

Title	ABO式血液型糖鎖抗原の効率合成と生物機能研究
Author(s)	筒井, 正斗
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77590
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

## 博士学位論文

## ABO 式血液型糖鎖抗原の効率合成と生物機能研究

Efficient synthesis of ABO blood type antigens and

functional study of their biological activity

## 2020年9月

## 筒井 正斗

大阪大学大学院理学研究科

# <u>目次</u>

要旨		4
略語表		6
第一章	序論	10
<参	考文献-第一章>	25
第二章	ABO 式血液型糖鎖抗原の合成	32
2-1	ABO式血液型糖鎖抗原(Type II)の合成計画	32
2-2	ガラクトシルドナー77 の合成	33
2-3	H 抗原 84 の合成	34
2-4	A 抗原 81 の合成	36
2-5	B抗原 83 の合成	37
2-6	結論	38
<参	考文献-第二章>	40

第三章	アミノ糖含有糖鎖の効率合成を目指したジアセチルストラテジーの確立	42
3-1	NHAc 構造による反応性の低下とジアセチルストラテジー	42

	3-2	ジアセチルストラテジーを用いたH抗原の合成計画	47
	3-3	NMR を用いた N-アセチルグルコサミンの分子間水素結合の検証	48
	3-4	ジアセチルストラテジーを用いた H 抗原の合成	53
	3-5	結論	55
	く参考	今文献-第三章>	57
第四	日章 Ig	gM抗体と血液型糖鎖の結合を制御する多価分子の創製	60
	4-1	免疫グロブリンと IgM 抗体	60
	4-2	多価効果を再現できる糖鎖デンドリマーの設計	62
	4-3	糖鎖デンドリマーの合成	66
	4-4	表面プラズモン共鳴分析法による糖鎖デンドリマーと IgM 抗体の	
		親和性評価	68
	4-5	糖鎖デンドリマーを用いた血球凝集阻害試験	72
	4-6	結論	76
	<参₹	考文献-第四章>	78
第3	五章 台	合成糖鎖を用いた生体機能解析	84
	5-1	抗体の作用と補体系	84
	5-2	ADC の概念を用いた抗体―糖鎖複合体の調製	85
	5-3	CDC 活性試験によるがん細胞特異的細胞死誘導の検証	89
	5-4	フローサイトメトリーによる合成糖鎖抗体複合体の性能検証	89
	5-5	結論	91

<才	参考文献−第五章>	92
第六章	総括	97
第七章	実験項	98
第八章	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> CNMR スペクトル	138
謝辞		176

誹	ŀ₹	臂	É
ю.	۱ŀ	- 7	



論文内容の要旨

Masato

氏

名

(

論文題名

名 Efficient synthesis of ABO blood type antigens and functional study of their biological activity

The ABO blood group is a blood-classification system based on the three different carbohydrate antigens on red blood cells (Fig. 1). These antigens are recognized by natural antibodies and induce strong immune response. In this study, I achieved the efficient synthesis of A, B, and H antigens by focusing on the protective group of amino sugars. I also



)



designed glycodendrimers to investigate the multivalent interactions of anti-blood group IgM antibody.



(GlcN) protected with Troc



Tsutsui

group. The carboxylic acid group was introduced at the reducing end to facilitate the synthesis of derivatives for biological assay. Next, H antigen was synthesized using diacetyl strategy in which NHAc is tentatively converted to NAc<sub>2</sub> during oligosaccharide construction (Fig. 2). The intermolecular hydrogen-bond of the NHAc group in the acceptor was observed by concentration- and temperature-dependent chemical shift of the amide proton and DOSY spectra in <sup>1</sup>HNMR. The larger effective molecular volume of the NHAc acceptor calculated by the DOSY than the NAc<sub>2</sub> acceptor suggested the formation of oligomeric structure of the NHAc acceptor. The reactivity of NHAc and NAc<sub>2</sub> acceptor was then investigated. Enhancement of the reactivity by NAc<sub>2</sub> protection was observed in both [1+1] and [1+2] glycosylations. These results indicate that the diacetyl strategy is an useful method for the efficient synthesis of the glycan containing GlcNAc.

Dendrimers with high affinity for IgM antibodies were designed and synthesized (Fig. 3). Three different sizes of dendrimers were synthesized by using 16-mer core structure. As the size of the dendrimers increases, the density of glycans is decreases. On the other hand, the number of interacting binding sites at same time increases as the dendrimer size increases. The largest one was

designed to cover all binding sites of IgM at the same time. SPR measurements showed middle size dendrimer showed the highest affinity. Hemagglutination inhibition assay also showed the highest inhibitory activity of the middle size dendrimer. These results indicate it is important to design dendrimer that can interact with some binding sites simultaneously while maintaining glycan density during the design of dendrimers.

Finally, I examined the induction of immune response using blood group antigen. I labeled the target cells with blood group antigen, recruiting of antibodies against target cells, and the induction of CDC activity. The results showed that the multivalent effect of antigen is essential for the regulation of biological functions using the interaction between IgM antibodies and antigen. Therefore, the use of dendrimer for induction of immune response is promising.



### 略語表

本文中に用いた略語,略号を以下に示した.

略語・略号	正式名称	和名
AAm	Acrylamide	アクリルアミド
Abs, Ab	Antibodies	抗体
Ac	Acetyl	アセチル
ADC	Antibody drag conjugate	抗体薬物複合体
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity	抗体依存性細胞傷害
Alloc	Allyloxycarbonyl	アリルオキシカルボニル
Allyl	2-Propenyl	2-プロペニル
Bis	<i>N</i> , <i>N</i> '-Methylene bisacrylamide	<i>N,N'</i> -メチレンビスアクリルアミド
Bn	Benzyl	ベンジル
Bz	Benzoyl	ベンゾイル
Cbz	Benzyloxycarbonyl	ベンジルオキシカルボニル
CDC	Complement dependent cytotoxity	補体依存性細胞傷害
COVID-19	Coronavirus disease 2019	新型コロナウイルス感染症
CuAAC	Cu-catalyzed azide alkyne	銅触媒を用いるアジドとアルキンとの環化
	cycloaddition	付加反応
DADMAC	Diallyl dimethyl ammonium chloride	ジアリルジメチルアンモニウムクロリド
DCM	Dichloromethane	ジクロロメタン
DDS	Drug delivery system	薬物輸送システム
DIPEA	Diisopropylethylamine	ジイソプロピルエチルアミン
DMAP	N,N-dimethyl-4-aminopyridine	<i>N,N-</i> ジメチル-4-アミノピリジン
DMF	N, N-Dimethylformamide	ジメチルホルムアミド

