖 4

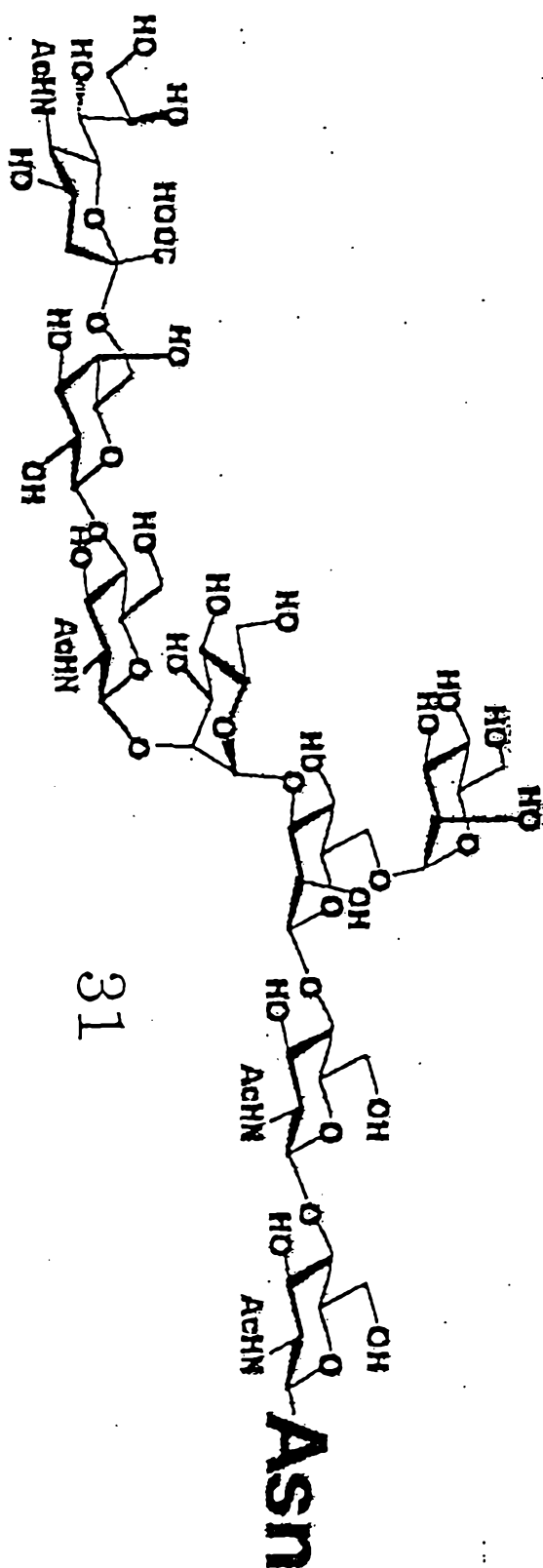


圖 4

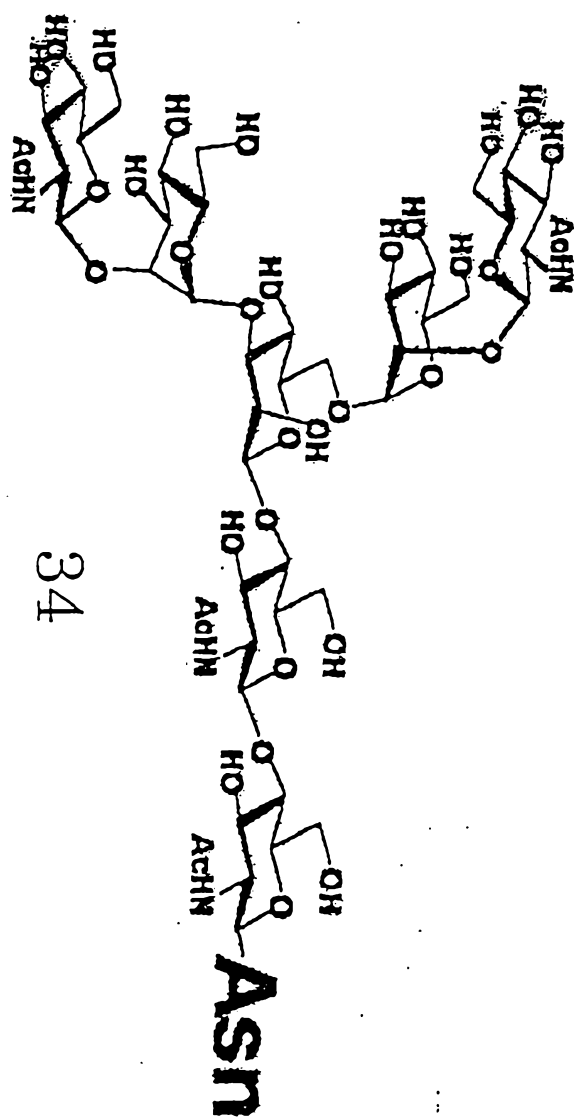


圖 4



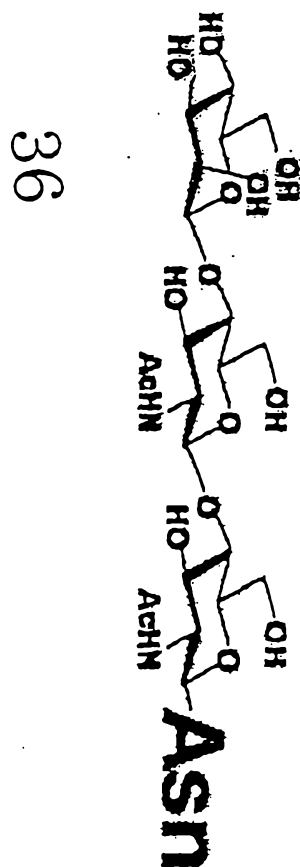


圖 4

39

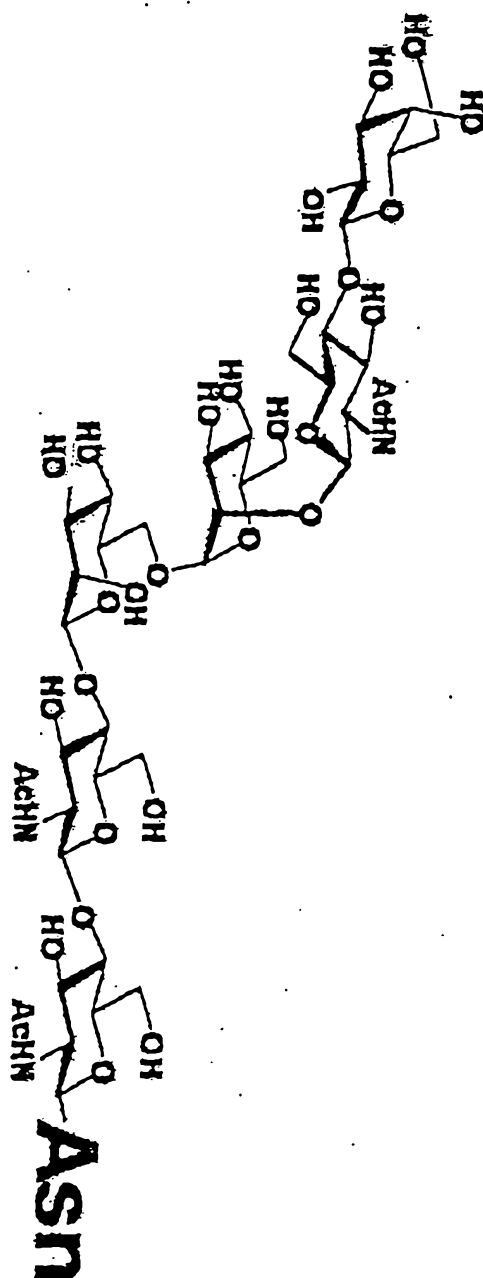


圖 4

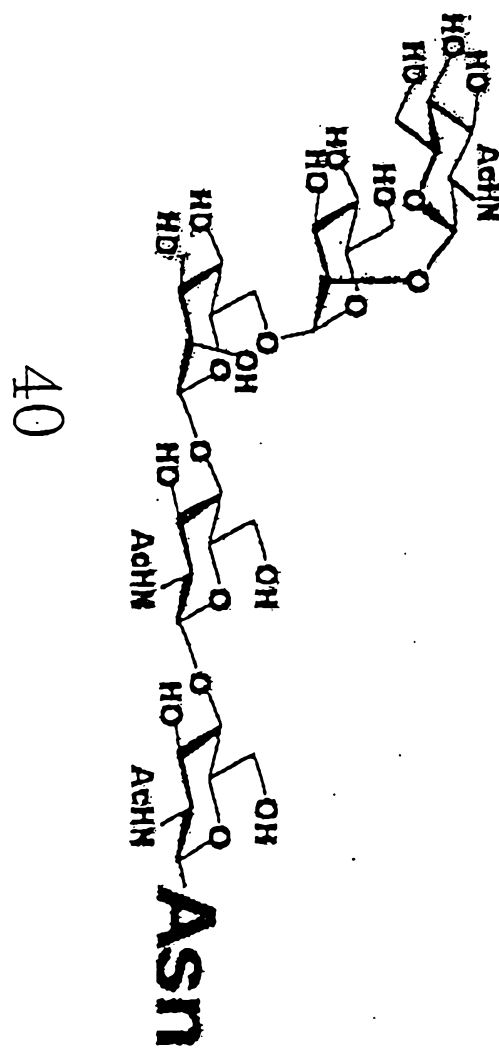


圖 4

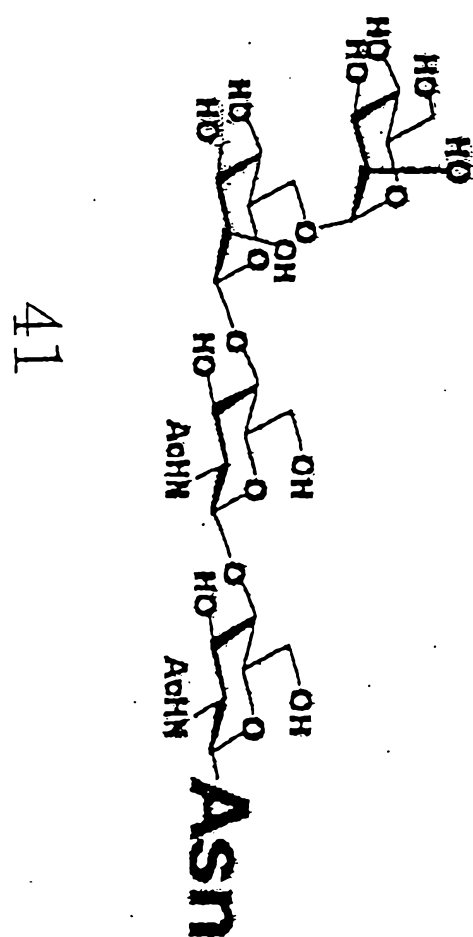


圖 4

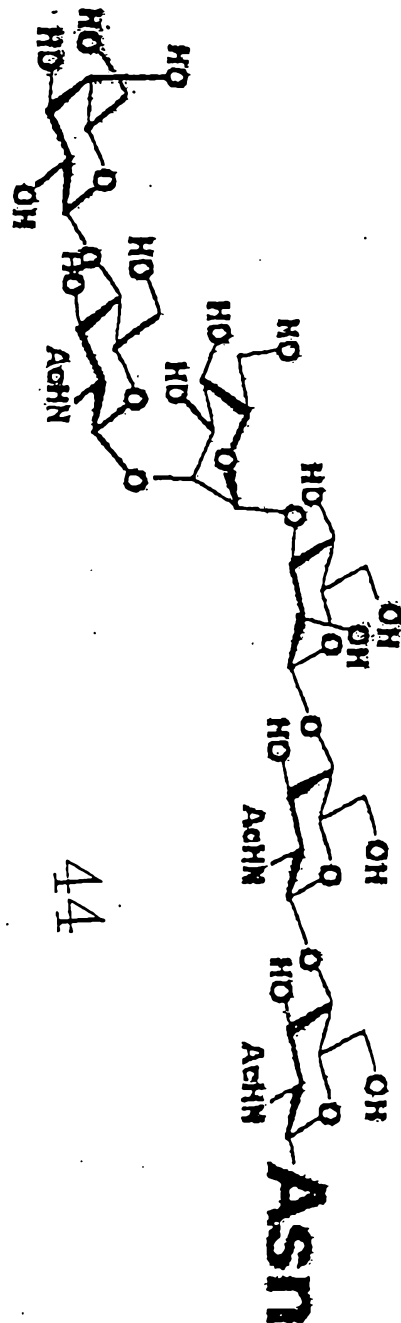


圖 4

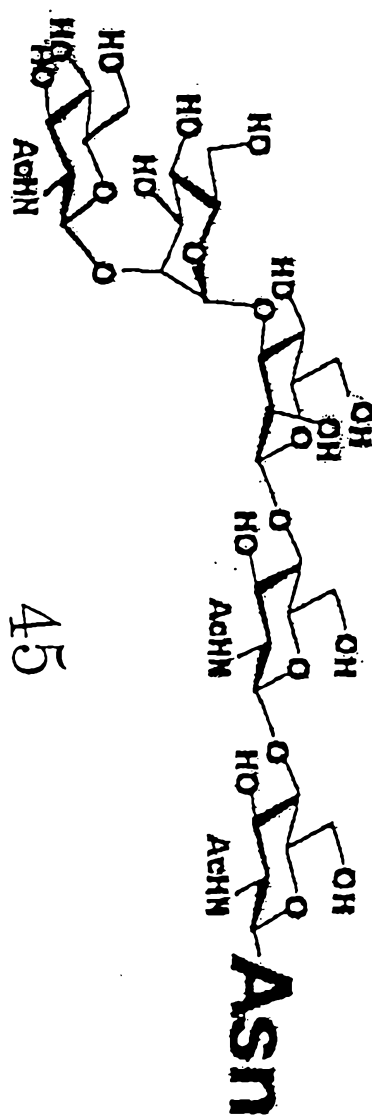


圖 4

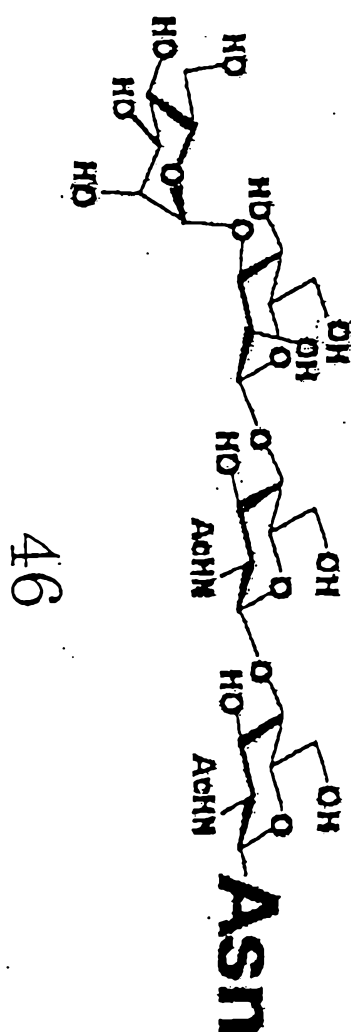


圖 4