DOSY	Diffusion-ordered two dimentional	拡散係数による2次元核磁気共鳴分光法
	nuclear magnetic resonance	
	spectroscopy	
DTBMP	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridine	2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルピリジン
ELISA	Enzyme-linked immune sorbent	エライザ
	assay	
EMA	Enzymatic modular assembly	酵素モジュラーアセンブリ
Et	Ethyl	エチル
FCM	Flow cytometry	フローサイトメトリー
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl	9-フルオレニルメチロキシカルボニル
Fuc	Fucose	フコース
Gal	Galactose	ガラクトース
GalNAc	N-Acetyl galactosamine	N-アセチルガラクトサミン
GDP	Guanosine diphosphate	グアノシン二リン酸
Glc	Glucose	グルコース
GlcNAc	N-Acetylglucosamine	N-アセチルグルコサミン
GTA	glycosyltransferases A	糖転移酵素 A
GTB	glycosyltransferases B	糖転移酵素 B
НА	Hemagglutination assay	血球凝集試験
HIA	Hemagglutination inhibition assay	血球凝集阻害試験
HS	Human serum	ヒト血清
Ig	Immuno globulin	免疫グロブリン
ITC	Isothermal titration calorimetry	等温滴定カロリメトリー
LacNAc	N-Acetyllactosamine	N-アセチルラクトサミン
Lys	Lysine	リジン
MAC	Membrane attack complex	膜障害性複合体
Ме	Methyl	メチル

MeOTf	Methyl trifluoromethanesulfonate	トリフルオロメタンスルホン酸メチル
MS4A	Molecular sieves 4A	モレキュラーシーブス 4A
MW	Molecular weight	分子量
NIS	N-Iodosuccinimede	<i>N</i> -ヨードスクシンイミド
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
РАА	Poly N-hydroxyethyl acrylamide	ポリ N-ヒドロキシアクリルアミド
PAGE	Polyacrylamide gel	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
	electrophoresis	
PBS	Phosphate Buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PEG	Poly ethylene glycol	ポリエチレングリコール
Ph	Phenyl	フェニル
Phth	Pthaloyl	フタリル
Piv	Pivaloyl	ピバロイル
РМВ	<i>p</i> -Methoxybenzyl	<i>p</i> -メトキシベンジル
Ру	Pyridine	ピリジン
RC	Rabbite complex	ウサギ補体
SAF	Specific antibody filter	抗体特異的フィルター
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SPR	Surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TASF	Tris(dimethylamino)sulfonium	ジフルオロトリメチルケイ酸トリス (ジメチ
	difluorotrimethylsilicate	ルアミノ)スルホニウム
TBDPS	tert-Butyldiphenylsilyl	tert-ブチルジフェニルシリル
TBS	tert-Butyldimethylsilyl	tert-ブチルジメチルシリル
<sup>t</sup> BuOH	tert-Butyl alcohol	tert-ブチルアルコール
Tf <sub>2</sub> O	Trifluoromethanesulfonic	トリフルオロメタンスルホン酸無水物
	anhydride	
TFA	Trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸

TfOH	Trifluoromethanesulfonic acid	トリフルオロメタンスルホン酸
THF	Tetrahydrofuran	テトラヒドロフラン
TMS	Trimethylsilyl	トリメチルシリル
TMSCl	Trimethylsilyl chloride	クロロトリメチルシラン
TMSOTf	Trifluoromethanesulfonic	トリフルオロメタンスルホン酸トリメチル
	trimethylsilyl ester	シリル
Tol	Toluene	トルエン
Troc	2,2,2-Trichloroethyl chloroformate	クロロギ酸 2,2,2-トリクロロエチル
TSTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-	<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチル- <i>O</i> -( <i>N</i> -スクシンイミジ
	succinimidyl)uronium	ル)ウロニウムテトラフルオロボラート
	tetrafluoroborate	
UDP	Uridine diphosphate	ウリジンニリン酸

第一章 序論

"Therefore during the modification of the descendants of any one species, and during the incessant struggle of all species to increase in numbers, the more diversified these descendants become, the better will be their chance of succeeding in the battle of life." - Charles Robert Darwin (On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life)<sup>1</sup>

イギリスの地質学者であるチャールズ・ロバート・ダーウィンは、その著書「種の起源」の第四 章-Natural Selection において上記のように述べている.地球上の生命は、多様性を持つものが生 存競争に勝ち、生き残ることができる.これは、様々な生態環境の変化に対応できる種こそが生 存できると解釈することもできる.人類もその例外ではなく、常に生存競争の中で戦い続けてい る.つまり人類も他の生物と同様に、進化の過程において様々な多様性を獲得し、種として生存 を続けている.

ヒトの獲得した多様性の一つに血液型があげられる.もっとも有名な血液型は ABO 式血液型で ある.輸血の際の血液型不適合により,激しい抗原・抗体反応を示し,それは時にヒトを死に至ら しめる.ABO 式血液型について,1901年にオーストリアの解剖医であった Landsteiner らによって 人の血液は3種類であると発表された<sup>2</sup>.翌年に Decastello と Sturli によって第4の型の存在が示 され<sup>3</sup>,1910年に Dungern と Hirschfeld によって A型, B型, O型, AB型と命名<sup>4</sup>,1928年に国 際連盟の血清標準委員会で承認された.血液型の発見以前,ヒトの血液は1種類であると考えら れていた.それまで医療の現場では子羊の血液などを輸血する異種輸血や,ヒト同士での無差別 な同種輸血が行われており,助かるケースもあったものの,急性拒絶反応によって多くの人が命 を落とした.血液型の発見は輸血の成功率を飛躍的に向上させ,死亡率の低下に大きく貢献した. Landsteiner は血液型発見の功績で1930年にノーベル生理学・医学賞を受賞している.近年,Withers らは,細胞表面の血液型抗原をすべて H 抗原へと変換する酵素を発見し,万能血液への期待も高 まっている<sup>5</sup>.

ABO 式血液型の発見を皮切りに, MNSs 式や Rh 式, Kell 式, Lewis 式, Duffy 式など新たな血液型の報告が相次ぎ, 2020 年現在までに 37 種類が国際輸血学会によって認定されている. 2019 年には国立国際医療研究センターの徳永らによって新たな血液型抗原としてプリオンタンパク質が同定された<sup>6</sup>. この抗原タンパク質は KANNO 式血液型と命名され,日本初の血液型の命名となった.現時点で報告されている血液型の組み合わせは数百種類以上にもなり,人体の根幹をなす血液において人類は幅広い多様性を獲得した結果といえる.

ABO 式血液型は地域ごとの分布の偏りが顕著である.日本では、おおよそ A型が 40%、O型が

10

30%, B型が 20%, AB型が 10%である.地球規模では西A東B,北A南Oの傾向が認められ, 例えば北欧では5割近くがA型,アフリカ大陸は6割以上がO型である<sup>7</sup>.この血液型分布が示 す傾向は,疾病,特に感染症と関連しているといわれている.アフリカ大陸において多く報告され ているマラリアは,血液型による感染への影響は認められないものの,O型と非O型の間で重症 化のリスクに差があり,B型はO型に比べておよそ5倍以上重症化のリスクがある<sup>8</sup>.この傾向の 一因として,A型やB型の赤血球はロゼッティング(マラリアに感染した赤血球が正常な赤血球 を周りに引きつけること)しやすく,これが血管に詰まって重症化するが,O型の赤血球のロゼッ トは小さく不安定である可能性が指摘されている<sup>9</sup>.この結果はO型がマラリアへの抵抗力を持 っていることを示唆しており,アフリカ大陸においてO型の割合が高いことの裏付けとする説も ある.一方で,東南アジアや南アジアではB型とO型の分布が拮抗している.これは19世紀初 頭から 20世紀にかけてパンデミックを引き起こしたコレラに対する抵抗性の影響といわれてお り,O型はコレラに感染しやすく,死亡率も高いと報告されている<sup>10,11</sup>.このように,血液型は各 地域における疾病の流行と密接に関連しており,各々の生存環境に適応する種を残すという種の 保存の理にかなった,人類の獲得した多様性の一つであると考えられる.