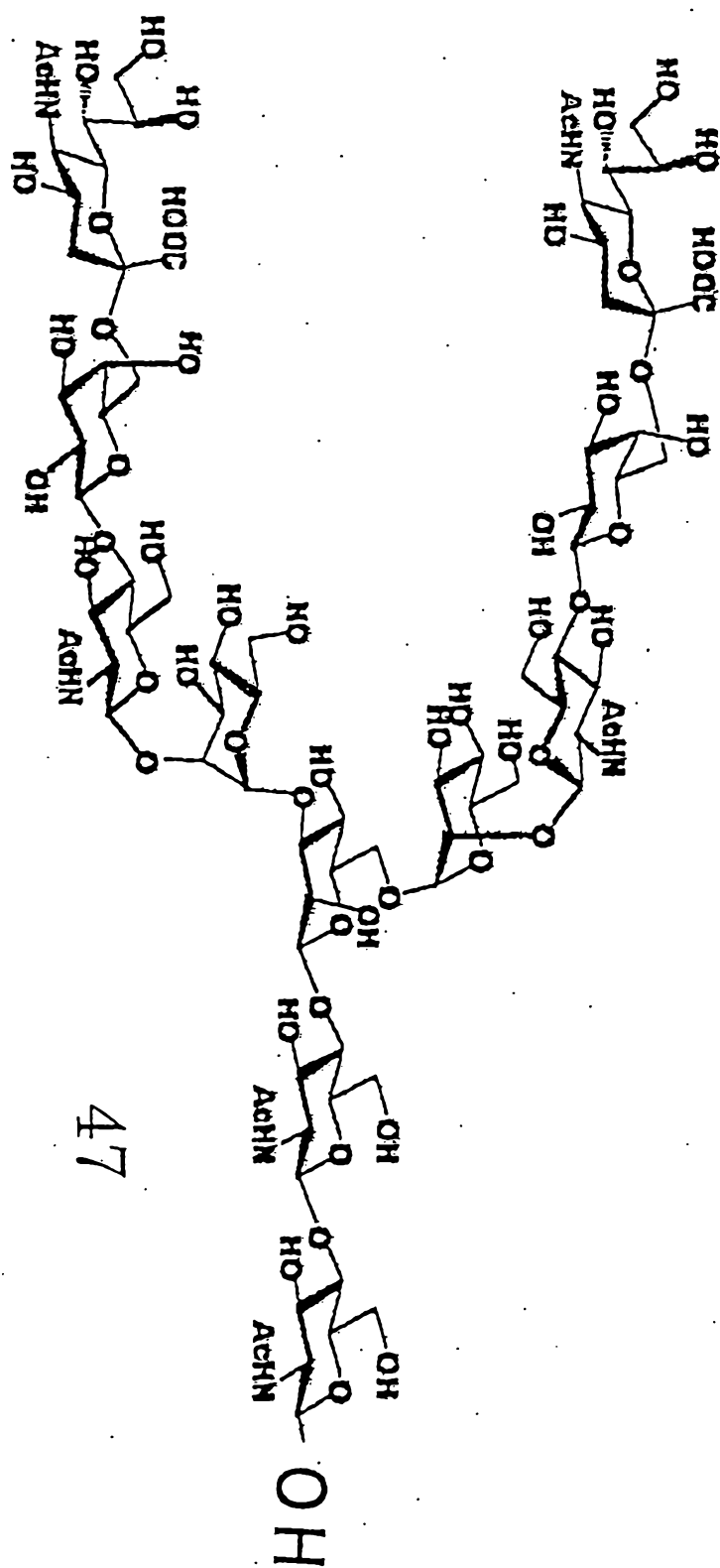


圖 5

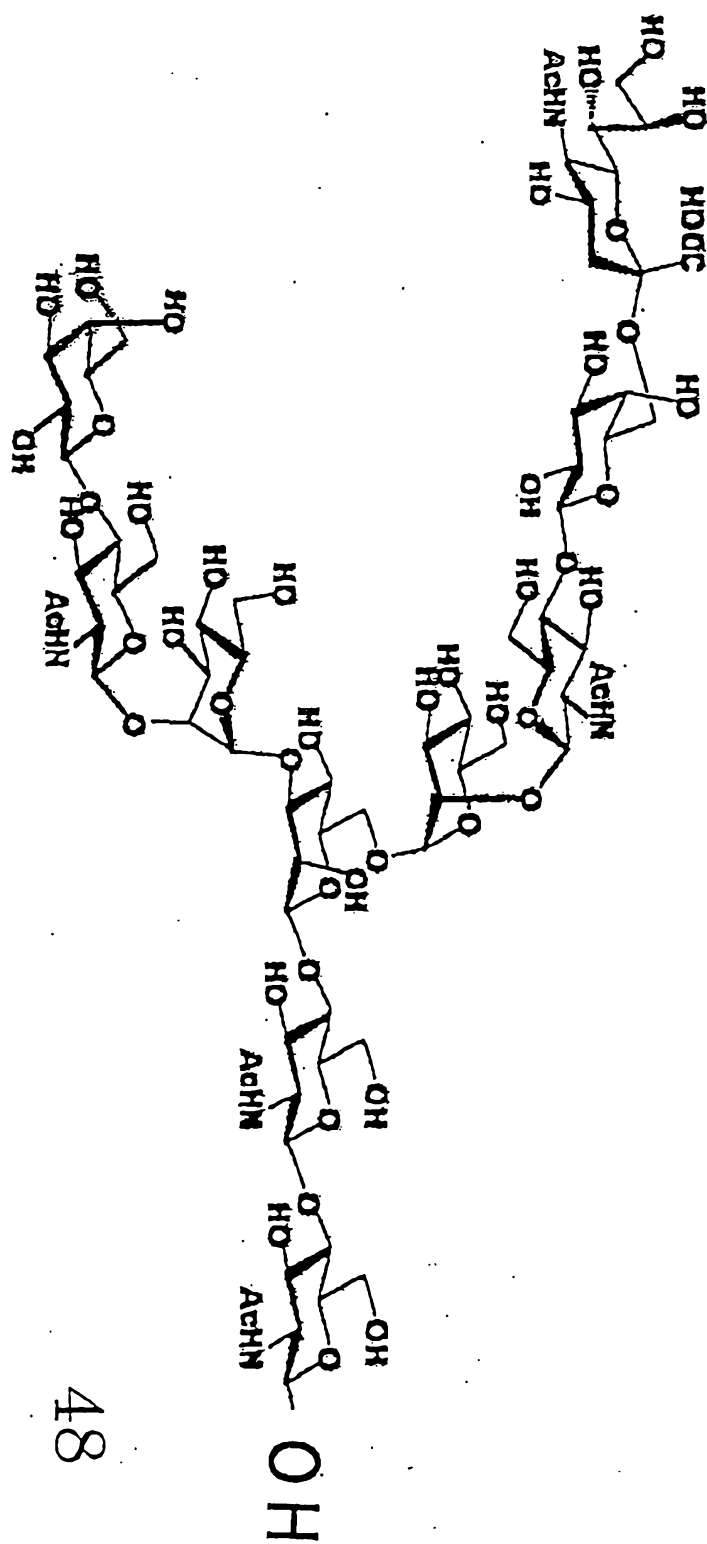


圖 5

48

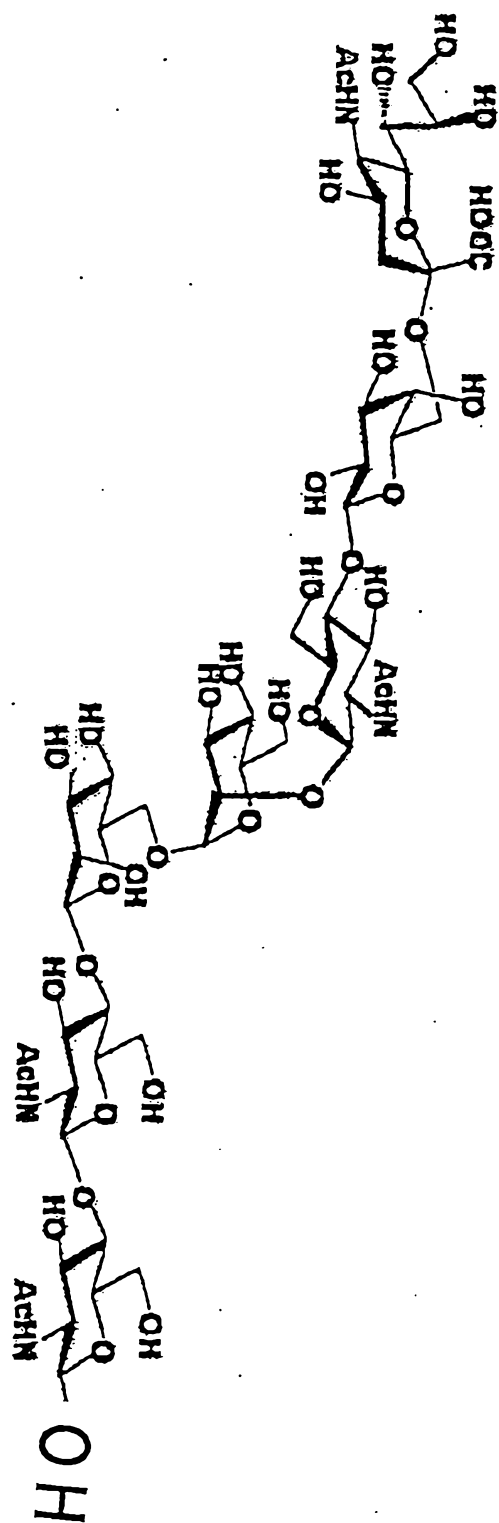


圖 5

51

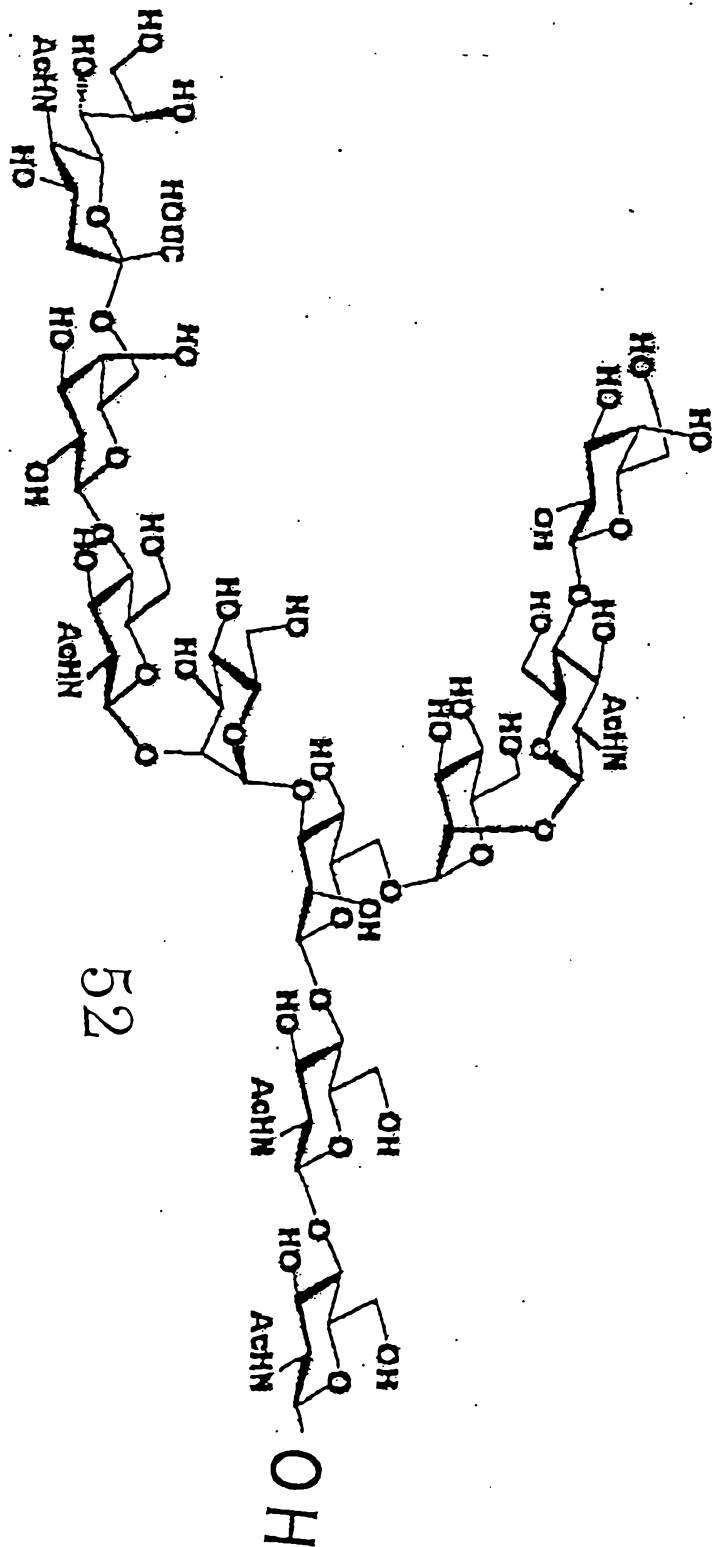


圖 5

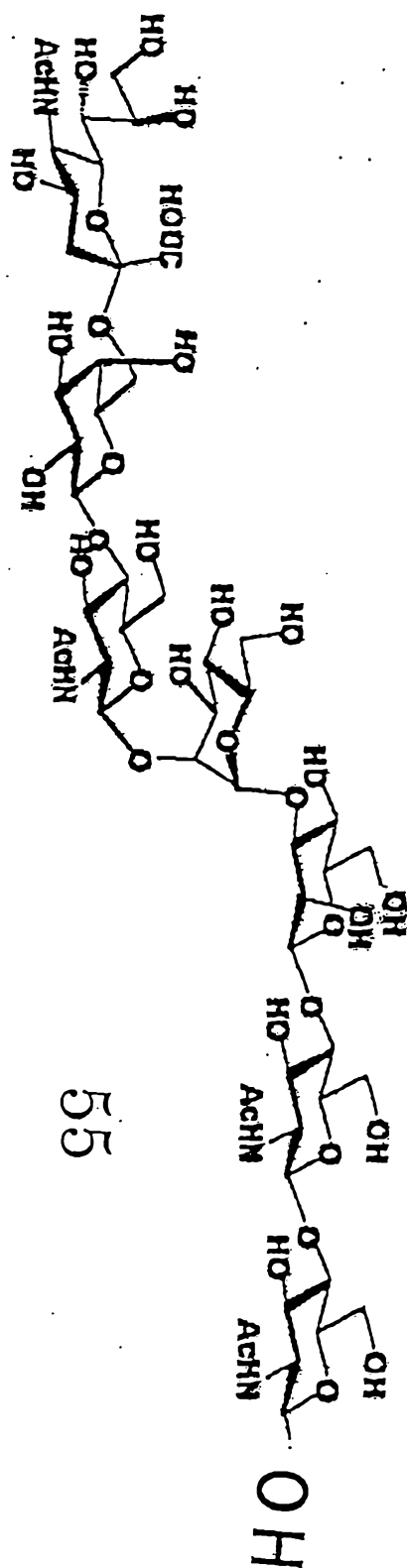
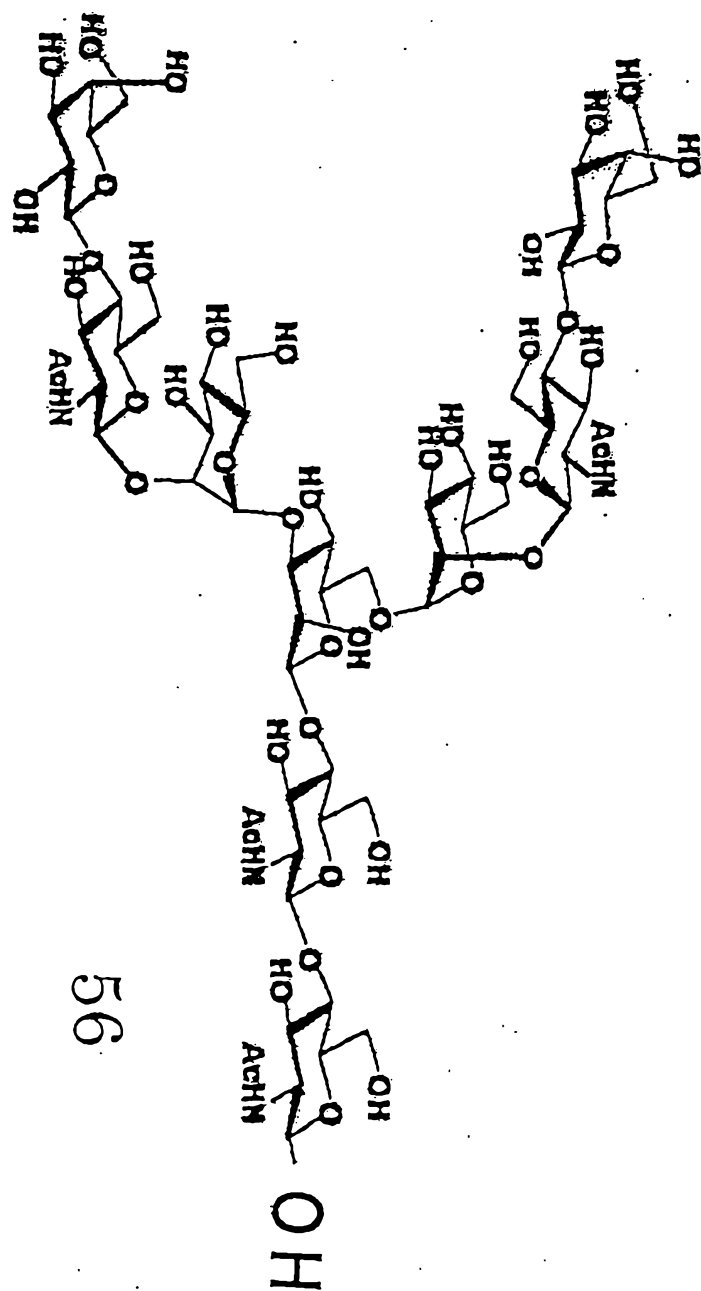


圖 5



56

圖 5

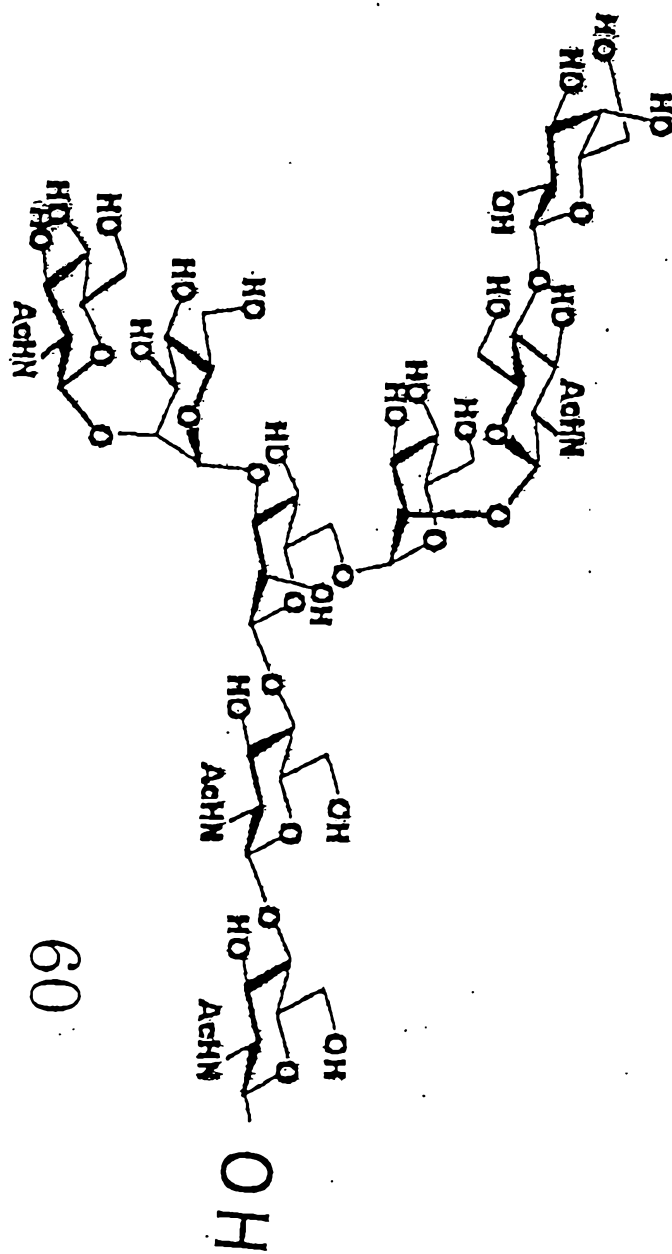


圖 5

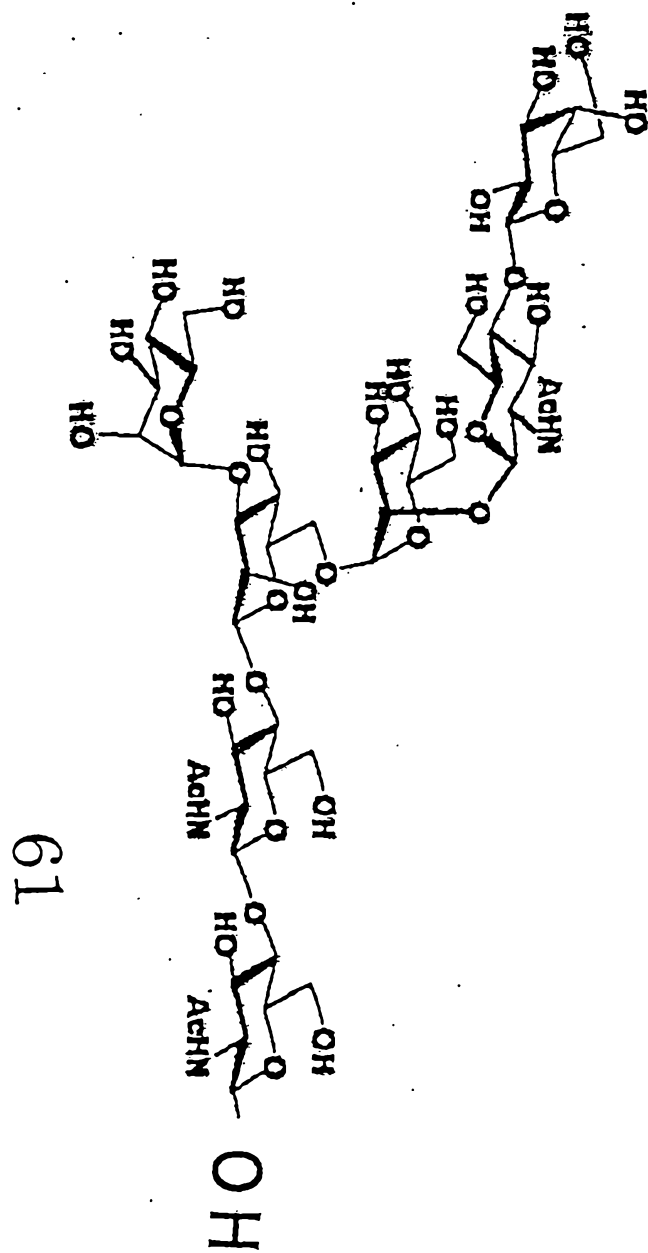
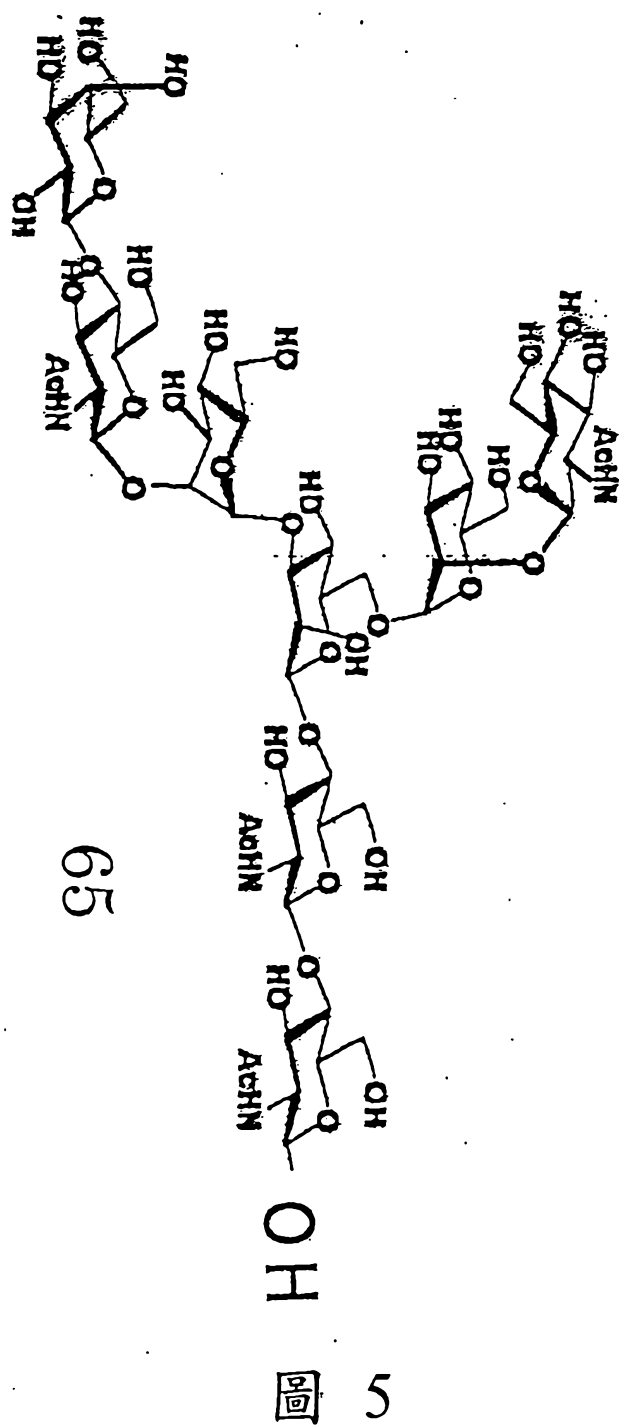
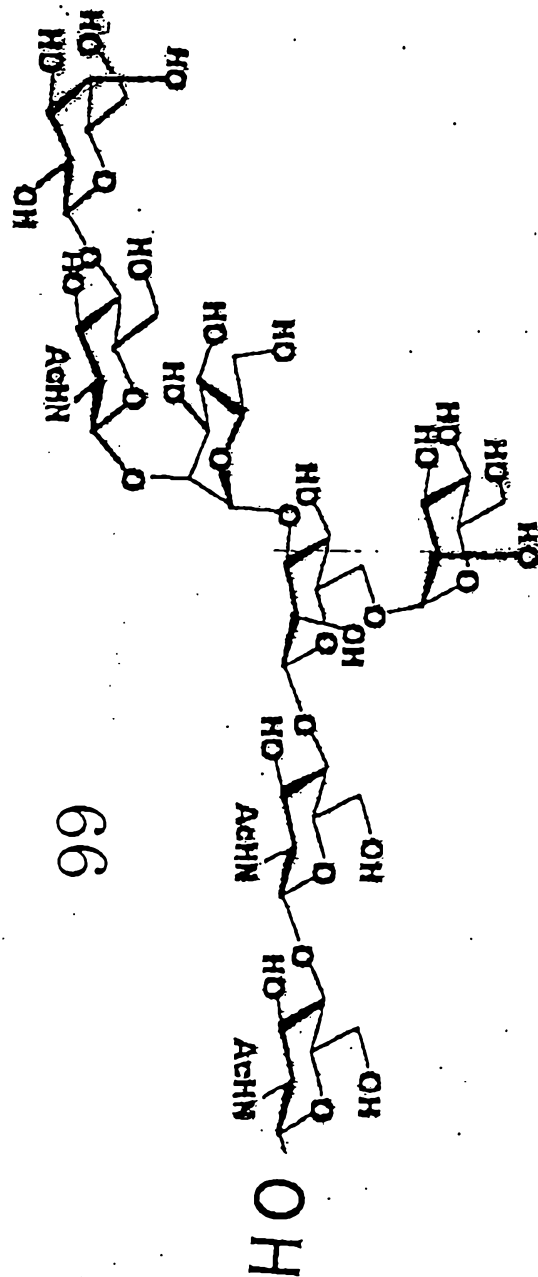


圖 5

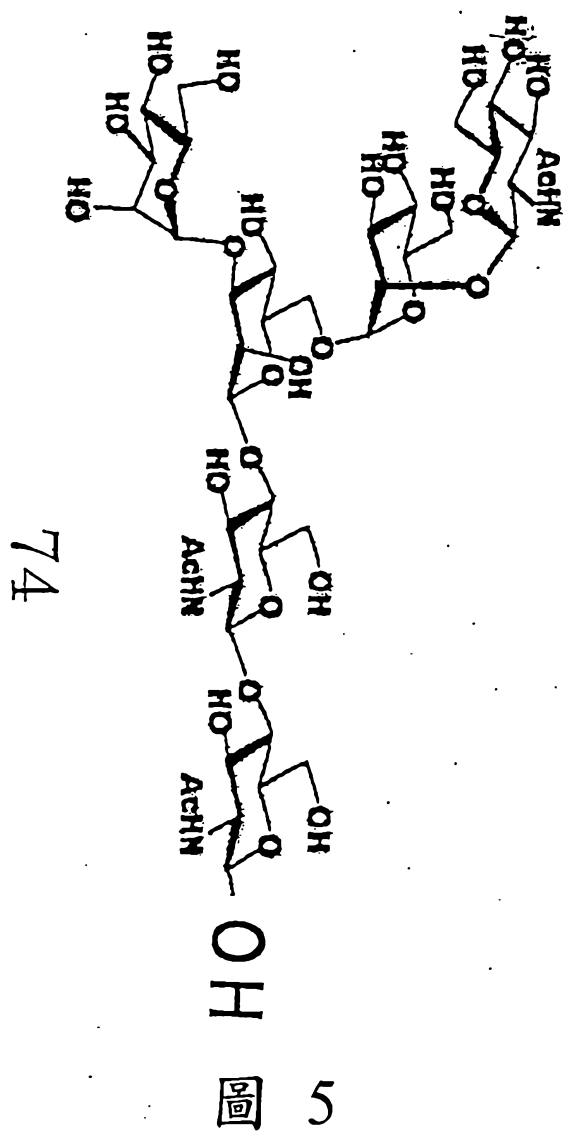


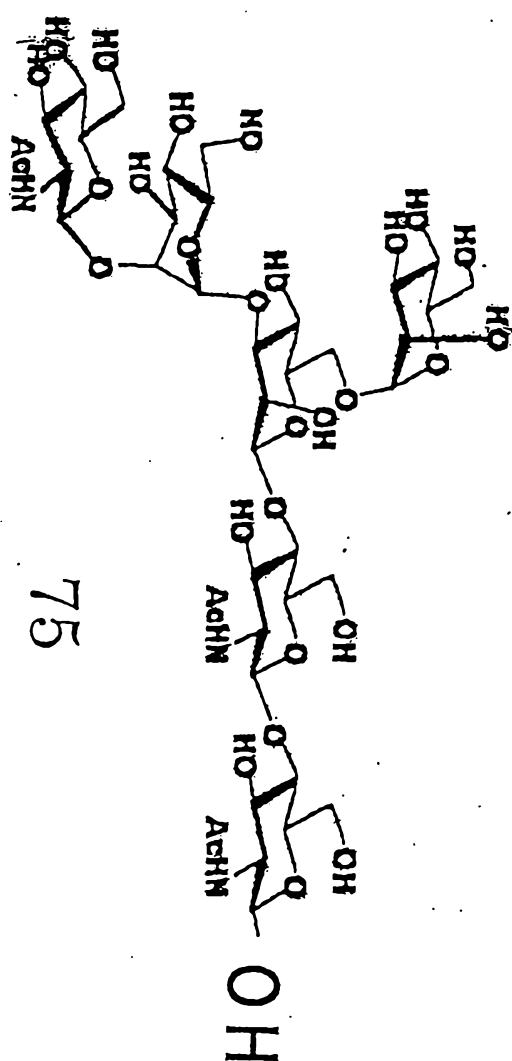


66

HO

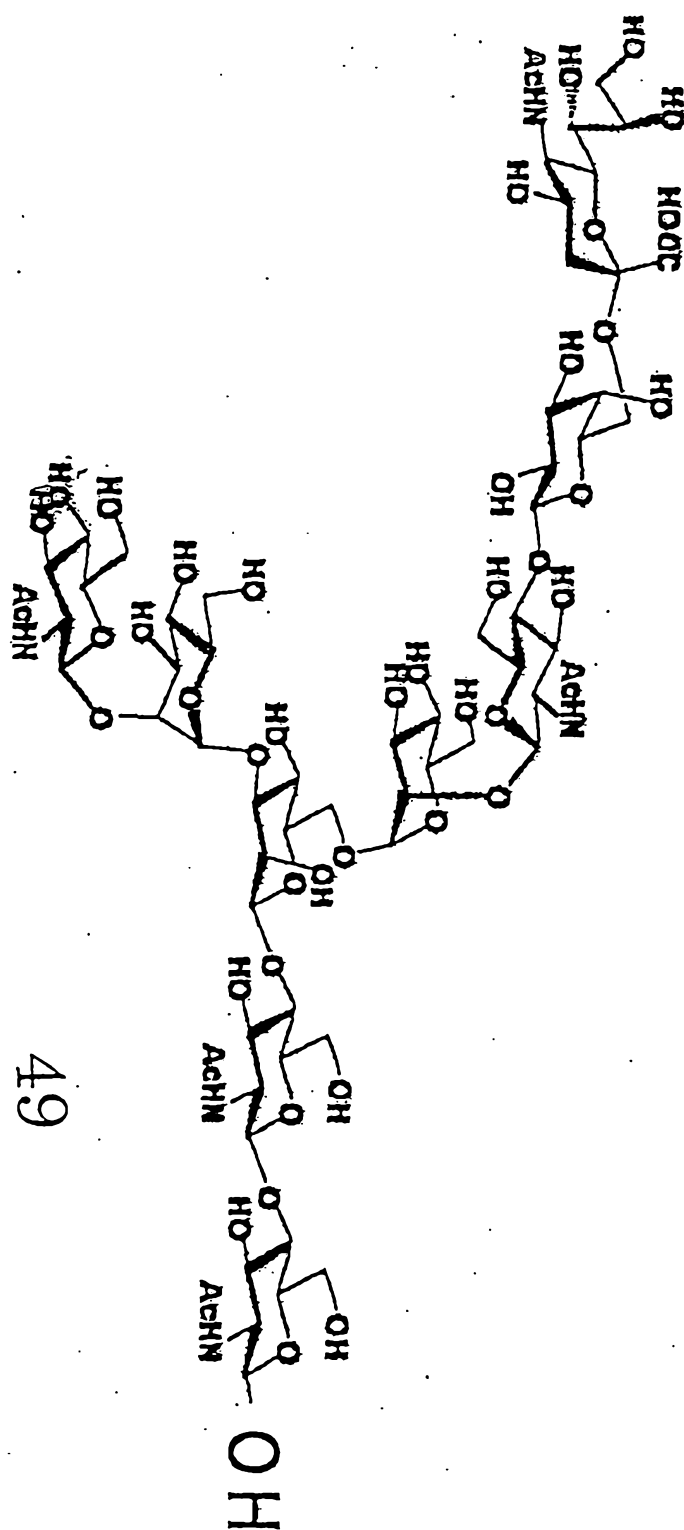
5





75

圖 5



49

圖 6

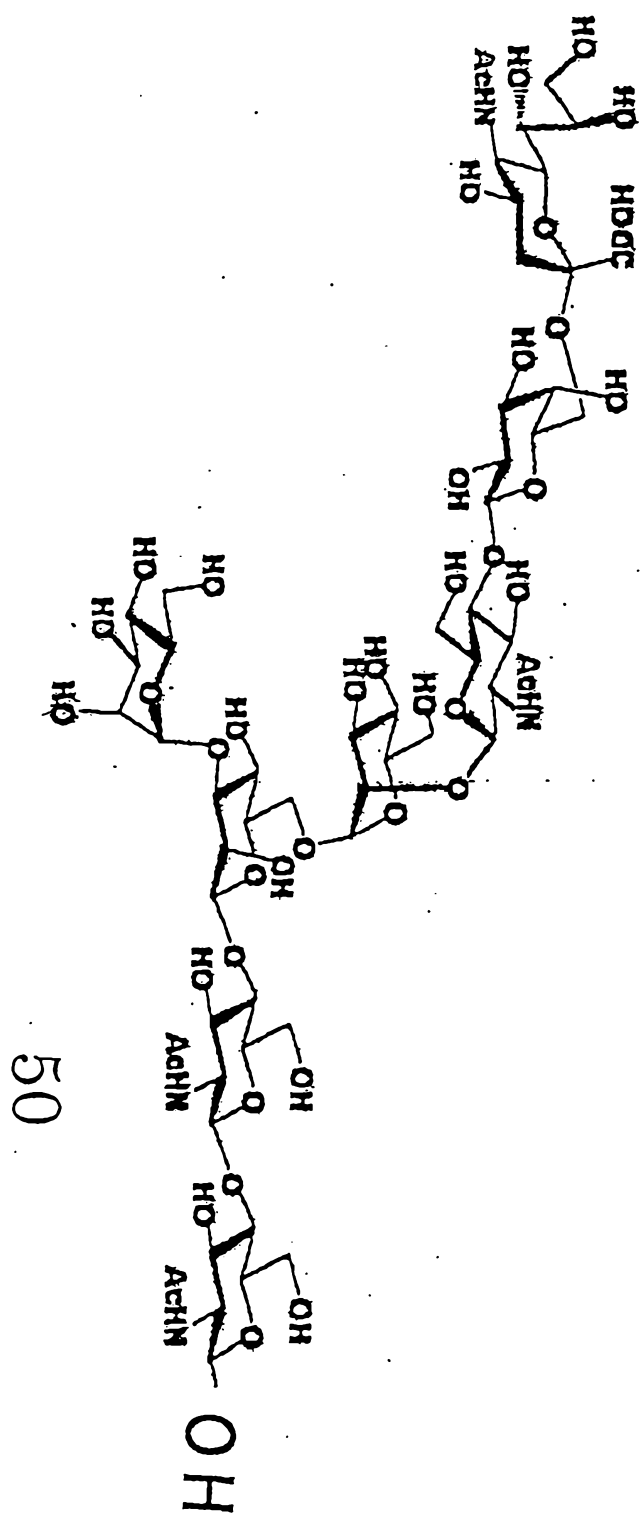


圖 6

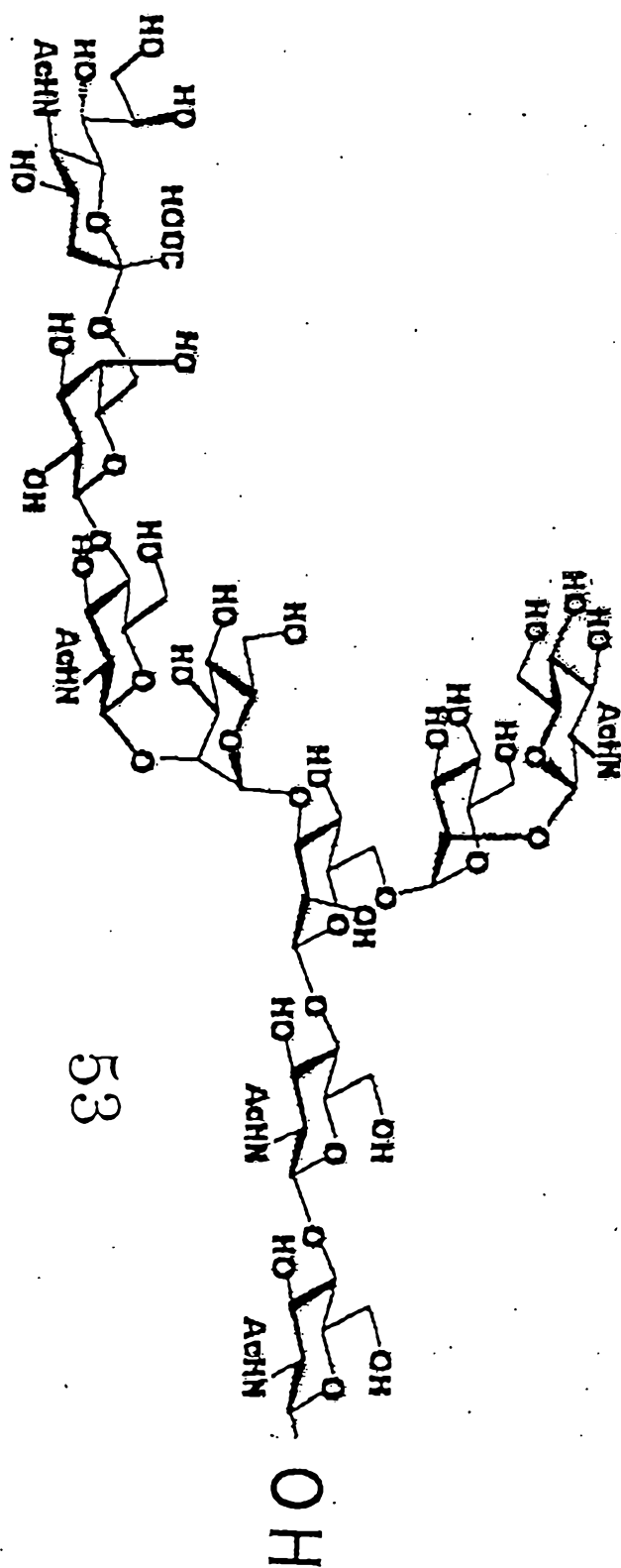


圖 6

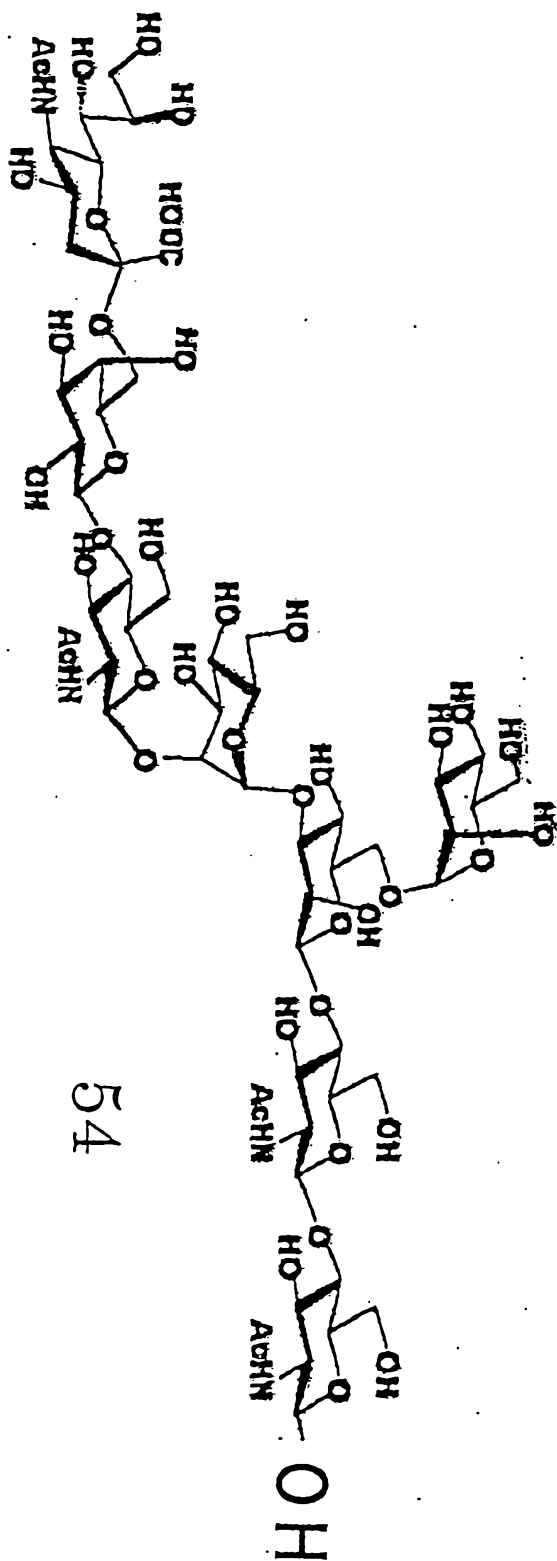


圖 6

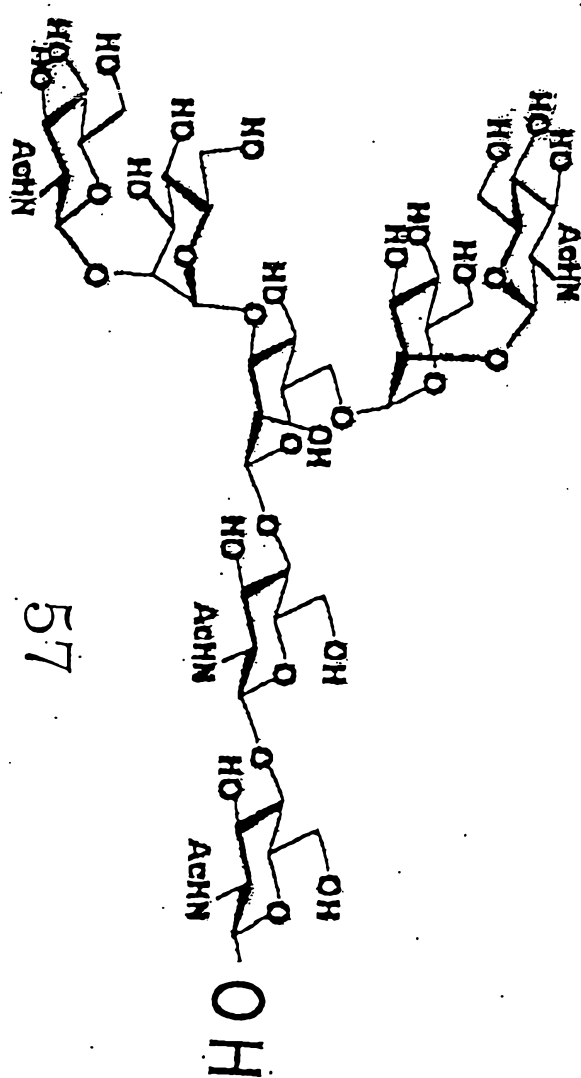
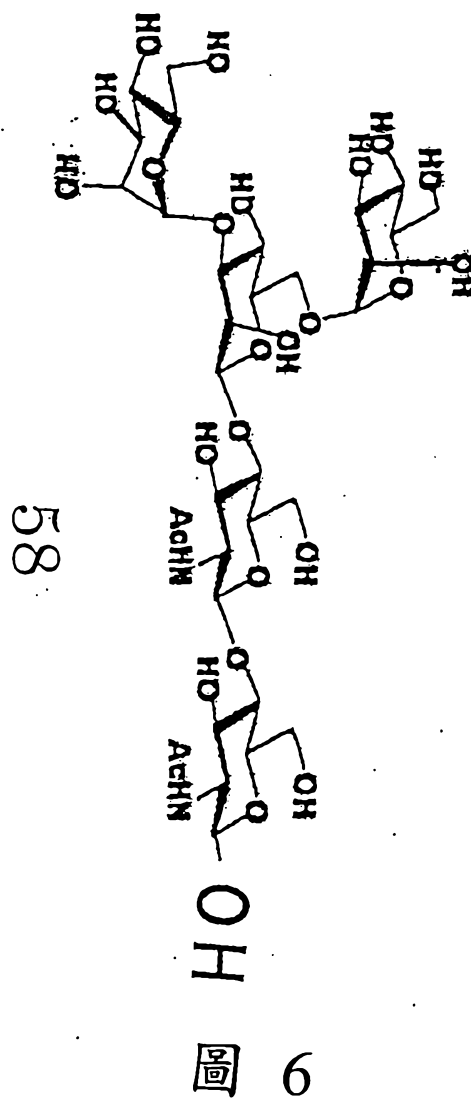