上記の他にも、血液型と関連する感染症が多数報告されている. 胃がんの原因であるピロリ菌は、O型に感染しやすい<sup>12</sup>.また、ノロウイルスにおいても、ウイルス株によって感染しやすい血液型が異なることが報告がされている<sup>13-16</sup>.ノロウイルスは ABO 式血液型に加え、Lewis 式血液型とも関連する.これらの他にも膵がん (O型に比べ、B型は 1.72 倍<sup>17</sup>) や、肺塞栓症 (O型に比べ、非O型は 1.86 倍<sup>18</sup>) などは疾病のリスクが血液型と相関することが報告されている.2019年12月から全世界でパンデミックを引き起こした COVID-19 も、血液型との関連が指摘されており<sup>19,20</sup>、A型の重症化リスクが O型に比べて 4割程度高いことが報告されている<sup>20</sup>.一方で、これらの報告のほとんどは統計学に基づくもので、血液型の役割に、分子レベルで迫る研究はほとんど行われていない.

ABO 式血液型は、赤血球上の糖鎖構造による分類である. ABO 式血液型糖鎖は糖タンパク質や 糖脂質の末端構造として存在する<sup>21</sup>. ABO 式血液型糖鎖抗原のエピトープは 1957 年に Morgan と Watkins によって同定され、それぞれ、A エピトープ1: GalNAc  $\alpha$ (1-3)[Fuc  $\alpha$ (1-2)]Gal、B エピトー プ2: Gal  $\alpha$ (1-3)[Fuc  $\alpha$ (1-2)]Gal、H エピトープ3: Fuc  $\alpha$ (1-2)Gal と定義されている (Figure 1-2)<sup>22</sup>. これらの抗原は、ボンペイ型 (O型の一種、血液中に ABO 式血液型抗原がなく、抗A、B、H 抗 原に対する抗体を持つ稀血)を除いて H 抗原構造を基本骨格として有する. H 抗原に対し、糖転 移酵素 glycosyltransferases A (GTA) が作用することで A 型抗原へ、glycosyltransferases B (GTB) が作用することで B 型抗原へと変換される<sup>21,23</sup>.

11



Figure 1-2 ABO 式血液型糖鎖エピトープの構造

ABO 式血液型糖鎖は糖鎖抗原が結合する糖の位置と種類の違いから6つのタイプ(Type I - VI) に分類できる<sup>24</sup>. それぞれの構造は, Type I: ABO-β(1-3)GlcNAcβ, Type II: ABO-β(1-4)GlcNAcβ, Type III: ABO-β(1-4)GalNAcα, Type IV: ABO-β(1-3)GalNAcβ, Type V: ABO-β(1-3)Galβ, Type VI: ABO-β(1-4)Glcβである(Figure 1-3). このうち Type Vは合成糖鎖であり, ヒトの体内からは未だ発 見されていない. また, ABO 式血液型糖鎖は赤血球上のみならず, 消化管や皮膚の表面など全身 に広く分布している. 組織により発現する糖鎖のタイプは異なり, 最も広く発現しているのは Type Iと Type IIである<sup>25</sup>.

血液型糖鎖のタイプ	糖鎖構造
Type I	OH OH RO HO HO AcHN OH HOH OH
Type II	OHOH RO HO HO ACHN OH HO ACHN OH



Figure 1-3 ABO 式血液型糖鎖 Type I ~ VIの構造

A 抗原: R = GalNAc  $\alpha$ (1-3)-, B 抗原: R = Gal  $\alpha$ (1-3)-, H 抗原: R = H

上記の血液型糖鎖は赤血球をはじめとする多くの細胞に発現し、さまざまな生命現象を引き起こす. 輸血における急性拒絶反応は、抗血液型糖鎖抗体が赤血球表面の糖鎖抗原に反応して、凝集を引き起こ すことが原因である.また、ウイルスや細菌などの病原体の多くは、宿主細胞の糖鎖を認識して感 染するが、血液型糖鎖を認識する病原体も報告されている.ピロリ菌は血液型糖鎖を認識するレ クチン BabA を持つ<sup>12</sup>.また、ノロウイルスも血液型糖鎖の認識が感染に関与することが示されて いる<sup>13-16</sup>.

血液型の役割に分子レベルで迫るためには、血液型糖鎖を調製し、この糖鎖をプローブとして 用いた機能解析が有効であると考えた.そのためには、それぞれの血液型糖鎖を純粋に、十分量得 ることが必要であると考え、筆者は、これらの血液型糖鎖の化学合成を検討した.

血液型糖鎖は多くの合成例が報告されている. 1975 年に Lemieux らは ABO 式血液型エピトー プの合成をはじめて報告した (Figure 1-4)<sup>26</sup>. Lemieux らは, ガラクトース保護体 4 に対してフコ シルドナー5, ガラクトシルドナー10 を順次グリコシル化することで, B 型エピトープ 12 の合成 を達成した. その他にも, ABO 式血液型エピトープの合成は Hindsgaul らの化学酵素合成<sup>27</sup> や, Seto らによる酵素合成<sup>28</sup> などが報告された.



Figure 1-4 Lemieux らによる B 型糖鎖抗原の合成

さらに、タイプ別の血液型糖鎖の合成も報告されている. Type Iの合成報告は多く存在する<sup>29-35</sup>. 1978 年に Paulsen らが ABO 式血液型糖鎖の Type I, 化合物 17~19 の合成を初めて達成した (Figure 1-5)<sup>29</sup>. その後, Bovin らは Type I, II, III - B 型糖鎖を網羅的に合成した<sup>30</sup>.



Figure 1-5 Paulsen らによる Type I-A, B, H 抗原 17~19の合成

また, 1990 年に Schmidt らは脂質セラミド部分を含めた糖脂質 27 の全合成(Figure 1-6)を報告した<sup>33</sup>. 彼らはまず, B型糖鎖抗原 24 の合成を行い, その後, ラクトサミニルアクセプター25 と連結することで 6 糖骨格 26 を構築した. この糖鎖骨格 26 に対し, 脂肪鎖を導入し, 糖脂質 27 の全合成を達成した.



Figure 1-6 Schimdt らによる血液型糖鎖 Type IV-B 型糖脂質 27 の合成

筆者は、本研究において胃や腸など多くの組織に広く発現する Type IIの血液型糖鎖を合成した. Type IIの合成も多くの研究者によって報告されている<sup>36-44</sup>. 1979 年に Paulsen らは初の Type II 抗 原 32~34 の合成を報告した(Figure 1-7)<sup>36</sup>. Paulsen らはブロモ糖 28 を用いたグリコシル化によ り H 抗原保護体 31 を合成した. これを脱保護することで H 抗原 34 を合成した. また、この共通 中間体 31 に対し、ガラクトサミニルドナー16、ガラクトシルドナー10 とのグリコシル化を経て、 A 抗原 32、B 抗原 33 をそれぞれ合成した.



Figure 1-7 Paulsen らによる Type II 抗原 32~34 の合成

1981 年に, Milat らは Type IIの B 抗原 33 の合成を報告した(Figure 1-8)<sup>42</sup>. 2 糖 35 に対し, *N*-メチルアセトイミジル基を脱離基としたフコシルドナー36 をグリコシル化することで, O 型糖鎖 保護体 37 を合成し, ガラクトシルドナー38 とのグリコシル化を経て B 抗原 33 を合成した.



Figure 1-8 Milat らによる Type II – B 抗原 33 の合成

また,2002 年に Bovin らは Type IIの A 抗原 46, B 抗原 47 の合成を報告した(Figure 1-9)<sup>38</sup>. ブロモ糖 39 を用いたグリコシル化により,2 糖 41 を合成し,保護基を変換後,フコシルドナー42 とのグリコシル化によって O 型糖鎖保護体 43 を得た.最後に*N*-アセチルガラクトサミニルドナ ー44 もしくはガラクトシルドナー45 とグリコシル化することで,A 抗原 46, B 抗原 47 の合成を 達成した. Bovin の合成においては、アミノプロピル基を還元末端に導入しているため、プローブ 化が容易である.また,彼らは Type II糖鎖のほかに、Le<sup>x</sup>(Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-OR), Le<sup>y</sup>(Fucα1-2Galβ1-4(Fuα1-3)GlcNAcβ-OR)の合成も同時に報告している.



Figure 1-9 Bovin らによる合成

2010 年に Lowary らは各種トリクロロアセトイミデートドナーを用いて各単糖を順次連結し, Type I および Type IIの ABO 式血液型糖鎖の合成を達成した(Figure 1-10)<sup>39</sup>. Lowary らはチオー ル-エン反応による糖鎖の修飾を視野に入れ,オレフィンを末端に持つリンカーを糖鎖の還元末端 に導入し,合成を完了した.



Figure 1-10 Lowary らによる Type IIの合成

Kiso らも Type IIの血液型糖鎖の合成を報告した(Figure 1-11)<sup>40</sup>.本報告では, Heyns 転位によってラクトサミン構造 **58**を構築し,これに **59**をフコシル化することで O型糖鎖保護体 **60**を合成した.さらに,ジ-*tert*-ブチルシリレンを用いたα選択的グリコシル化を利用して,A 抗原 **63** および B 抗原 **65** へと導いた.



Figure 1-11 Kiso らによる Type IIの効率合成

2015 年に Mandal らは Type IIの ABO 式血液型糖鎖抗原ならびに Lewis X 抗原の合成を報告した (Figure 1-12)<sup>41</sup>. 2 糖体アクセプター66 に対し, チオ糖フコシルドナー67 を作用させ, O 型糖鎖 保護体 68 を合成した.これに対し, トリクロロアセトイミデートドナー69 を用いて A 抗原 46 を, チオ糖ドナー70 を用いて B 抗原 47 を合成した.また,彼らは同時に Le<sup>x</sup>, αGal-Lewis X, Linear B Type II (αGal-LacNAc)糖鎖の合成も達成している.



Figure 1-12 Mandal らによる合成

Type III~Type VIの合成も報告されている<sup>45,46</sup>. Bovin らは 1990 年に A, B, O 型の Type IIIの合 成を報告している<sup>45</sup>. Lowary らは 2009 年に Type V, VIの合成を報告している<sup>46</sup>. さらに Lowary らは 2011 年に Type III, IVの合成を報告することで血液型糖鎖の全サブタイプの合成を完了し, Type I ~ VIの立体構造について NMR を用いて解析し, 抗原サブタイプは A, B, および O (H) 抗原のコ ンフォメーションに大きな影響を与えないと報告した<sup>47</sup>. 彼らは抗原サブタイプ間の認識の差<sup>48</sup> は, 構造の違いから生じているとは考えにくいと述べた<sup>48</sup>.

また化学合成だけでなく, ABO 式血液型糖鎖の化学酵素合成や酵素合成, 微生物を利用した調 製も報告されている<sup>27, 28, 49-53</sup>. 2004 年に Wang らは, *Escherichia coli* O86 の O-Antigen biosynthesis glycosyltransferase (WbnJ, WbnK, WbnI)を用いることで B 型糖鎖 Type IIIの合成を達成した (Figure 1-13)<sup>51</sup>.



Figure 1-13 Wang らによる B 型糖鎖の酵素合成

また, Cao らは Type I, II, III, IV, VIの A, B, H 抗原を酵素合成する手法を確立した(Figure 1-14)<sup>52</sup>. 本報告によって血液型糖鎖の酵素による網羅的合成が達成された.



Figure 1-14 Cao らによる酵素合成

Drouillard らは大腸菌を用いて H 抗原の大スケール合成を達成し,工業化にも耐えうる合成手法を提示した<sup>53</sup>.彼らはヘリコバクターピロリの 1,2-フコシルトランスフェラーゼを遺伝子導入した大腸菌を用いて,H抗原を含む5糖のグラムスケールでの合成を達成している.

上記の通り,化学合成のほかにも様々な合成法が確立されつつある.しかしながら特定の位置 に同位体標識や蛍光標識などの機能化が可能な化学合成法は,分子レベルでの機能評価を行う上 で未だにその有用性は高い.そのため,簡便,かつ,量的供給が可能な血液型糖鎖合成法の確立 は,その活性,さらには血液型の存在意義に迫るうえで必要不可欠である.

多価効果は自然界における糖鎖機能の発現において、極めて重要で本質的な役割を果たす.一 般的に、糖鎖とその認識分子の相互作用は弱い場合が多いが、この弱い相互作用が組み合わさる ことで、生物機能の制御を可能とする強い相互作用になる. ABO 式血液型糖鎖抗原の生物活性 においても、多価効果は重要である. 例えば、血球凝集は、赤血球表面の糖鎖抗原が自然抗体で ある抗血液型抗体に多点認識されることで起こる. そのため、糖鎖の機能制御において、この多 価効果を再現し、制御することは極めて重要な課題であり、さまざまな多価分子が開発されてき た. 著者は、血液型糖鎖を多価マテリアルへと誘導し、抗血液型抗体と相互作用の制御を目指し た. 血液型糖鎖の多価分子の合成とその生物機能制御への応用の例は限られている 54-61.