圖 6



59

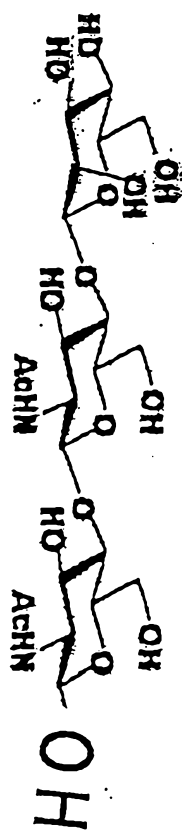


圖 6

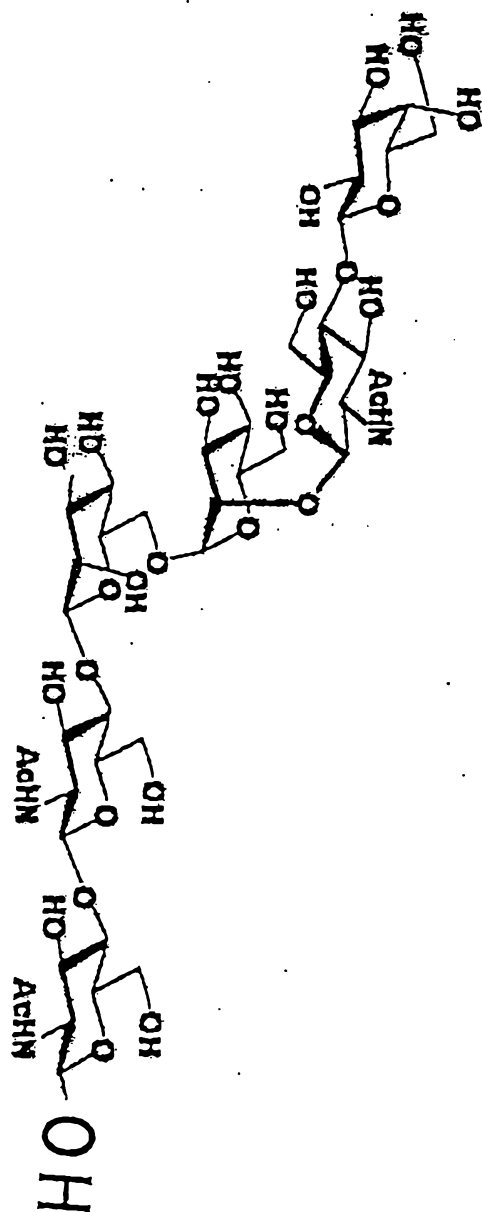
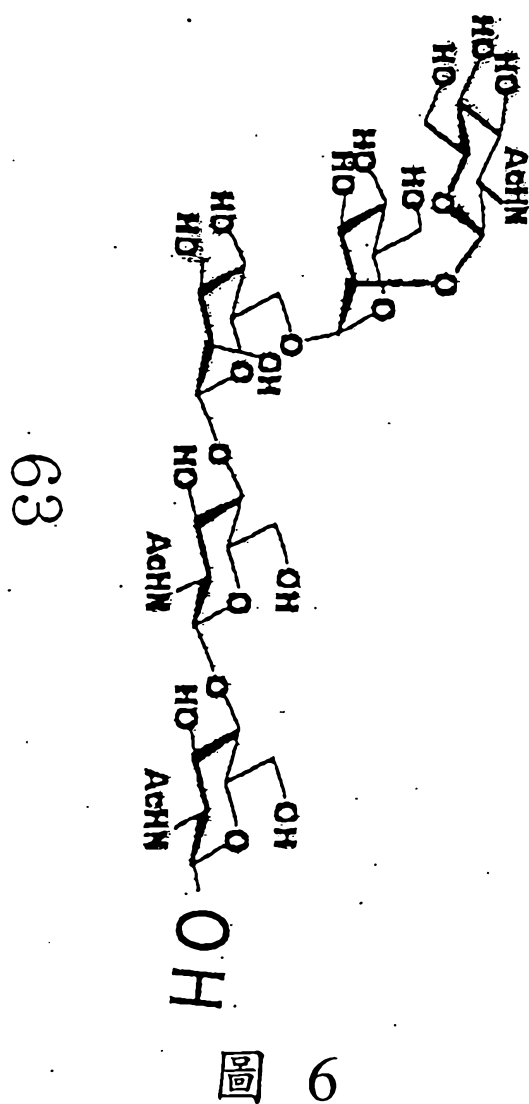


圖 6



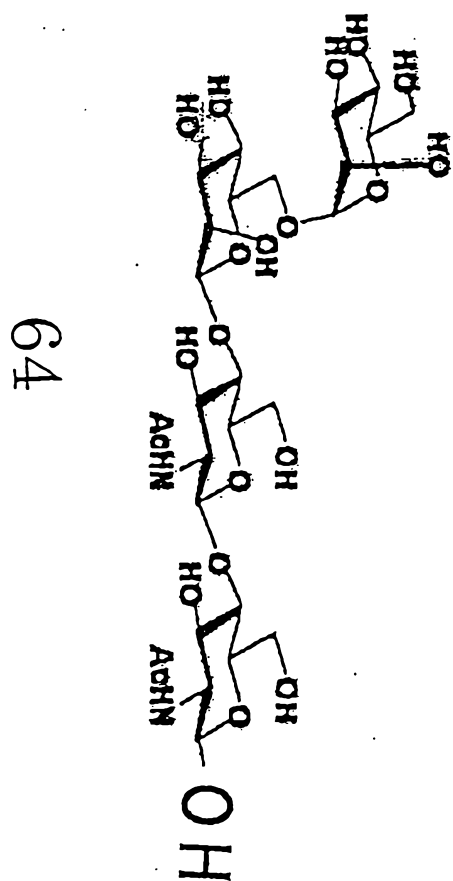
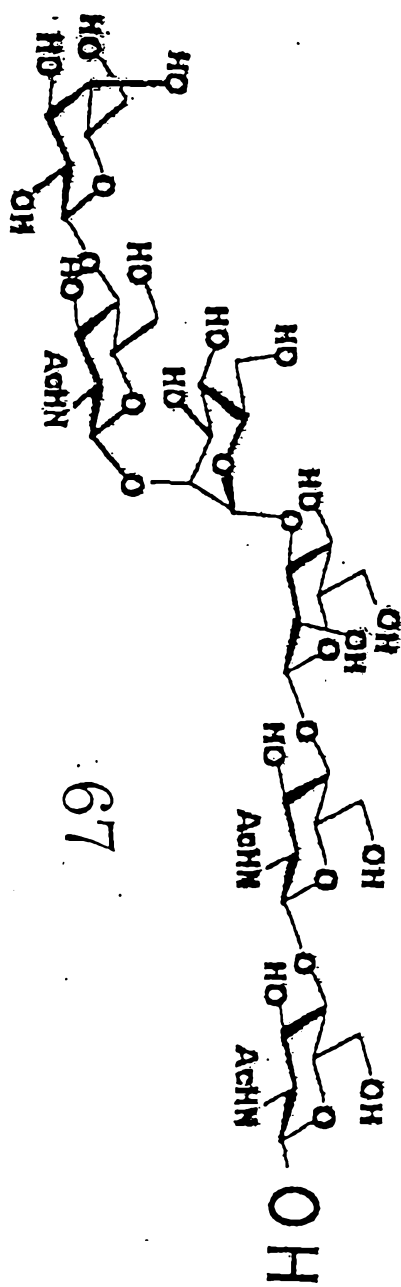


圖 6



67

圖 6

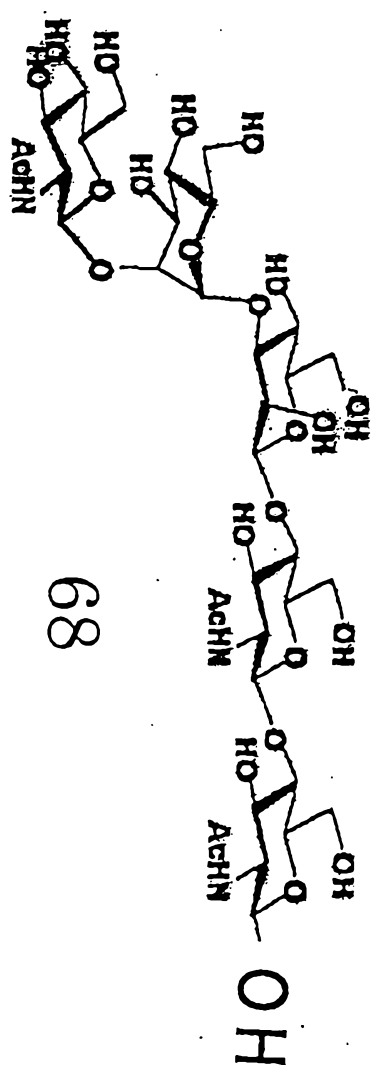


圖 6

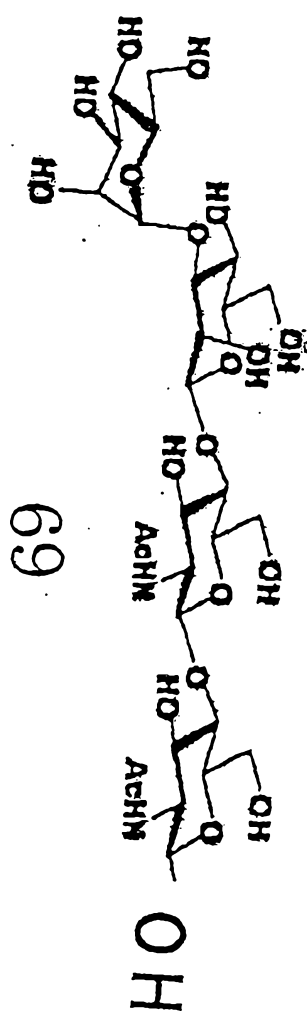


圖 6

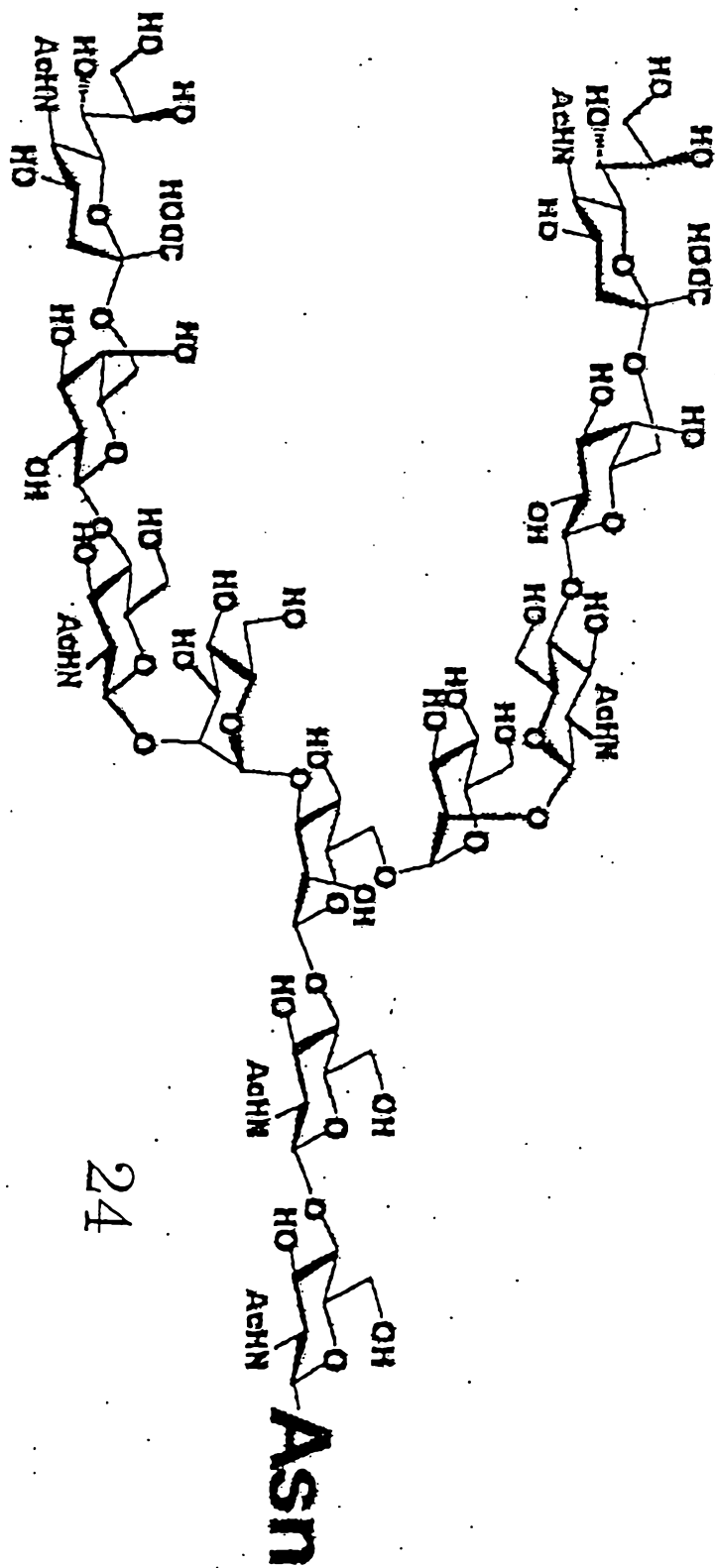
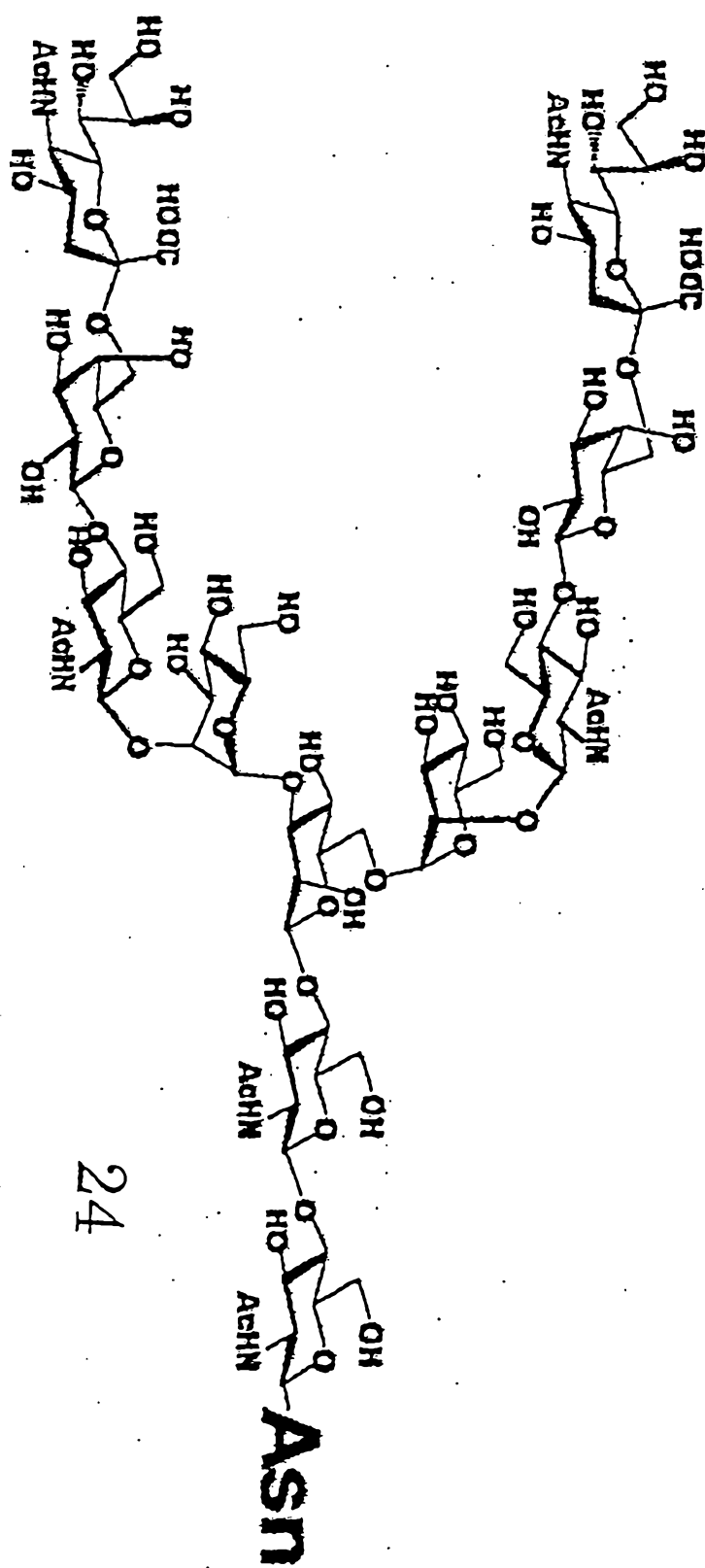