Federspiel らは抗血液型抗体の除去デバイスの開発に精力的に取り組んできた.彼らは、2000 年に中空糸膜の透析フィルターに動物由来タンパク質抗原 Neutr-AB を担持することで、ヒト全 血から抗血液型抗体を除去する Specific antibody filter (SAF)を開発した<sup>54</sup>.さらに、より効率的 に抗体を除去するため、多価効果を利用した.2006年に、ポリ N-ヒドロキシエチルアクリルア ミド (PAA) に、A型3糖抗原やB型3糖抗原を担持し、市販の抗A抗体(マウスモノクローナ ル IgM 抗体)との相互作用を評価したところ、PAA 担持により、親和性が向上することを明ら かにした<sup>55</sup>.2008年にA抗原担持 PAA を用いて70%程度のモノクローナル抗体を除去できる SAFを報告した<sup>56</sup>.さらに合成糖鎖を担持する PAA のサイズを 30 kDa から 1000 kDa へと大きく ことで、その効率が向上することを明らかにした<sup>57</sup>.この際、PAA 表面の糖鎖担持量を増加させ ても抗体との相互作用効率は増大しないという興味深い知見を報告している.さらに、超高分子 量骨格を用いた糖鎖ポリマーを SAF として用いることで、モノクローナル抗体の力価を1:128 から1:4未満まで低下させるデバイスの開発に成功した<sup>58</sup>.

2006 年に P. G. Wang らは B 型血液型糖鎖抗原を担持したゲルを合成し、「かご型多価効果」に よるノロウイルスの捕捉を実現した<sup>59</sup>. Diallyl dimethyl ammonium chloride (DADMAC) と アクリ ルアミド (AAm) を用い, *N*,*N*'-methylene bisacrylamide (Bis)を架橋剤としてゲルを作製した. 試 薬の当量比によりゲルのメッシュサイズを調整し, 20 nm 以上のサイズで効率よくウイルス用粒

23

子を捕捉することを見出した.

Buriak らは血液型糖鎖を担持したシリカナノ粒子を作製し、対応する抗体、ならびに、その抗体を発現する B 細胞との相互作用を確認した<sup>60</sup>. その際、コア骨格であるシリカ粒子への直接的な非特異結合を、ナノ粒子周りに PEG リンカーを導入することで回避できることも明らかとした.

2017年に Cairo らは、ヘテロデンドリマーを用いた B 細胞の活性制御を検討した<sup>61</sup>. B 細胞受容体抗原として血液型糖鎖、CD22 リガンドとしてシアリル 3 糖を同一デンドリマー上に担持し、B 細胞受容体と CD22 レセプターの共局在化を実現した.

本研究では、まず、血液型糖鎖の量的供給を可能とする効率的合成法の開発を目指した.筆者 は、グルコサミンの保護基に着目して血液型糖鎖を合成した.第二章ではTroc保護のグルコサミ ンを用いて A, B, H 抗原の合成を達成した.さらに第三章では、アミノ糖含有糖鎖の効率的合成 法の確立を目指し、ジアセチルストラテジーを提唱し、本合成戦略を用いて H 抗原を合成した. さらに、筆者は、合成糖鎖を多価分子へと誘導し、血液型糖鎖の機能制御を目指した.血液型糖鎖 が引き起こす多くの生命現象は、これを認識する IgM 抗体が関与することに注目した. IgM 抗体 に対して高い親和性を示す化合物の創製が、血液型糖鎖の機能解明・制御において有効であると 考え、第四章では IgM 抗体と高い親和性を示す糖鎖デンドリマーを精密に設計・合成した.この 際、異なるサイズのデンドリマーと IgM 抗体の親和性を精査することで、多価効果を発現する糖 鎖リガンド設計の重要な指針を得た.加えて、第5章では、血液型糖鎖が引き起こす急性拒絶反 応を利用した抗腫瘍分子の開発を検討した.以下詳細を報告する.

24

<参考文献-第一章>

- 1. Darwin, C., On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. 1859.
- Landsteiner, K., Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wiener klinische Wochenschrift 1901, 14 (46), 1132-1134.
- 3. Decastello, A. v.; Sturli, A., Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. *Wiener klinische Wochenschrift* **1902**, *49* (26), 1090-1095.
- 4. Dungern, E. v.; Hirschfeld, L., Ueber Vererbung gruppenspezifischer Strukturen des Blutes, II. Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie **1910**, 284-292.
- Kwan, D. H.; Constantinescu, I.; Chapanian, R.; Higgins, M. A.; Kotzler, M. P.; Samain, E.; Boraston, A. B.; Kizhakkedathu, J. N.; Withers, S. G., Toward Efficient Enzymes for the Generation of Universal Blood through Structure-Guided Directed Evolution. *Journal of the American Chemical Society* 2015, *137* (17), 5695-5705.
- Omae, Y.; Ito, S.; Takeuchi, M.; Isa, K.; Ogasawara, K.; Kawabata, K.; Oda, A.; Kaito, S.; Tsuneyama, H.; Uchikawa, M.; Wada, I.; Ohto, H.; Tokunaga, K., Integrative genome analysis identified the KANNO blood group antigen as prion protein. *Transfusion* **2019**, *59* (7), 2429-2435.
- 7. 永田宏, 血液型でわかるなりやすい病気なりにくい病気 がん、胃潰瘍 、脳梗塞から感染症ま で、講談社: 2013; p 284-292.
- Panda, A. K.; Panda, S. K.; Sahu, A. N.; Tripathy, R.; Ravindran, B.; Das, B. K., Association of ABO blood group with severe falciparum malaria in adults: case control study and meta-analysis. *Malaria Journal* 2011, *10*.
- 9. Rowe, A.; Obeiro, J.; Newbold, C. I.; Marsh, K., Plasmodium-falciparum rosetting is associated with Malaria severity in Kenya. *Infection and Immunity* **1995**, *63* (6), 2323-2326.
- Harris, J. B.; Khan, A. I.; LaRocque, R. C.; Dorer, D. J.; Chowdhury, F.; Faruque, A. S. G.; Sack, D. A.; Ryan, E. T.; Qadri, F.; Calderwood, S. B., Blood group, immunity, and risk of infection with Vibrio cholerae in an area of endemicity. *Infection and Immunity* 2005, *73* (11), 7422-7427.
- 11. Holmner, A.; Mackenzie, A.; Krengel, U., Molecular basis of cholera blood-group dependence and implications for a world characterized by climate change. *Febs Letters* **2010**, *584* (12), 2548-2555.
- Aspholm-Hurtig, M.; Dailide, G.; Lahmann, M.; Kalia, A.; Ilver, D.; Roche, N.; Vikstrom, S.; Sjostrom, R.; Linden, S.; Backstrom, A.; Lundberg, C.; Arnqvist, A.; Mahdavi, J.; Nilsson, U. J.; Velapatino, B.; Gilman, R. H.; Gerhard, M.; Alarcon, T.; Lopez-Brea, M.; Nakazawa, T.; Fox, J. G.; Correa, P.; Dominguez-Bello, M. G.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Normark, S.; Carlstedt, I.; Oscarson, S.; Teneberg, S.; Berg, D. E.; Boren, T., Functional adaptation of BabA, the H-pylori ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* 2004, *305* (5683), 519-522.
- Marionneau, S.; Ruvoen, N.; Le Moullac-Vaidye, B.; Clement, M.; Cailleau-Thomas, A.; Ruiz-Palacois, G.; Huang, P. W.; Jiang, X.; Le Pendu, J., Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002, *122* (7), 1967-1977.

- Lindesmith, L.; Moe, C.; Marionneau, S.; Ruvoen, N.; Jiang, X.; Lindbland, L.; Stewart, P.; LePendu, J.; Baric, R., Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine* 2003, 9 (5), 548-553.
- Hennessy, E. P.; Green, A. D.; Connor, M. P.; Darby, R.; MacDonald, P., Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *Journal of Infectious Diseases* 2003, *188* (1), 176-177.
- Tan, M.; Jiang, X., Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends in Microbiology* 2005, *13* (6), 285-293.
- Wolpin, B. M.; Chan, A. T.; Hartge, P.; Chanock, S. J.; Kraft, P.; Hunter, D. J.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S., ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2009, *101* (6), 424-431.
- Wolpin, B. M.; Kabrhel, C.; Varraso, R.; Kraft, P.; Rimm, E. B.; Goldhaber, S. Z.; Camargo, C. A.; Fuchs, C. S., Prospective study of ABO blood type and the risk of pulmonary embolism in two large cohort studies. *Thrombosis and Haemostasis* 2010, *104* (5), 962-971.
- Zhao, J.; Yang, Y.; Huang, H.; Li, D.; Gu, D.; Lu, X.; Zhang, Z.; Liu, L.; Liu, T.; Liu, Y.; He, Y.; Sun, B.; Wei, M.; Yang, G.; Wang, X.; Zhang, L.; Zhou, X.; Xing, M.; Wang, P. G., Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility. *medRxiv* 2020, 2020.03.11.20031096.
- 20. Ellinghaus, D.; Degenhardt, F.; Bujanda, L.; Buti, M.; Albillos, A.; Invernizzi, P.; Fernández, J.; Prati, D.; Baselli, G.; Asselta, R.; Grimsrud, M. M.; Milani, C.; Aziz, F.; Kässens, J.; May, S.; Wendorff, M.; Wienbrandt, L.; Uellendahl-Werth, F.; Zheng, T.; Yi, X.; de Pablo, R.; Chercoles, A. G.; Palom, A.; Garcia-Fernandez, A.-E.; Rodriguez-Frias, F.; Zanella, A.; Bandera, A.; Protti, A.; Aghemo, A.; Lleo, A.; Biondi, A.; Caballero-Garralda, A.; Gori, A.; Tanck, A.; Carreras Fracanzani, A. L.; Peschuck, A.; Julià, A.; Pesenti, A.; Nolla, A.; Latiano, A.; Voza, A.; Jiménez, D.; Mateos, B.; Nafria Jimenez, B.; Quereda, C.; Paccapelo, C.; Gassner, C.; Angelini, C.; Cea, C.; Solier, A.; Pestaña, D.; Muñiz-Diaz, E.; Sandoval, E.; Paraboschi, E. M.; Navas, E.; García Sánchez, F.; Ceriotti, F.; Martinelli-Boneschi, F.; Peyvandi, F.; Blasi, F.; Téllez, L.; Blanco-Grau, A.; Hemmrich-Stanisak, G.; Grasselli, G.; Costantino, G.; Cardamone, G.; Foti, G.; Aneli, S.; Kurihara, H.; ElAbd, H.; My, I.; Galván-Femenia, I.; Martín, J.; Erdmann, J.; Ferrusquía-Acosta, J.; Garcia-Etxebarria, K.; Izquierdo-Sanchez, L.; Bettini, L. R.; Sumoy, L.; Terranova, L.; Moreira, L.; Santoro, L.; Scudeller, L.; Mesonero, F.; Roade, L.; Rühlemann, M. C.; Schaefer, M.; Carrabba, M.; Riveiro-Barciela, M.; Figuera Basso, M. E.; Valsecchi, M. G.; Hernandez-Tejero, M.; Acosta-Herrera, M.; D'Angiò, M.; Baldini, M.; Cazzaniga, M.; Schulzky, M.; Cecconi, M.; Wittig, M.; Ciccarelli, M.; Rodríguez-Gandía, M.; Bocciolone, M.; Miozzo, M.; Montano, N.; Braun, N.; Sacchi, N.; Martínez, N.; Özer, O.; Palmieri, O.; Faverio, P.; Preatoni, P.; Bonfanti, P.; Omodei, P.; Tentorio, P.; Castro, P.; Rodrigues, P. M.; Blandino Ortiz, A.; de Cid, R.; Ferrer, R.; Gualtierotti, R.; Nieto, R.; Goerg, S.; Badalamenti, S.; Marsal, S.; Matullo, G.; Pelusi, S.; Juzenas, S.; Aliberti, S.; Monzani, V.; Moreno, V.; Wesse, T.; Lenz, T.

L.; Pumarola, T.; Rimoldi, V.; Bosari, S.; Albrecht, W.; Peter, W.; Romero-Gómez, M.; D'Amato, M.; Duga, S.; Banales, J. M.; Hov, J. R.; Folseraas, T.; Valenti, L.; Franke, A.; Karlsen, T. H., Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine* **2020**.