圖 7

酸水解





7



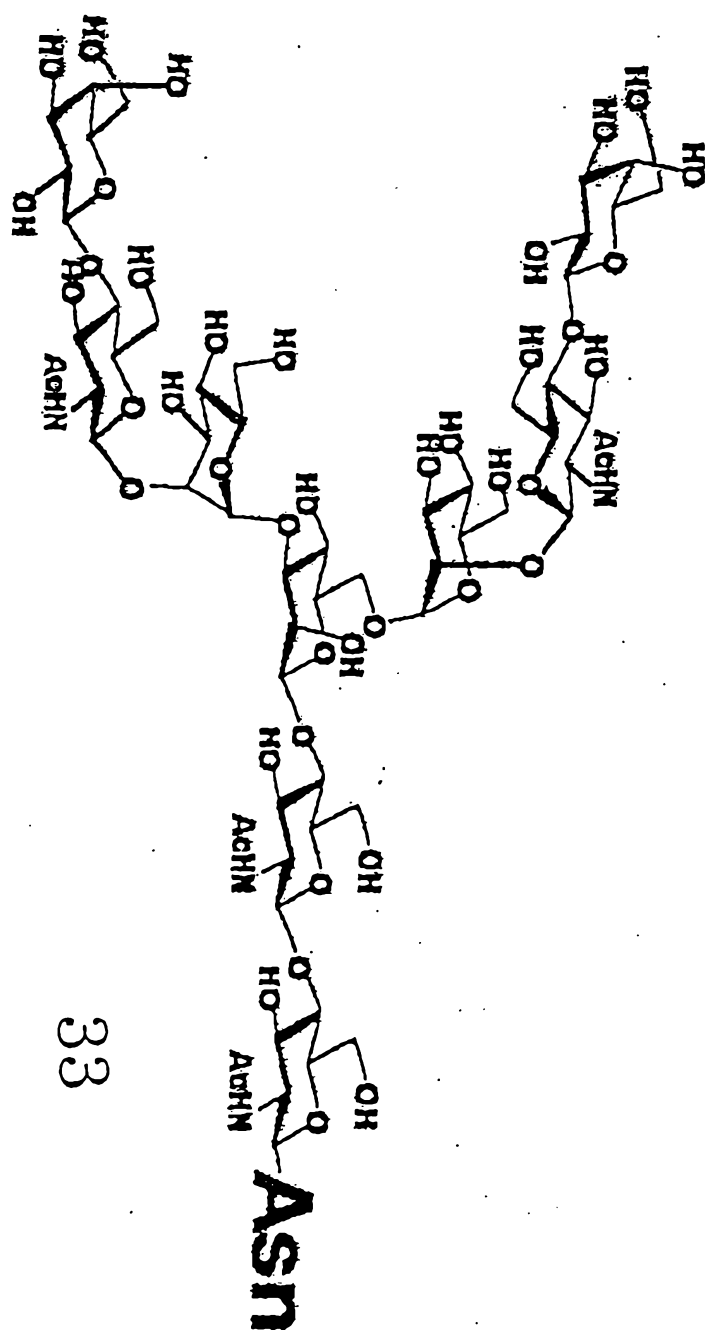


圖 7

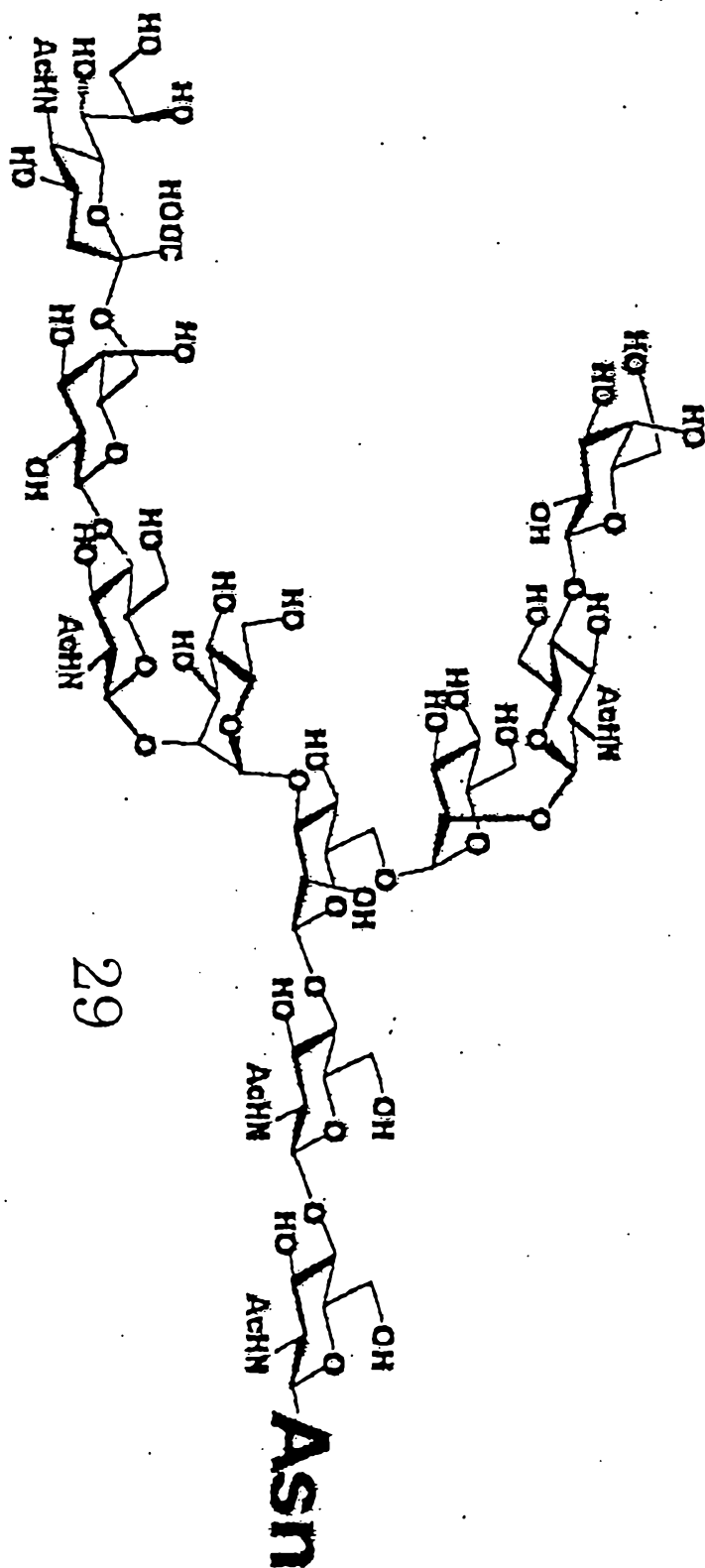
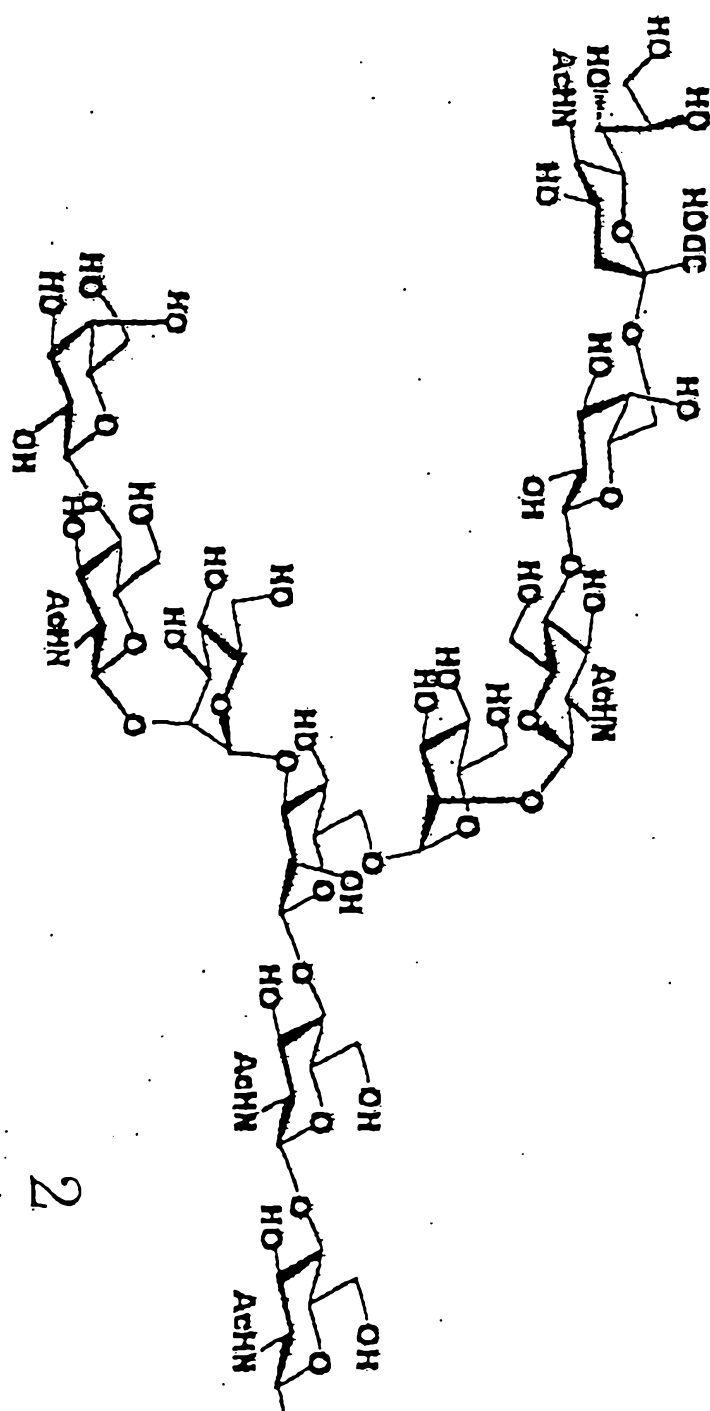


圖 7

Fmoc/L

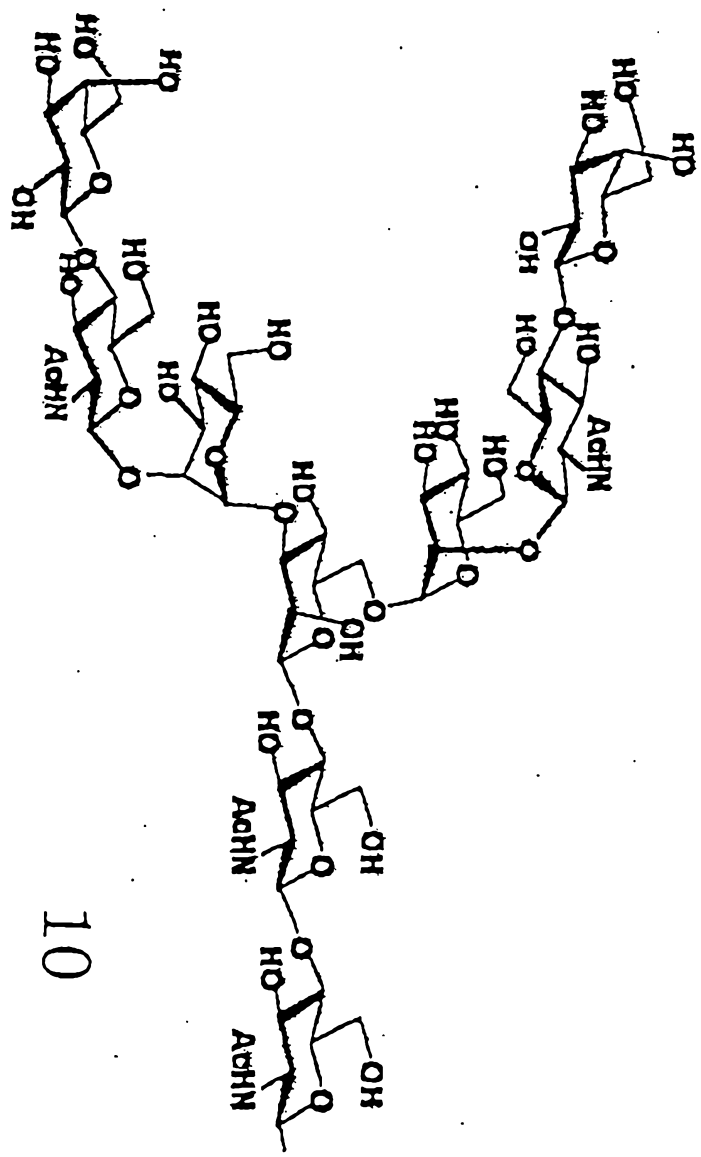




Asn-Fmoc

圖 7

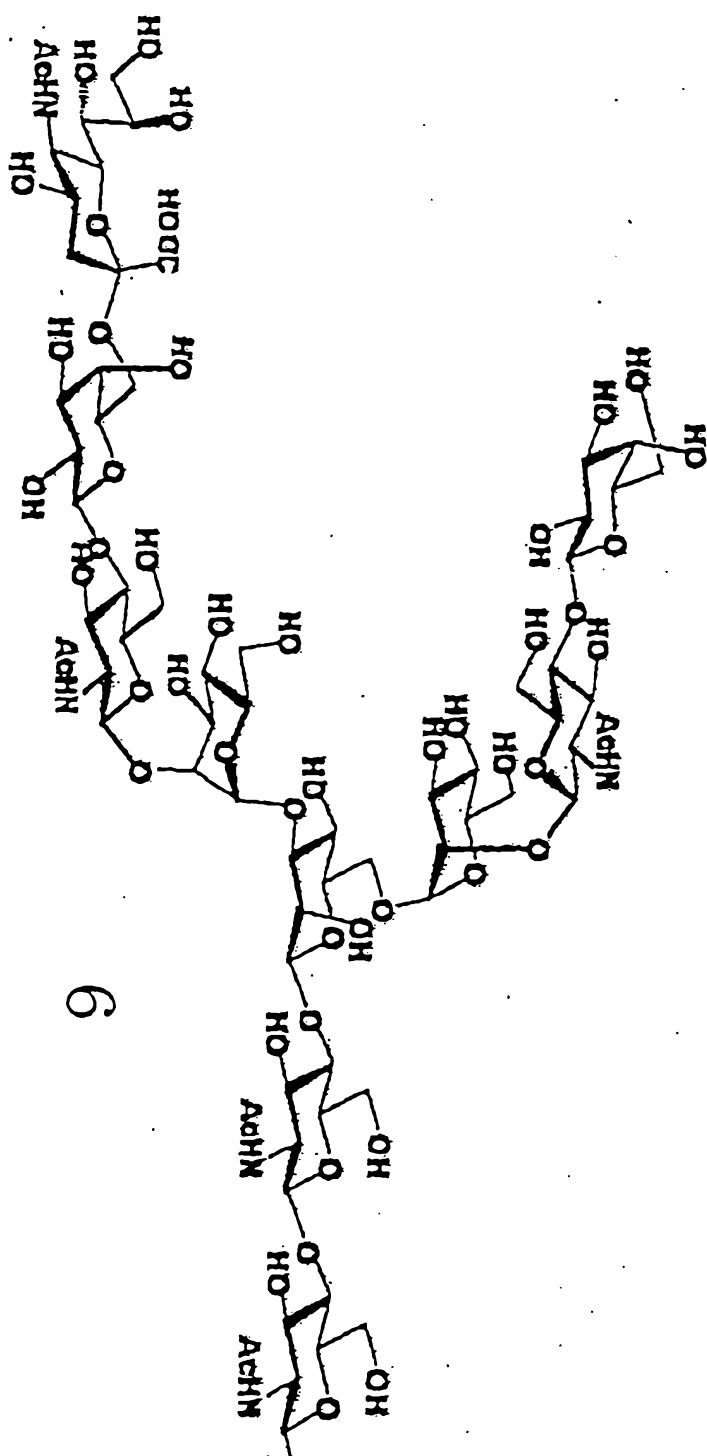
2



10

Asn-Fmoc

圖 7



Asn-Fmoc

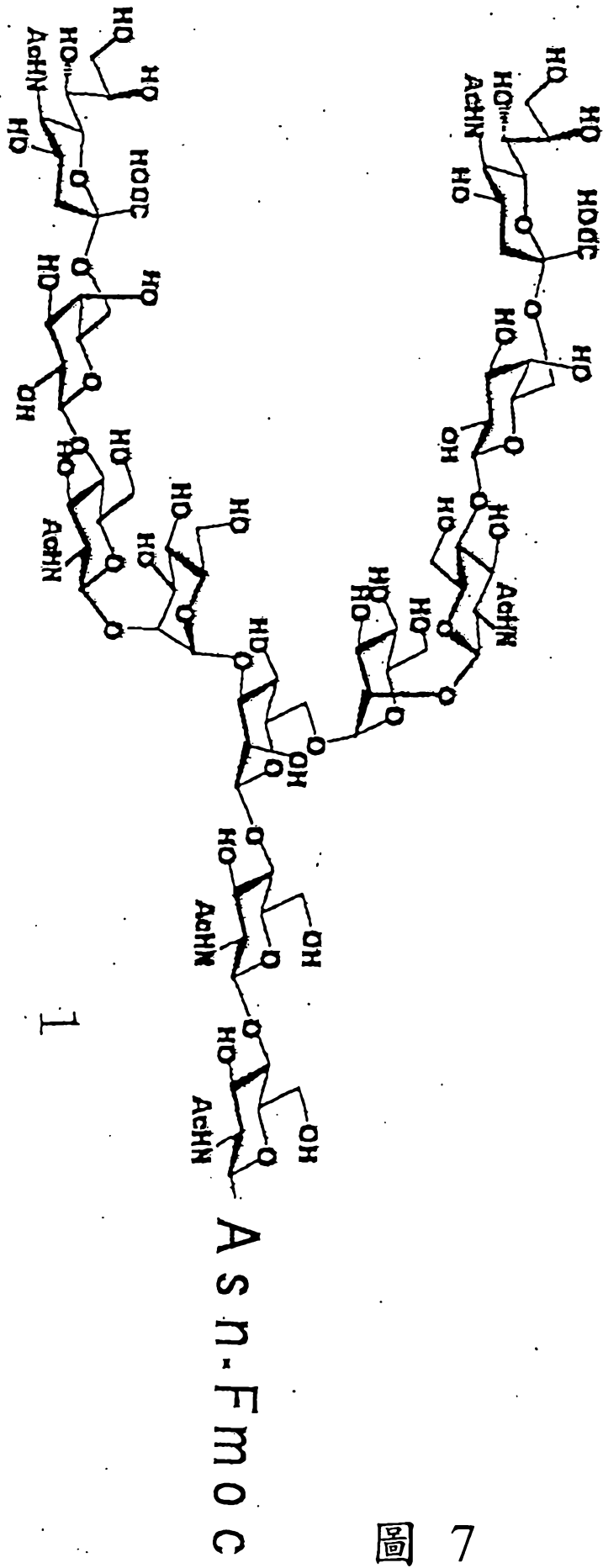
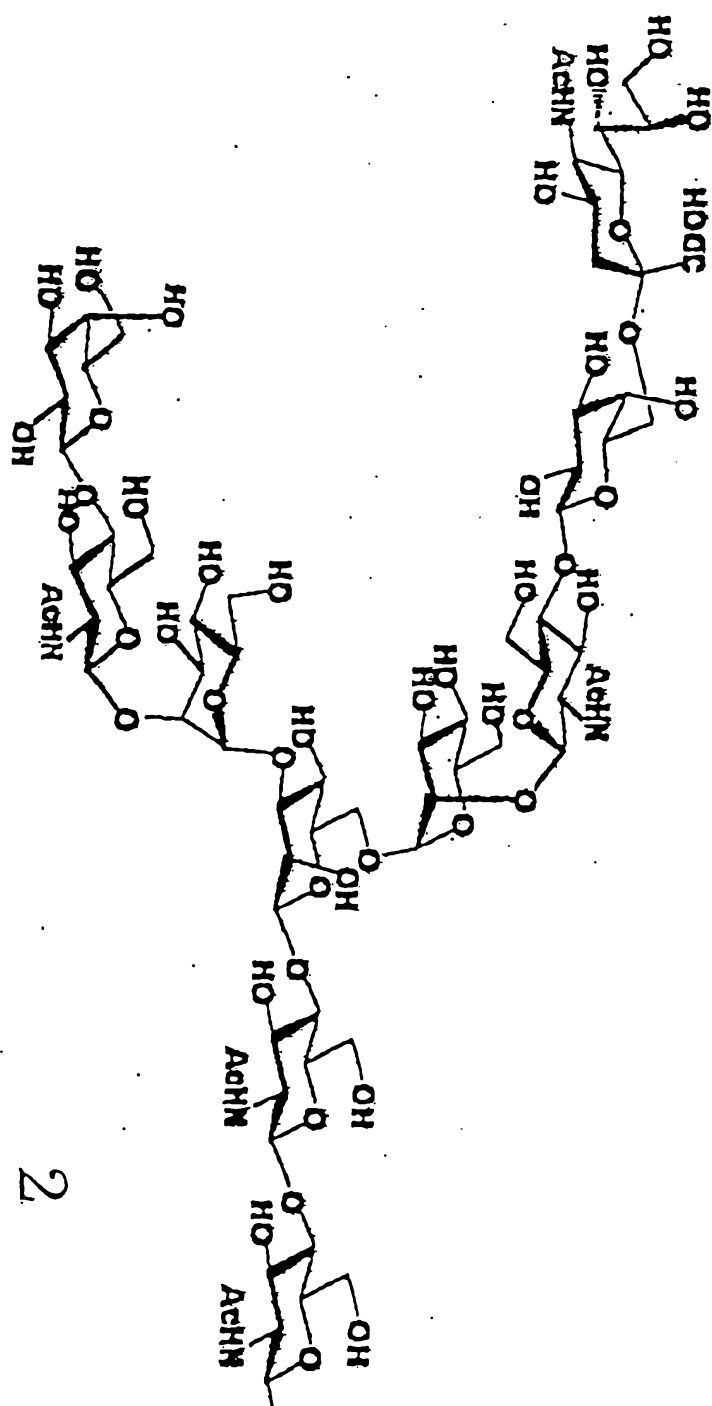