- 21. Yamamoto, F., Review: ABO blood group system ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology* **2004**, *20* (1), 3-22.
- 22. Watkins, W. M.; Morgan, W. T. J., Specific inhibition studies relating to the Lewis blood-group system. *Nature* **1957**, *180* (4594), 1038-1040.
- 23. Race, C.; Ziderman, D.; Watkins, W. M., An α-d-galactosyltransferase associated with the blood-group B character. *Biochemical Journal* **1968**, *107* (5), 733-735.
- Rege, V. P.; Painter, T. J.; Watkins, W. M.; Morgan, W. T. J., Three New Trisaccharides Obtained from Human Blood-Group A, B, H and Lea Substances: Possible Sugar Sequences in the Carbohydrate Chains. *Nature* 1963, 200 (4906), 532-534.
- 25. Ravn, V.; Dabelsteen, E., Tissue distribution of histo-blood group antigens. Apmis 2000, 108 (1), 1-28.
- Lemieux, R. U.; Driguez, H., Chemical synthesis of 2-O-(.alpha.-L-fucopyranosyl)-3-O-(.alpha.-D-galactopyranosyl)-D-galactose. Terminal structure of the blood-group B antigenic determinant. *Journal of the American Chemical Society* 1975, 97 (14), 4069-4075.
- 27. Qian, X. P.; Sujino, K.; Otter, A.; Palcic, M. M.; Hindsgaul, O., Chemoenzymatic synthesis of alpha-(1 -> 3)-Gal(NAc)-terminating glycosides of complex tertiary sugar alcohols. *Journal of the American Chemical Society* 1999, *121* (51), 12063-12072.
- 28. Seto, N. O. L.; Compston, C. A.; Szpacenko, A.; Palcic, M. M., Enzymatic synthesis of blood group A and B trisaccharide analogues. *Carbohydrate Research* **2000**, *324* (3), 161-169.
- 29. Paulsen, H.; Kolar, C., Synthesis of Tetrasaccharide chains of Type-2 of the determinants of blood-group substance-A and substance-B. *Tetrahedron Letters* **1979**, (31), 2881-2884.
- Korchagina, E. Y.; Ryzhov, I. M.; Byrgazov, K. A.; Popova, I. S.; Pokrovsky, S. N.; Bovin, N. V., Block synthesis of blood group tetrasaccharides B (types 1, 3 and 4). *Mendeleev Communications* 2009, *19* (3), 152-154.
- Ryzhov, I. M.; Korchagina, E. Y.; Popova, I. S.; Bovin, N. V., Block synthesis of A tetrasaccharides (types 1, 3, and 4) related to the human ABO blood group system. *Carbohydrate Research* 2012, 351, 17-25.
- 32. Bovin, N. V.; Khorlin, A. Y., Synthesis of the determinant oligosaccharides of ABH (TYPE-1) blood-group antigens and Le(B) tetrasaccharide from the same precursor. *Bioorganicheskaya Khimiya* **1984**, *10* (6), 853-860.
- Zimmermann, P.; Greilich, U.; Schmidt, R. R., Glycosylimidates .46. Total synthesis of a hexaosyl ceramide glycolipid acting as a receptor for macrophage-migration inhibition-factor. *Tetrahedron Letters* 1990, *31* (13), 1849-1852.
- 34. Udodong, U. E.; Rao, C. S.; Fraserreid, B., Normal-pentenyl glycosides in the efficient assembly of the blood-group substance-B tetrasaccharide. *Tetrahedron* **1992**, *48* (23), 4713-4724.

- 35. Bovin, N. V.; Zurabyan, S. E.; Khorlin, A. Y., Stereoselectivity in glycosylation by means of 2-azido-2desoxy-D-galactopyranose derivatives and the synthesis of the determinative oligosaccharide of blood group-A, Type-1. *Bulletin of the Academy of Sciences of the Ussr Division of Chemical Science* 1982, 31 (5), 1023-1030.
- 36. Paulsen, H.; Kolář, Č., Synthese der tetrasaccharid-ketten der type 2 der determinanten der blutgruppensubstanzen a und B. *Tetrahedron Letters* **1979**, *20* (31), 2881-2884.
- 37. Paulsen, H.; Kolář, Č., Bausteine von Oligosacchariden, XX1) Synthese der Oligosaccharid-Determinanten der Blutgruppensubstanzen der Type 2 des ABH-Systems. Diskussion der α-Glycosid-Synthese. *Chemische Berichte* 1981, *114* (1), 306-321.
- 38. Pazynina, G. V.; Tyrtysh, T. V.; Bovin, N. V., Synthesis of histo blood-group antigens A and B (type 2), xenoantigen Galα1-3Galβ1-4GlcNAc and related type 2 backbone oligosaccharides as haptens in spacered form. *Mendeleev Communications* 2002, *12* (4), 143-145.
- 39. Meloncelli, P. J.; Lowary, T. L., Synthesis of ABO histo-blood group type I and II antigens. *Carbohydrate Research* **2010**, *345* (16), 2305-2322.
- 40. Hara, A.; Imamura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M., A New Chemical Approach to Human ABO Histo-Blood Group Type 2 Antigens. *Molecules* **2014**, *19* (1), 414-437.
- 41. Karki, G.; Mishra, V. N.; Mandal, P. K., An expeditious synthesis of blood-group antigens, ABO histoblood group type II antigens and xenoantigen oligosaccharides with amino type spacer-arms. *Glycoconjugate Journal* **2016**, *33* (1), 63-78.
- 42. Milat, M.-L.; Sinaÿ, P., Synthesis of the tetrasaccharide O-α-L-fucopyranosyl- $(1 \rightarrow 2)$ -[O-α-D-galactopyranosyl- $(1 \rightarrow 3)$ ]-O-β-D-galactopyranosyl- $(1 \rightarrow 4)$ -2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, the antigenic determinant of human blood-group B (type 2). *Carbohydrate Research* **1981**, *92* (2), 183-189.
- Love, K. R.; Seeberger, P. H., Automated solid-phase synthesis of protected tumor-associated antigen and blood group determinant oligosaccharides. *Angewandte Chemie-International Edition* 2004, 43 (5), 602-605.
- Horlacher, T.; Oberli, M. A.; Werz, D. B.; Krock, L.; Bufali, S.; Mishra, R.; Sobek, J.; Simons, K.; Hirashima, M.; Niki, T.; Seeberger, P. H., Determination of Carbohydrate-Binding Preferences of Human Galectins with Carbohydrate Microarrays. *Chembiochem* 2010, *11* (11), 1563-1573.
- 45. Zemlianukhina, T. V.; Bovin, N. V., [Synthesis of oligosaccharides with group specificity for blood types A, B and H (Type 3)]. *Bioorg Khim* **1990**, *16* (8), 1096-104.
- Meloncelli, P. J.; Lowary, T. L., Synthesis of ABO Histo-Blood Group Type V and VI Antigens. *Australian Journal of Chemistry* 2009, 62 (6), 558-574.
- Meloncelli, P. J.; West, L. J.; Lowary, T. L., Synthesis and NMR studies on the ABO histo-blood group antigens: synthesis of type III and IV structures and NMR characterization of type I-VI antigens. *Carbohydrate Research* 2011, 346 (12), 1406-1426.
- 48. Clausen, H.; Levery, S. B.; Nudelman, E.; Tsuchiya, S.; Hakomori, S., Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: Chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**,

82 (4), 1199-1203.