圖 7

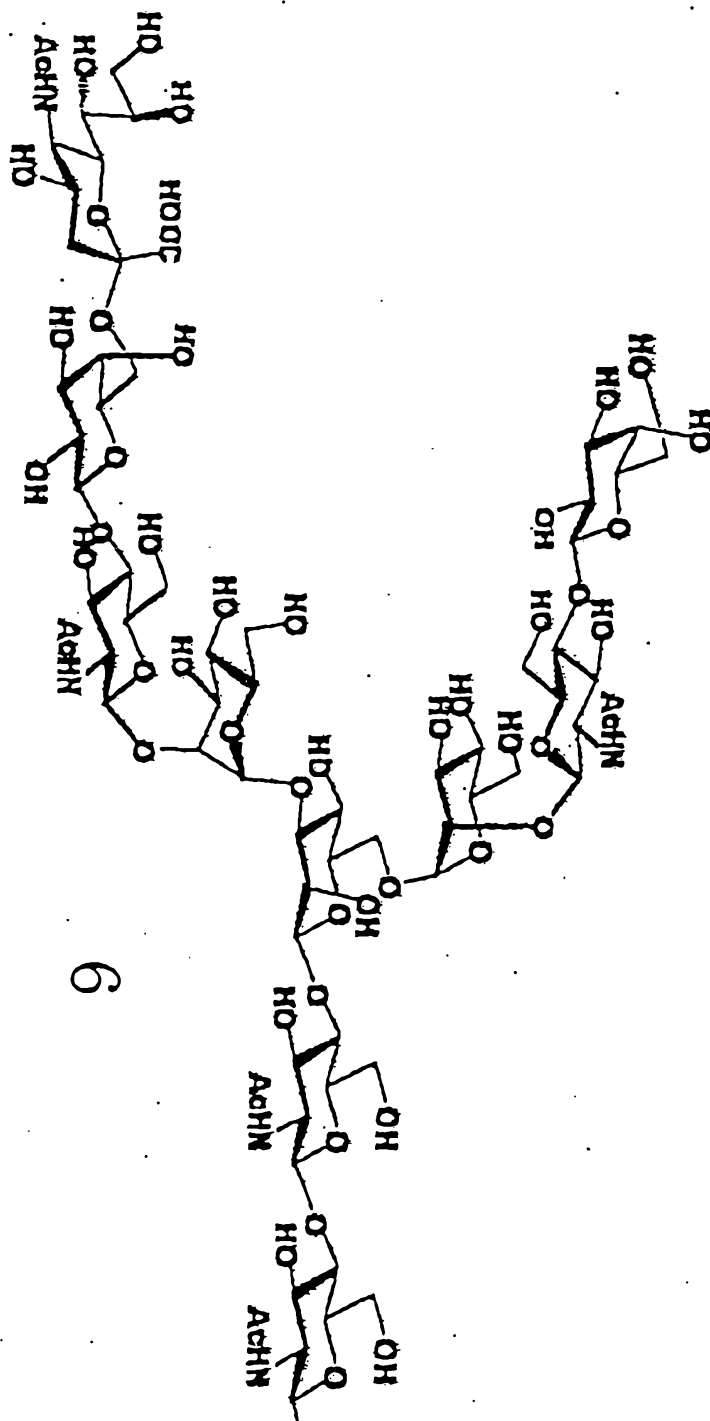
分離純化
→



Asn-Fmoc

圖 7

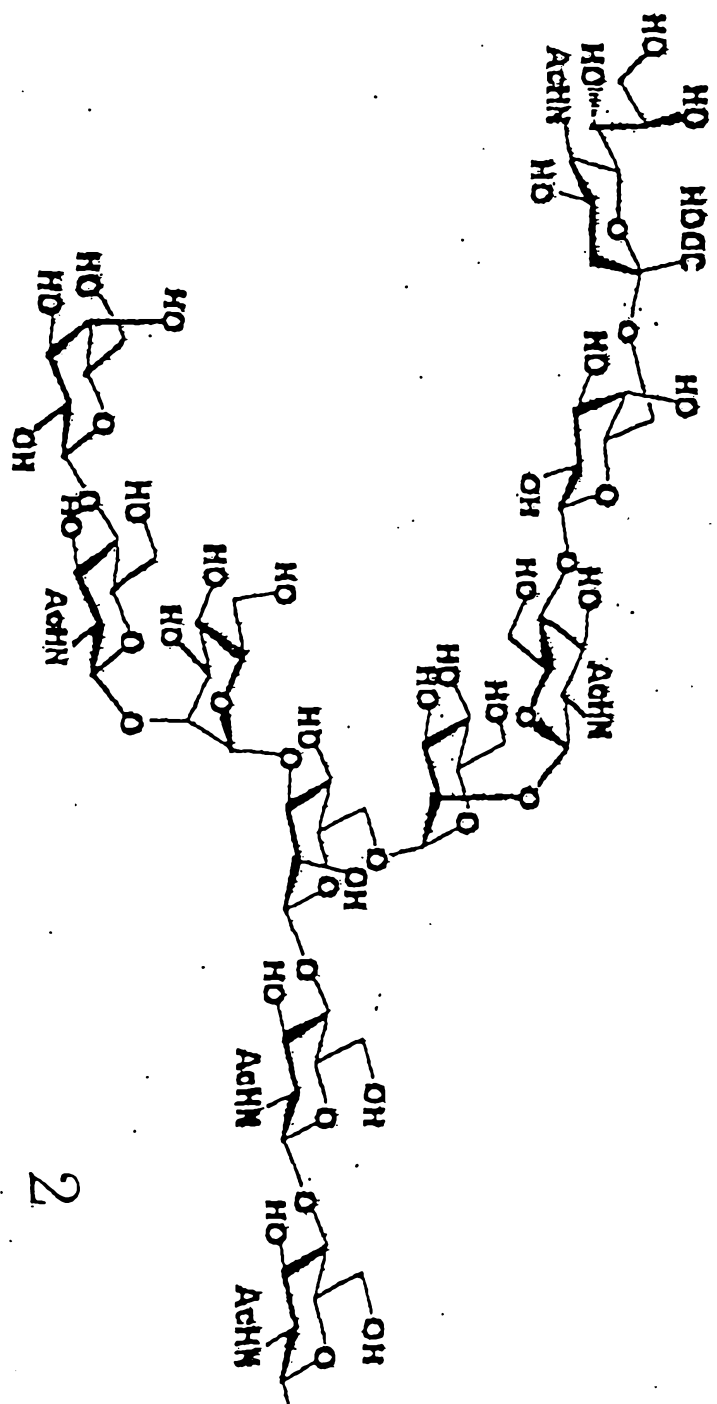
2



6

Asn-Fmoc

圖 7



2

Asn-Fmoc

圖 8

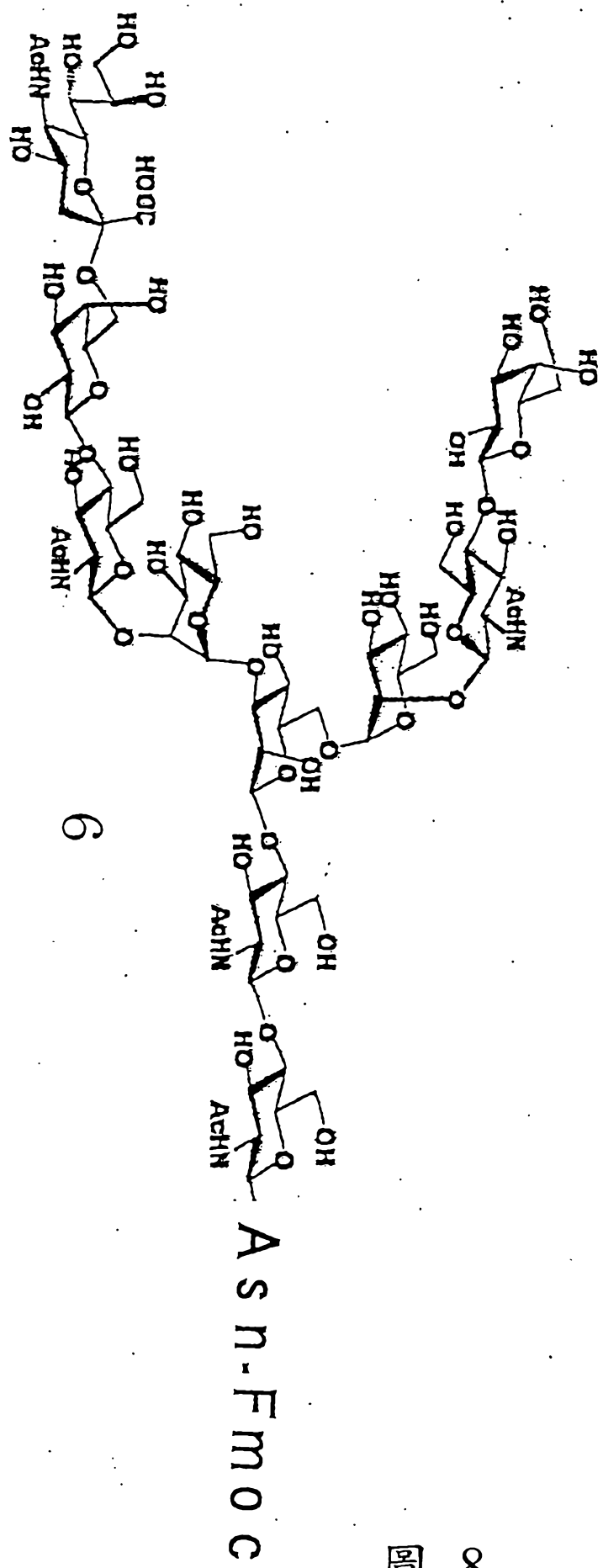
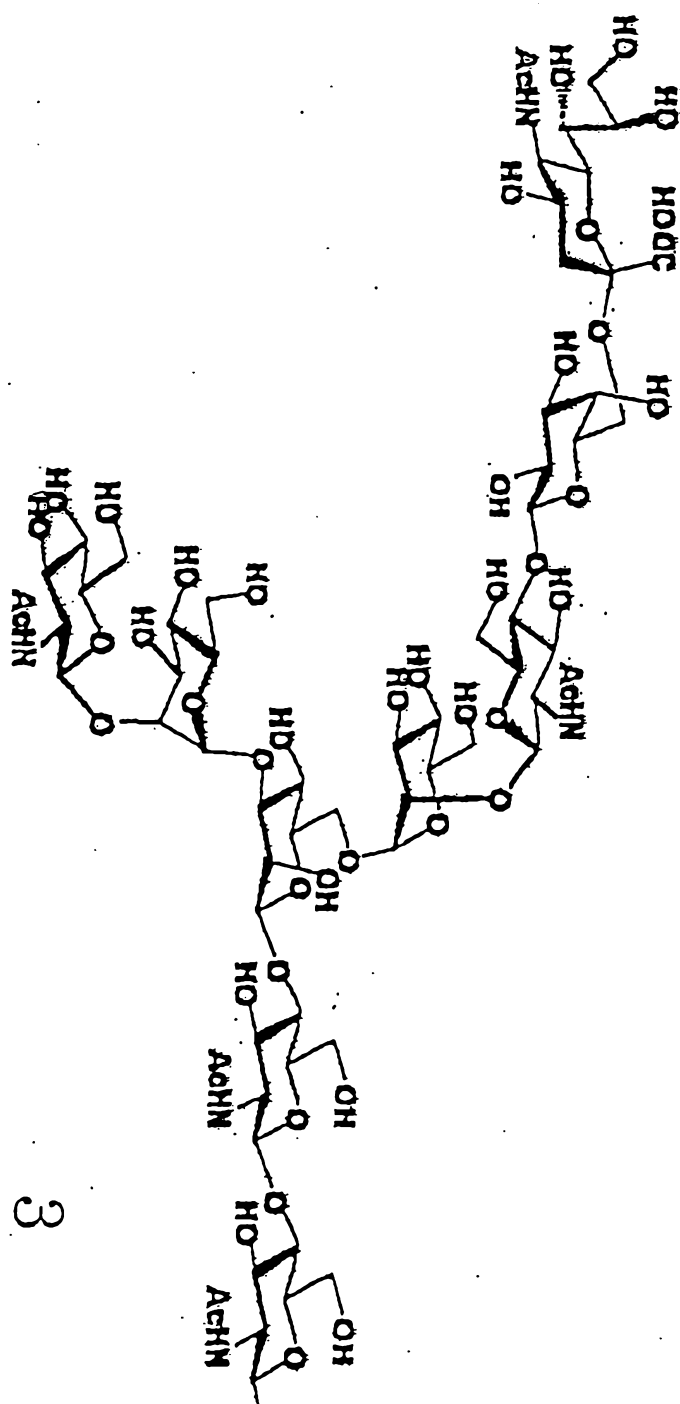


圖 8

半乳糖水解酵素





3

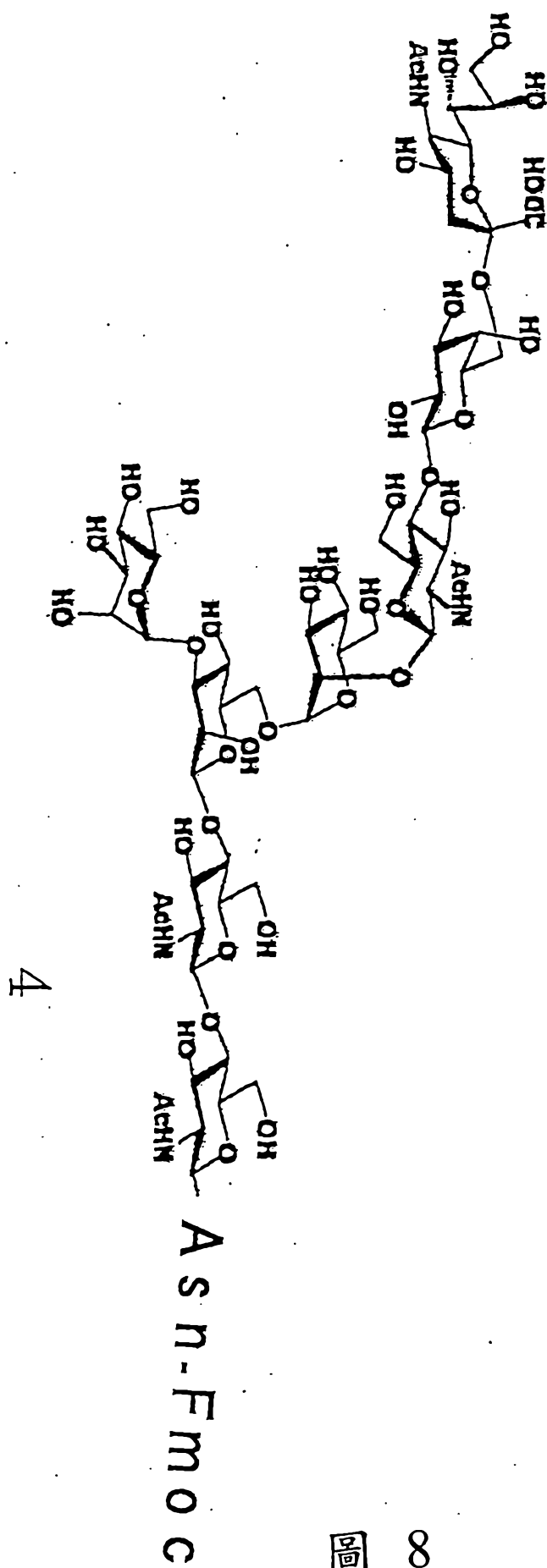
Asn-Fmoc

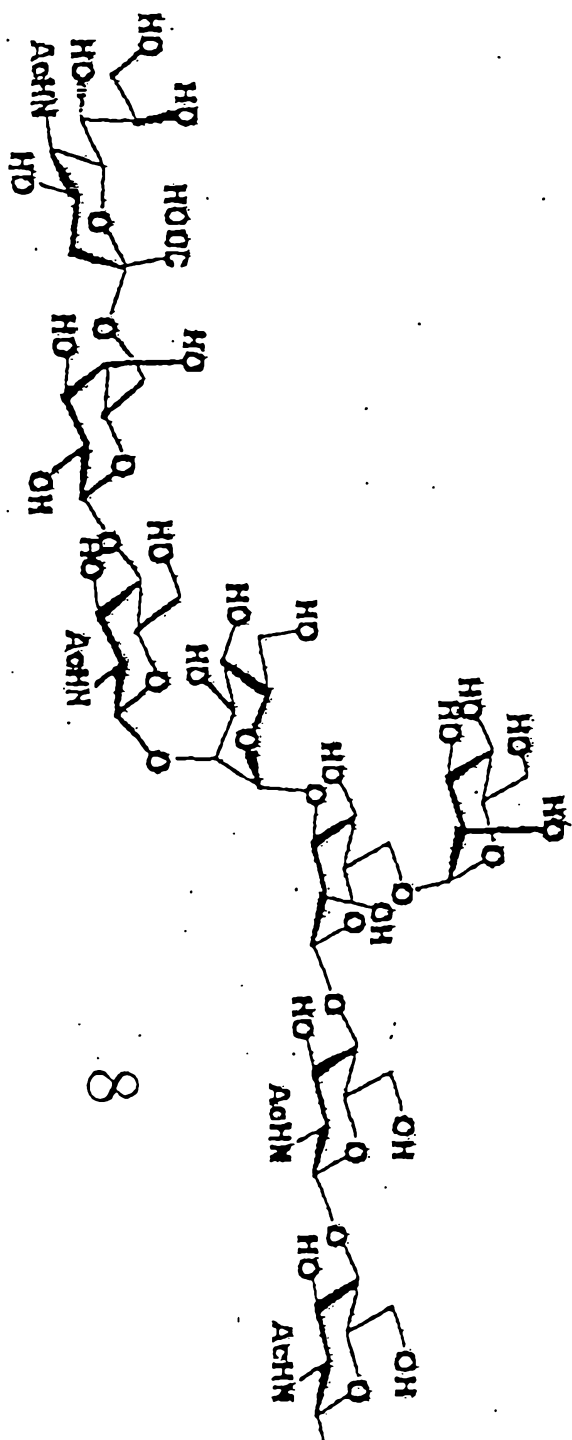
圖

8



N-乙酐葡萄糖胺水解酵素





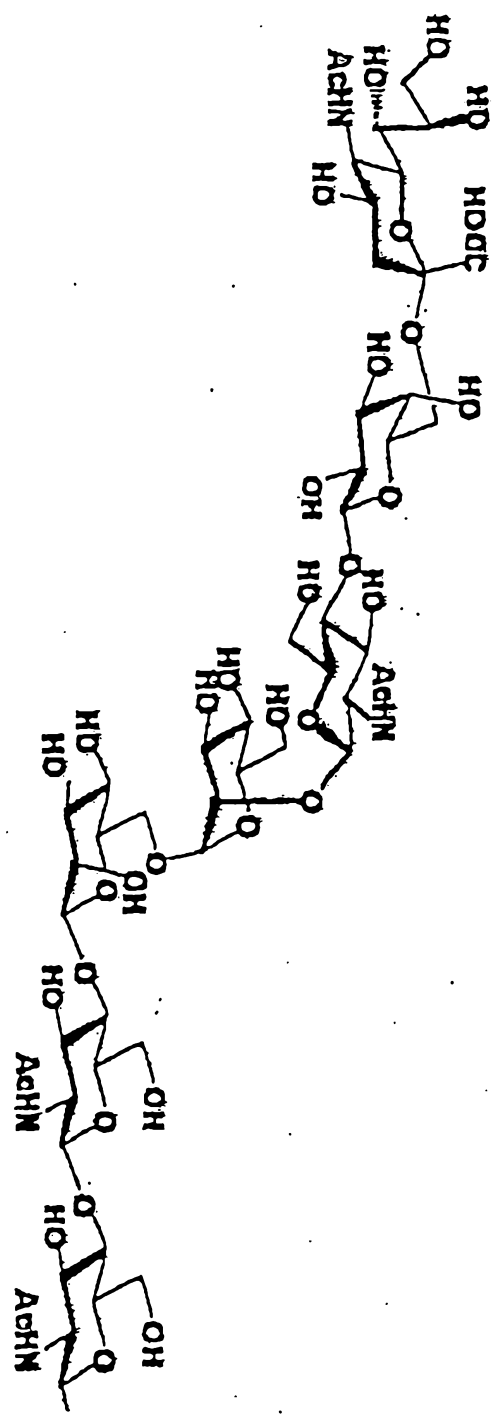
8

Asn-Fmoc

圖 8

甘露糖水解酵素

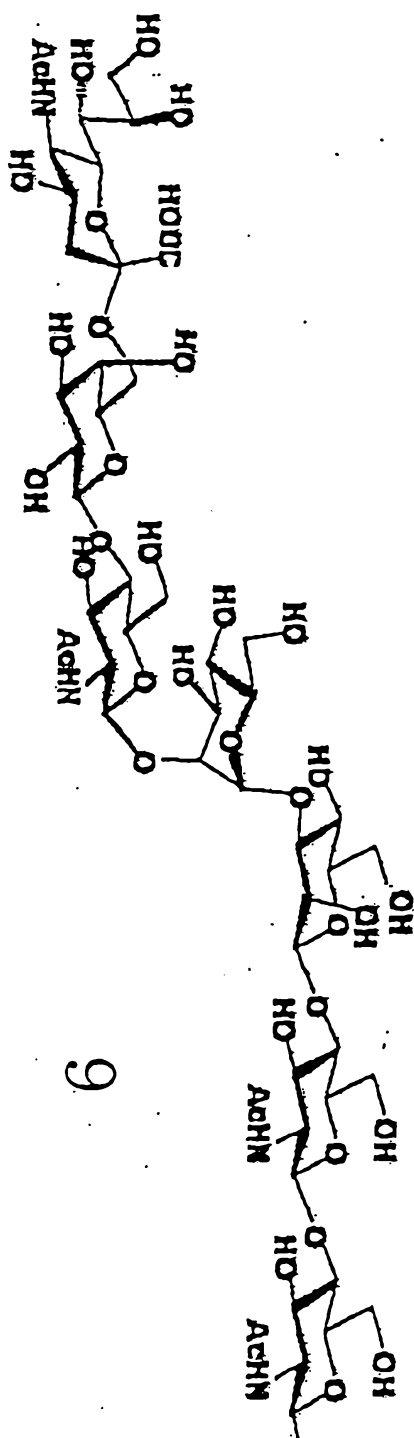




5

Asn-Fmoc

圖 8



9

Asn-Fmoc

圖

8

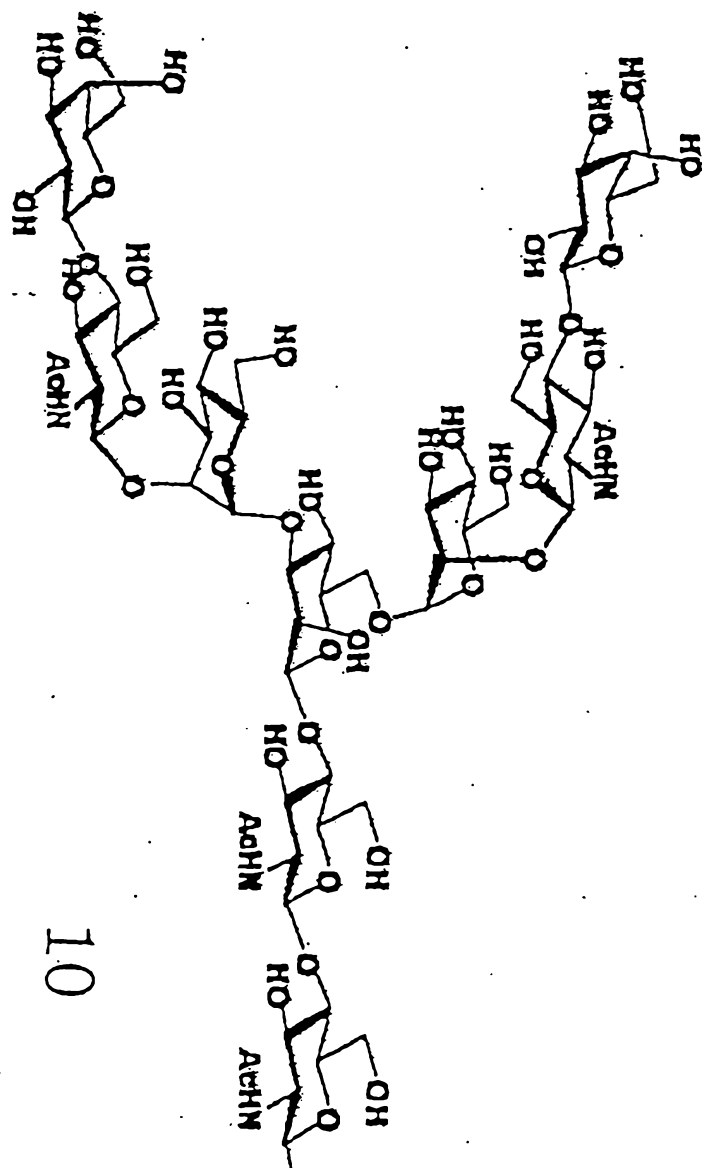


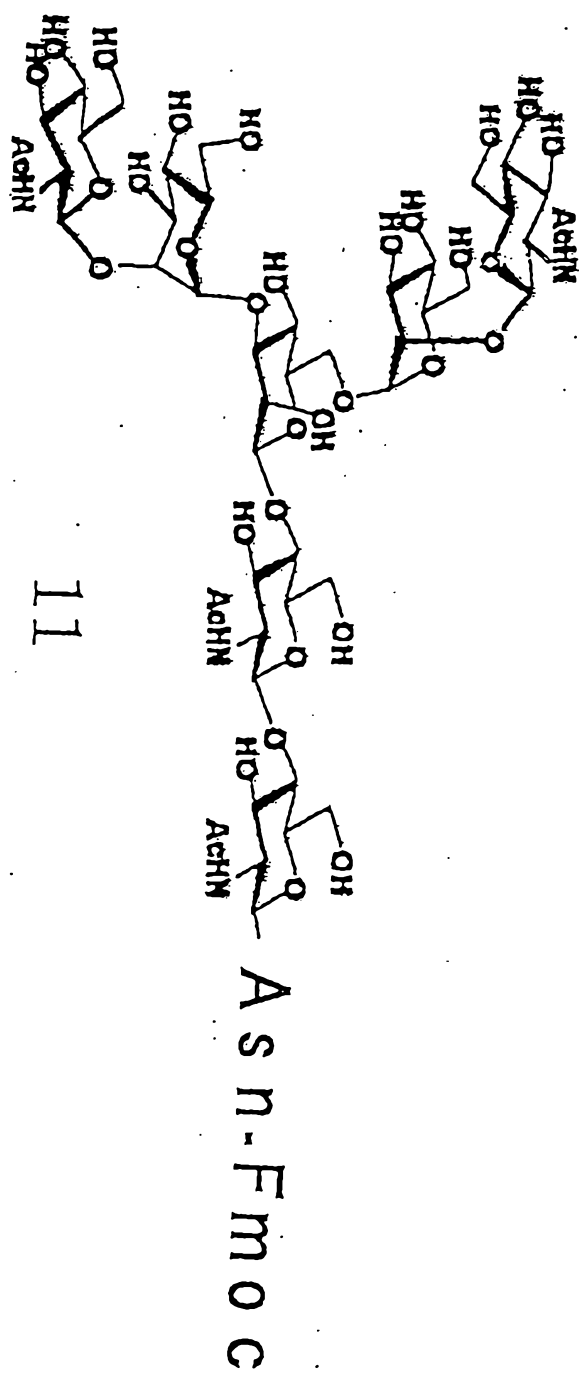
圖 9

Asn-Fmoc

10

半乳糖水解酵素





N-乙酰葡萄糖胺水解酶



圖 9

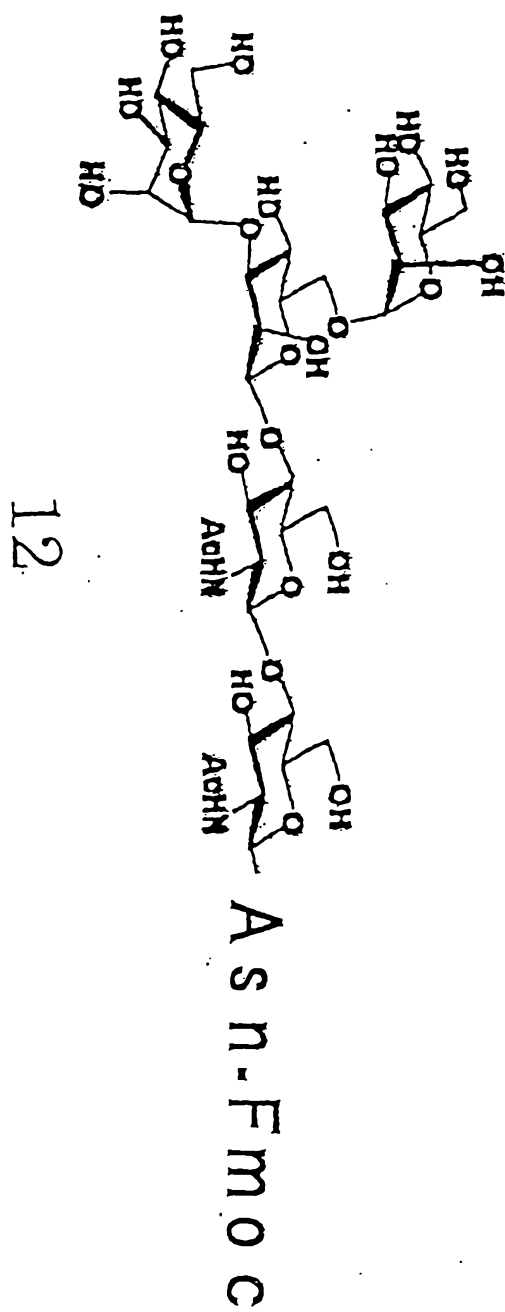


圖 9

甘露糖水解酵素

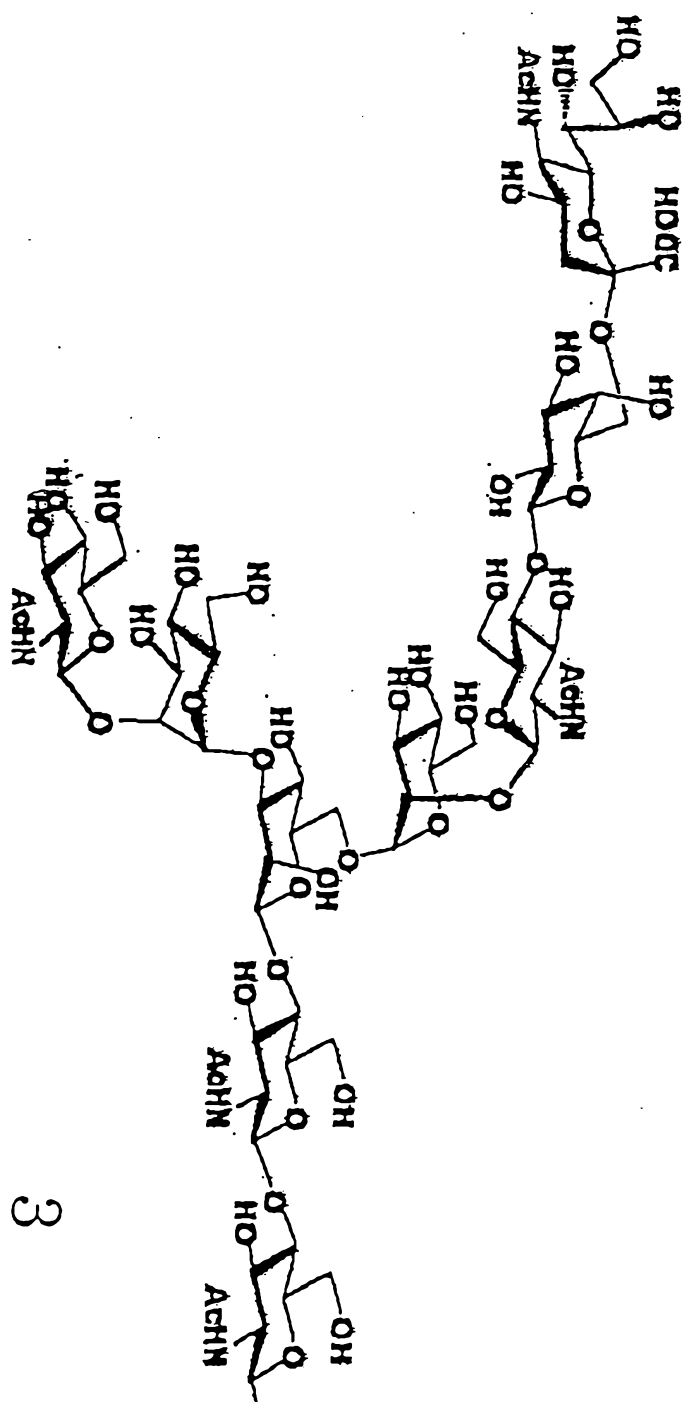




13

Asn-Fmoc

圖 9



Asn-Fmoc

圖 10

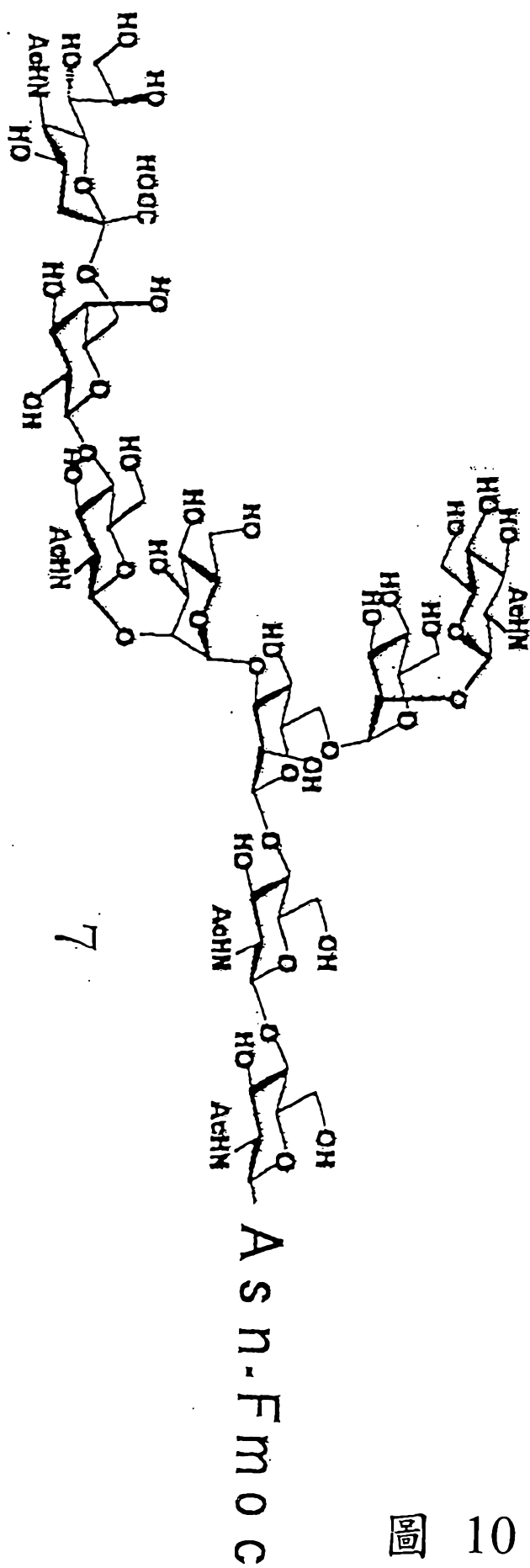
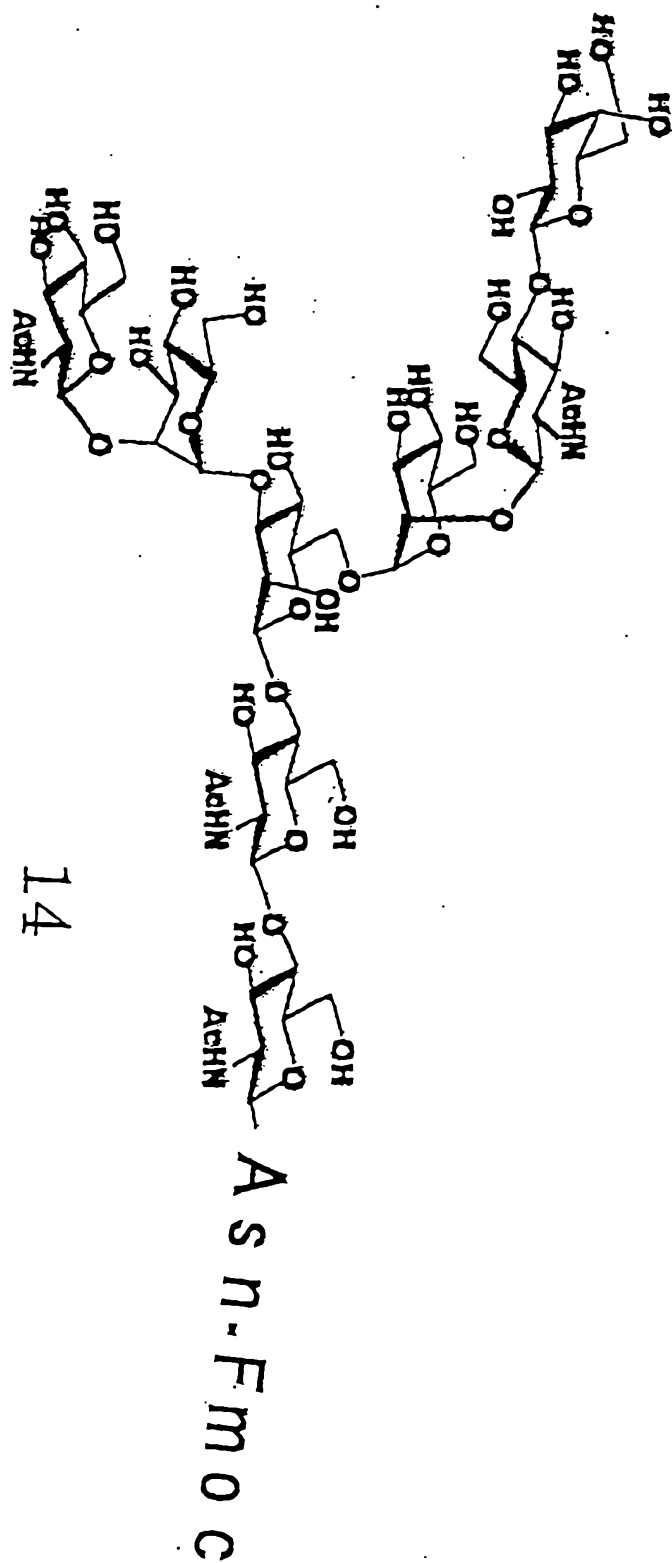


圖 10

唾液酸水解酵素



14

圖 10

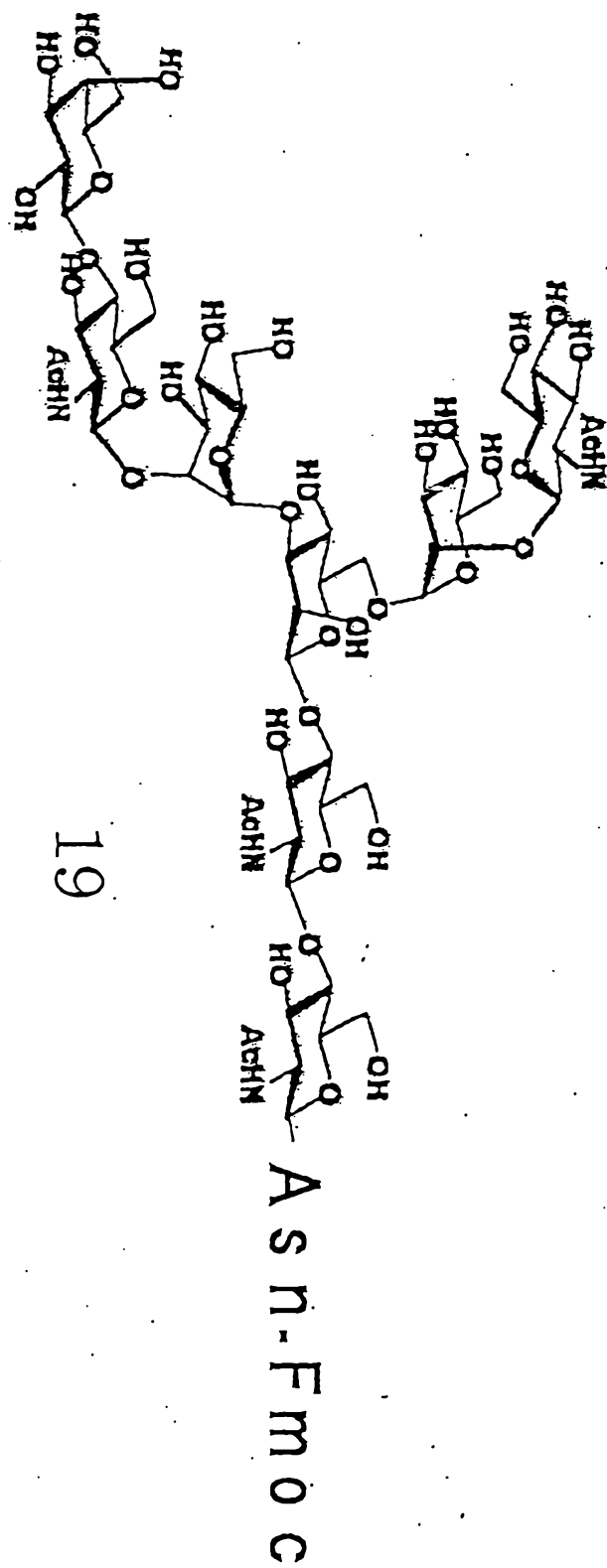


圖 10

N-乙醯葡萄糖胺水解酵素



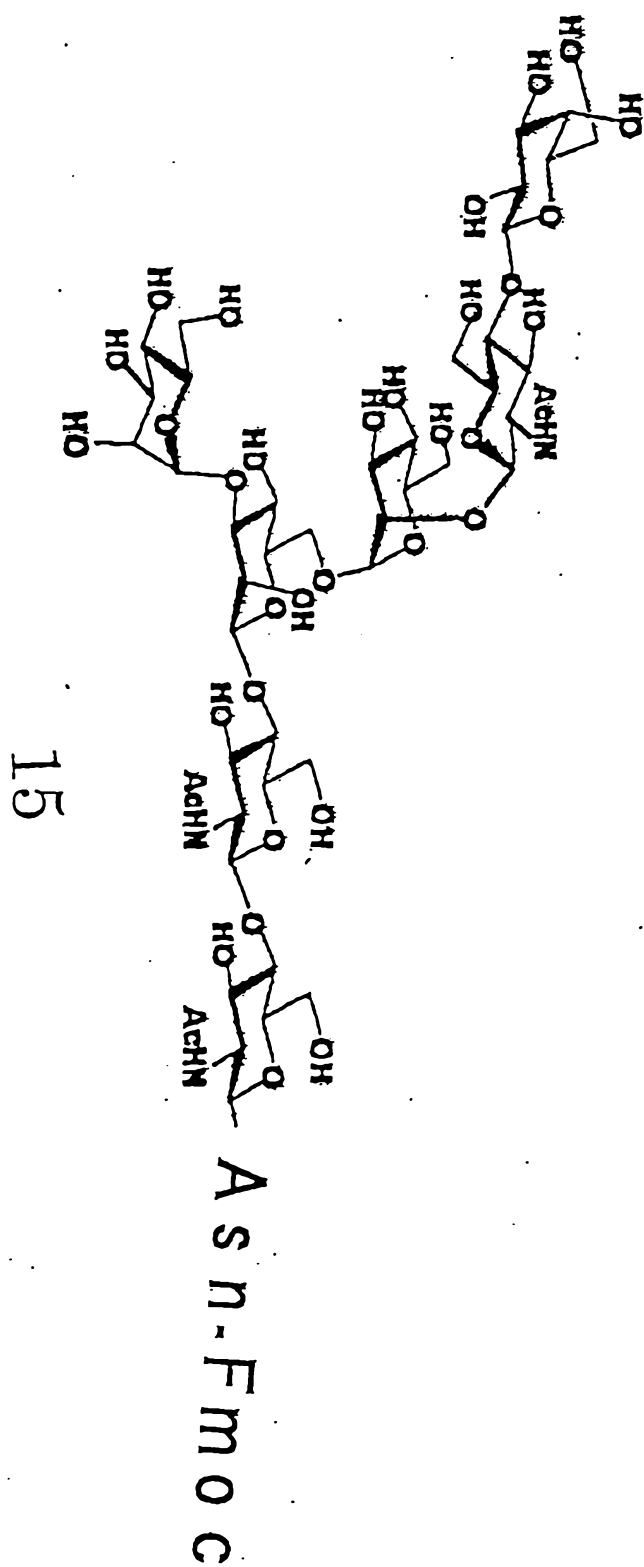
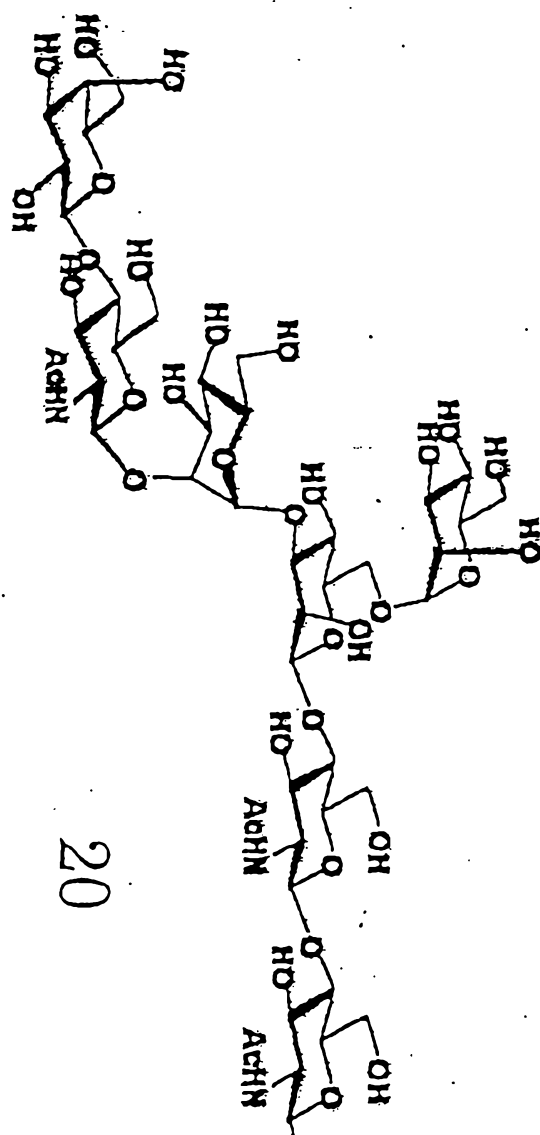


圖 10

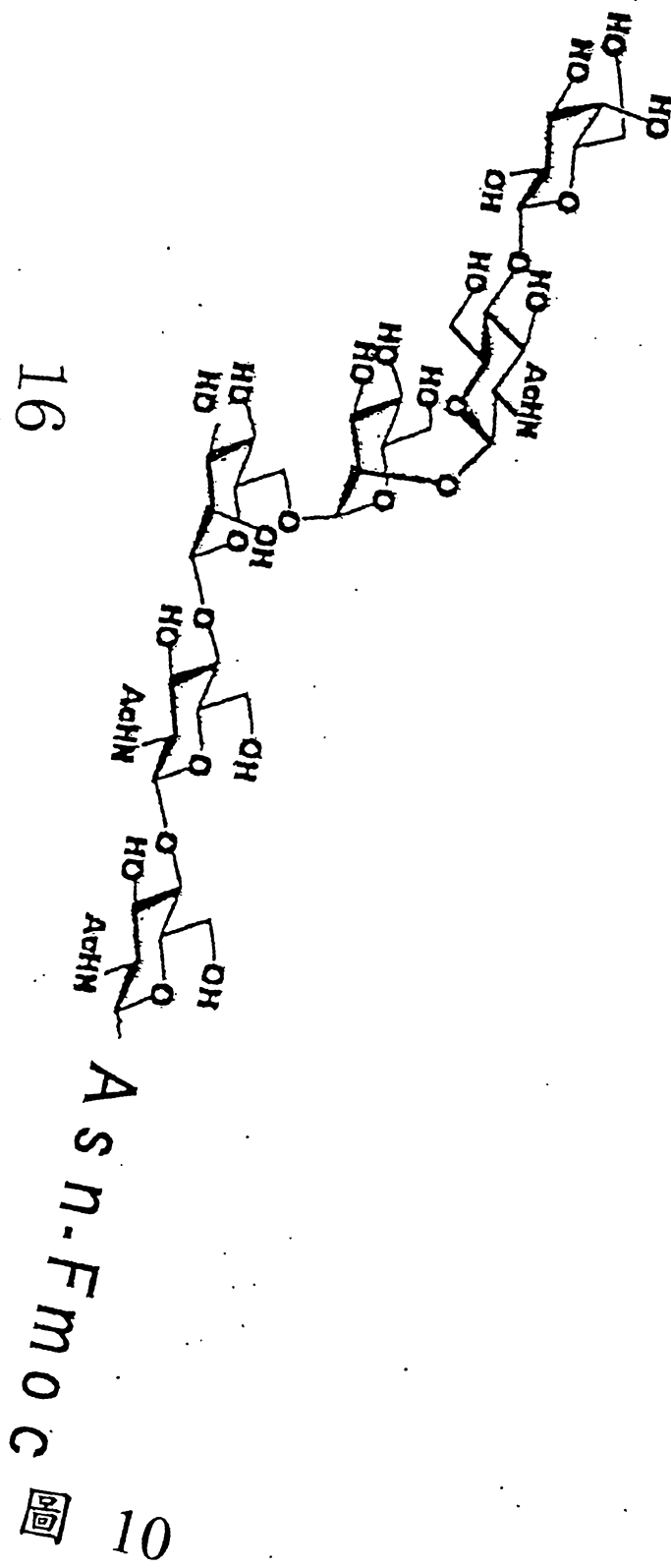


20

Asn-Fmoc 圖 10

甘露糖水解酵素





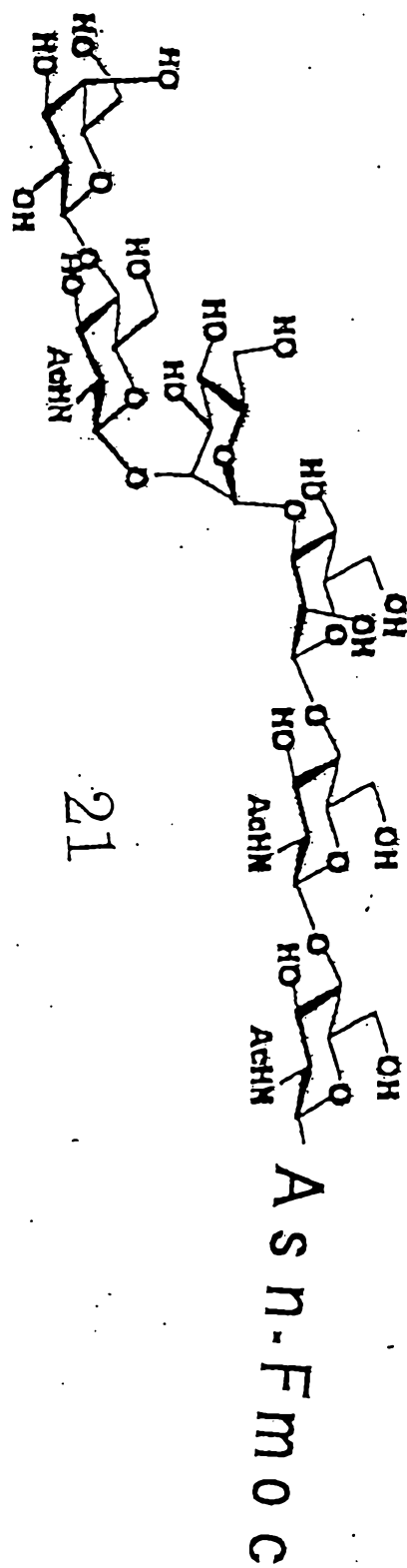
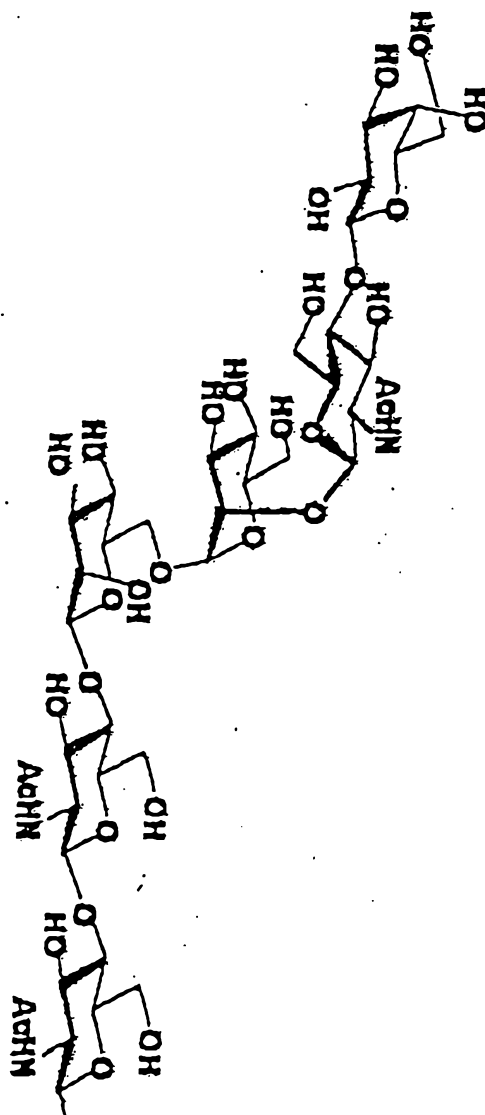


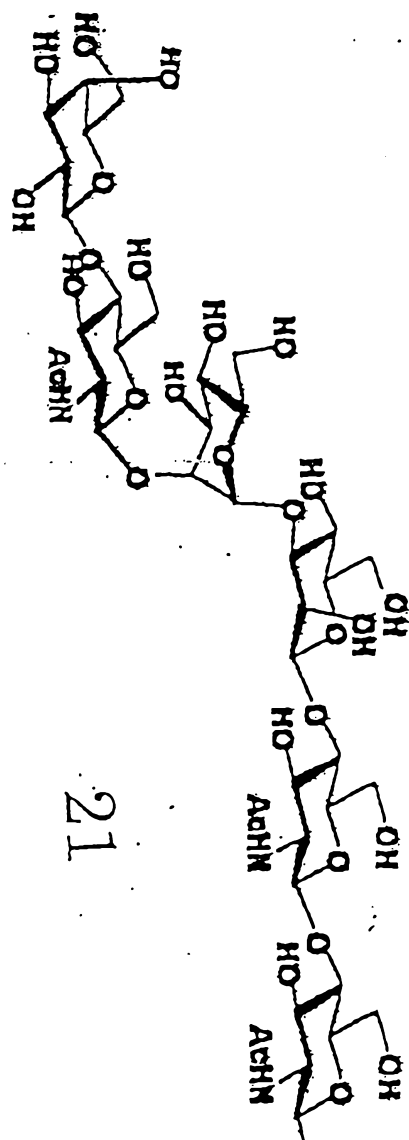
圖 10

16



Asn-Fmoc

圖 11



21

Asn-Fmoc

圖 11

半乳糖水解酵素



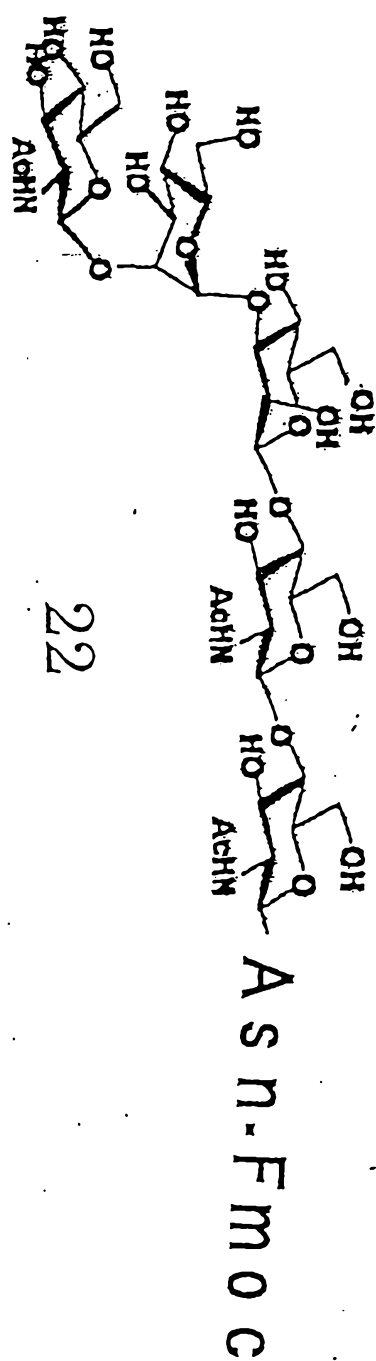
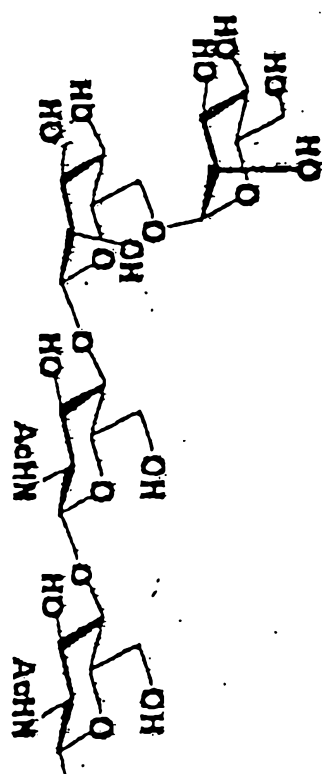


圖 11

N-乙酰葡萄糖胺水解酵素



18

Asn-Fmoc

圖 11

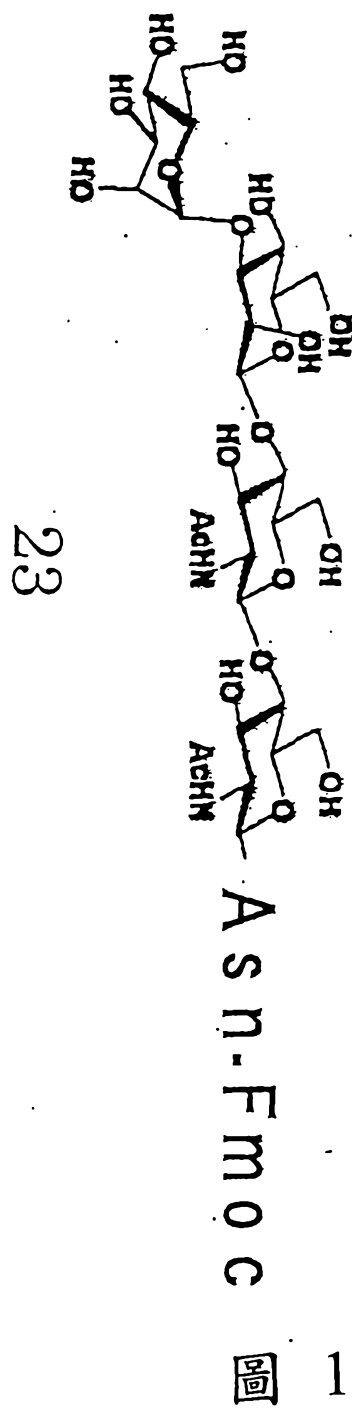
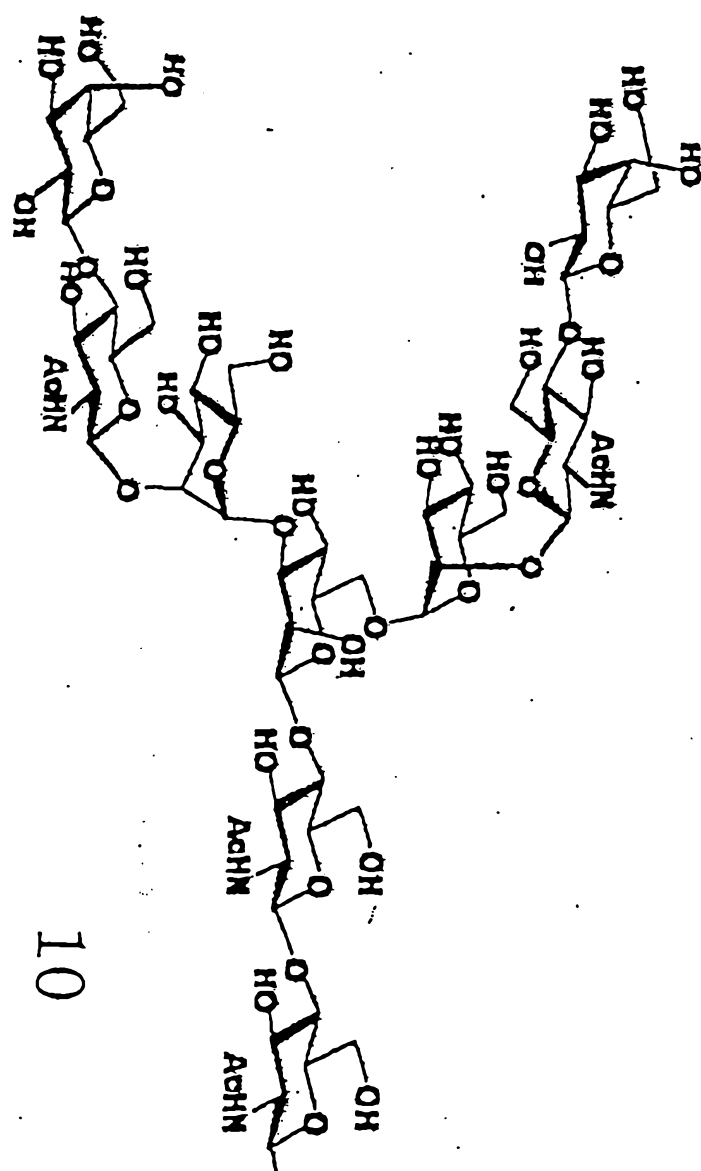


圖 11

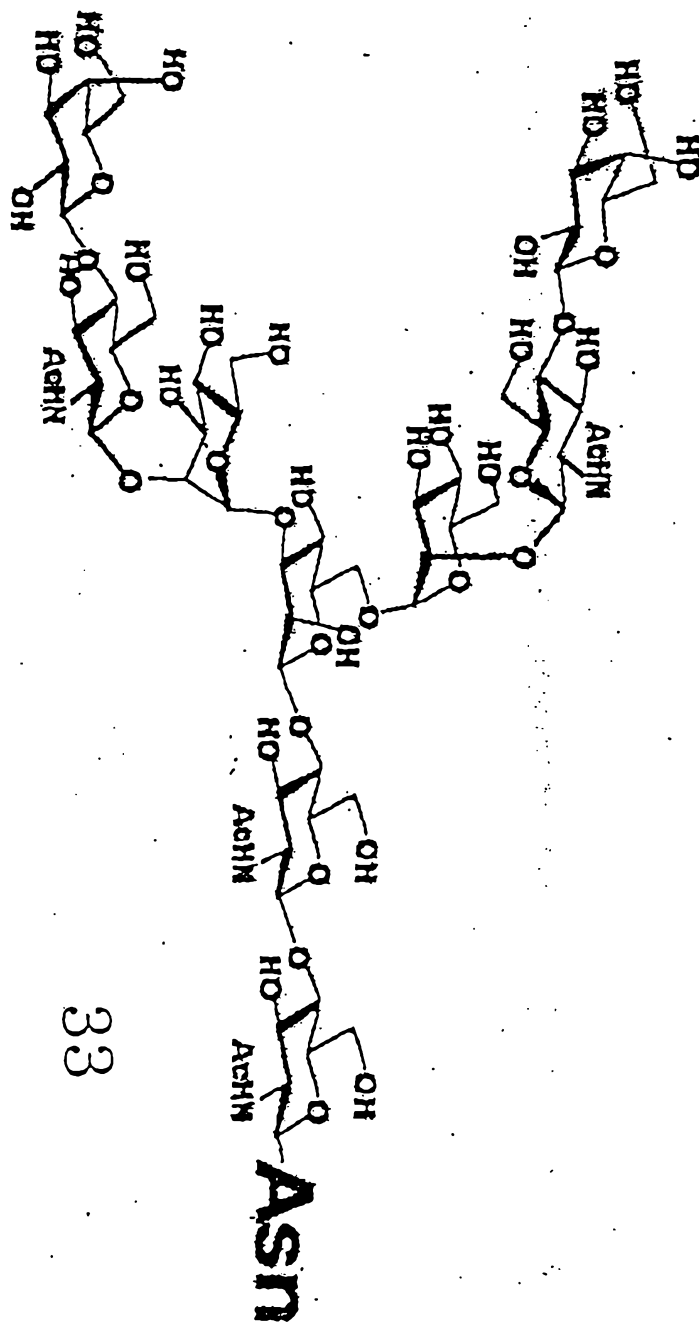


Asn-Fmoc

圖 12

嗎啉DMF





1) 聯胺
2) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$



圖 12

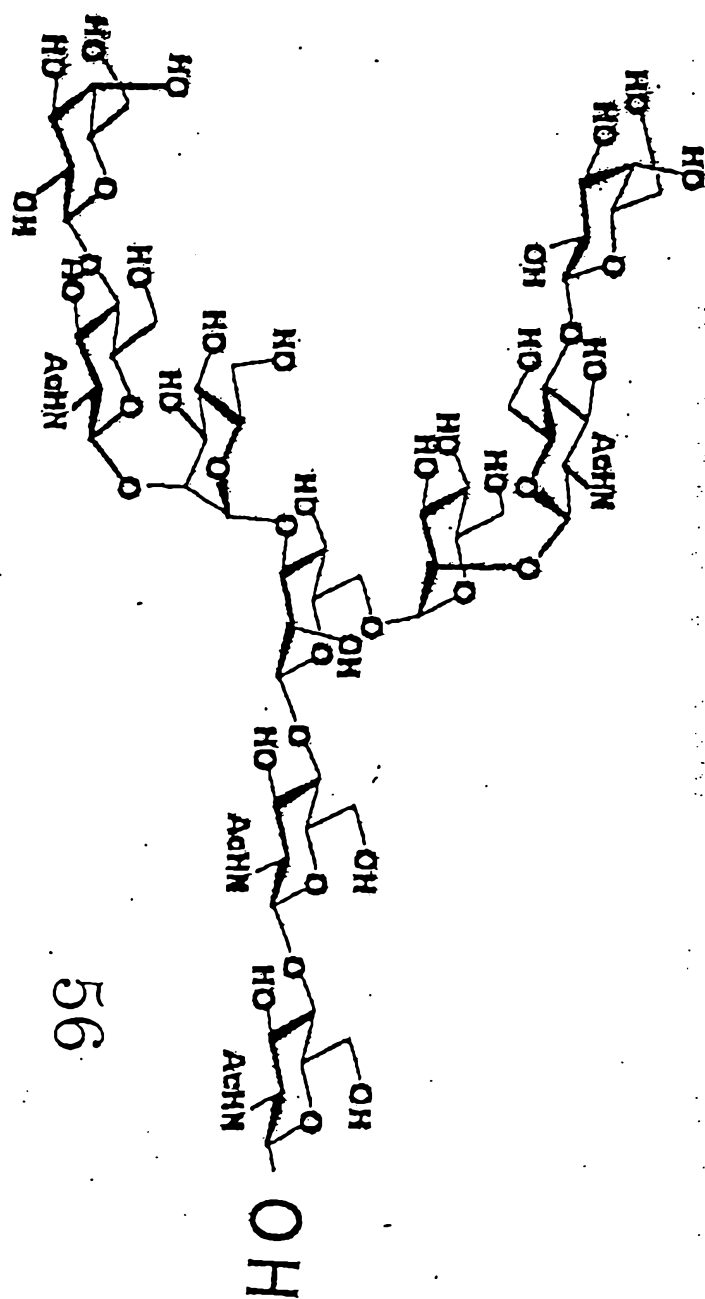


圖 12

陸、(一)、本案指定代表圖為：第_____圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：