- 49. Bretting, H.; Buck, F.; Jacobs, G.; Meinke, S.; Scheppokat, A. M.; Thiem, J., Tandem exploitation of Helix pomatia glycosyltransferases: Facile syntheses of H-antigen-bearing oligosaccharides. *Chemistry- a European Journal* **2007**, *13* (25), 7144-7152.
- Compston, C. A.; Condon, C.; Hanna, H. R.; Mazid, M. A., Rapid production of a panel of blood-group A-active oligosaccharides using chemically synthesized disaccharide and trisaccharide primers and an easily prepared porcine (1- 3)-alpha-N-acetyl-D-galactosaminyltransferase. *Carbohydrate Research* 1993, 239, 167-176.
- 51.Yi, W.; Shao, J.; Zhu, L.; Li, M.; Singh, M.; Lu, Y.; Lin, S.; Li, H.; Ryu, K.; Shen, J.; Guo, H.; Yao, Q.; Bush, C. A.; Wang, P. G., Escherichia coli O86 O-antigen biosynthetic gene cluster and stepwise enzymatic synthesis of human blood group B antigen tetrasaccharide. *J Am Chem Soc* 2005, *127* (7), 2040-1.
- 52. Ye, J. F.; Liu, X. W.; Peng, P.; Yi, W.; Chen, X.; Wang, F. S.; Cao, H. Z., Diversity-Oriented Enzymatic Modular Assembly of ABO Histo-blood Group Antigens. *Acs Catalysis* **2016**, *6* (12), 8140-8144.
- 53. Drouillard, S.; Driguez, H.; Samain, E., Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing Helicobacter pylori alpha 1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered Escherichia coli cells. *Angewandte Chemie-International Edition* 2006, 45 (11), 1778-1780.
- 54. Hout, M. S.; LeJeune, K. E.; Schaack, T. M.; Bristow, D. K.; Federspiel, W. J., Specific removal of anti-A and anti-B antibodies by using modified dialysis filters. *Asaio Journal* **2000**, *46* (6), 702-706.
- 55. Solovan, J. C.; Oh, H. I.; Alikhani, A.; Gautam, S.; Vlasova, K.; Korchagina, E. Y.; Bovin, N. V.; Federspiel, W. J., Synthetic blood group antigens for anti-A removal device and their interaction with monoclonal anti-A IgM. *Transplant Immunology* **2006**, *16* (3-4), 245-249.
- Gautam, S.; Korchagina, E. Y.; Bovin, N. V.; Federspiel, W. J., Monoclonal anti-A antibody removal by synthetic a antigen immobilized on specific antibody filters. *Biotechnology and Bioengineering* 2008, 99 (4), 876-883.
- 57. Alikhani, A.; Korchagina, E. Y.; Chinarev, A. A.; Bovin, N. V.; Federspiel, W. J., High Molecular Weight Blood Group A Trisaccharide-Polyacrylamide Glycoconjugates as Synthetic Blood Group A Antigens for Anti-A Antibody Removal Devices. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 2009, 91B (2), 845-854.
- 58. Gautam, S.; Korchagina, E. Y.; Bovin, N. V.; Federspiel, W. J., Clinical Device-Related Article Specific antibody filter (SAF) binding capacity enhancement to remove anti-A antibodies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 2010, 95B (2), 475-480.
- 59. Zhang, Y. L.; Yao, Q. J.; Xia, C. F.; Jiang, X.; Wang, P. G., Trapping norovirus by glycosylated hydrogels: a potential oral antiviral drug. *Chemmedchem* **2006**, *1* (12), 1361-+.
- Slaney, A. M.; Dijke, I. E.; Jeyakanthan, M.; Li, C. S.; Zou, L.; Plaza-Alexander, P.; Meloncelli, P. J.; Bau, J. A.; Allan, L. L.; Lowary, T. L.; West, L. J.; Cairo, C. W.; Buriak, J. M., Conjugation of A and B Blood Group Structures to Silica Microparticles for the Detection of Antigen -Specific B Cells. *Bioconjugate Chemistry* 2016, 27 (3), 705-715.

61. Daskhan, G. C.; Tran, H. T. T.; Meloncelli, P. J.; Lowary, T. L.; West, L. J.; Cairo, C. W., Construction of Multivalent Homo-and Heterofunctional ABO Blood Group Glycoconjugates Using a Trifunctional Linker Strategy. *Bioconjugate Chemistry* 2018, 29 (2), 343-362.

### 第二章 ABO 式血液型糖鎖抗原の合成

#### 2-1 ABO 式血液型糖鎖抗原(Type Ⅱ)の合成計画

血液型糖鎖(Type Ⅱ)の合成報告は第一章で述べた通り、多くのグループによって報告され ている. しかしながら, 2糖骨格の構築後に保護基を変更して合成を進めており,多工程を要 する報告にとどまっていた. そこで本研究において, 筆者は H 抗原保護体である3 糖構造を共 通中間体に設定し, 直交型保護基を用いることでより効率的に, 短工程で骨格構築を行う, 還元 末端より糖鎖を伸長するルートでの ABO 式血液型糖鎖抗原の合成を立案した(Figure 2-1).グ ルコサミニルアクセプターとして2位アミノ基を2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル(Troc) 基で保護した 76 を用いた<sup>1</sup>. ガラクトシルドナー77 は直交型保護基として,2位に Fmoc 基を 導入することで、隣接基関与によるβグリコシル化の立体制御を狙い<sup>2-5</sup>,3位はTBS 基で保護 することで,A抗原,B抗原をそれぞれ作り分けられるように設計した.まず,76と77をグリ コシル化し,得られた2糖78のFmoc基を除去した後,フコシルドナー79°を導入して,共通中 間体 80 を合成する. 化合物 80 の保護基を除去することで H 抗原 84 を合成できる. さらに共通 中間体 80 に対して、ガラクトサミニルドナー167 をグリコシル化、保護基を除去することで A 抗原 81 へ, ガラクトシルドナー82<sup>8</sup>をグリコシル化,保護基を除去して B 抗原 83 へとそれぞれ 導く. 化合物 16 の 2 位にはアジド基を用い, 化合物 82 は 4, 6-O-ベンジリデン骨格を用いるこ とで、それぞれグリコシル化におけるα選択性を誘導することとした. 各糖鎖保護体は還元末端 を Allyl 基として合成を進め、適時除去可能な構造としておくことで、将来における抗原全骨格 の構築や,誘導体の合成にも展開できる.本合成計画において各糖鎖骨格は,のちの生物活性試 験に備えて還元末端にカルボン酸を導入しておく.



Figure 2-1 ABO 式血液型糖鎖抗原(Type II)の合成計画

### 2-2 ガラクトシルドナー77の合成

D-ガラクトース (85) を原料としてガラクトシルドナー77 を合成した (Figure 2-2). 無水酢酸を用いて D-ガラクトース (85) のすべてのヒドロキシ基をアセチル化し,得られた 86 を三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O)の存在下,*p*-トルエンチオールで処理することでチオ糖 87 へと誘導した.この際,2位アセチル基の隣接基関与により,β体のチオ糖 87 のみが得られた.さらに,アセチル基を除去して 88 とし,続いて 4,6 位をベンジリデンアセタールで保護することで,89 を得た.ここで3 位選択的な TBS 化を検討した (Table 1).まず,2,6-Lutidine 存在下,TBSOTf を用い,ジクロロメタン中で反応を行ったところ,目的の3 位 TBS 保
護体 90 のほかに、2 位に TBS 基が導入された 91 の生成が確認された(Entry 1). そこで、溶媒 を検討した(Entries 2, 3, 4). その結果、DMF を用いることで、完全な選択性で TBS 基を 3 位に 導入することができ、目的の 90 を収率 97%で得た(Entry 4). 続いて、90 の 2 位に Fmoc 基を 導入し、得られた 93 の 4, 6-O-ベンジリデンをボランーテトラヒドロフラン錯体(BH<sub>3</sub>·THF)、 ジブチルボリルトリフルオロメタンスルホナート(Bu<sub>2</sub>BOTf)を用いて 6 位選択的に切断する<sup>9</sup> ことで、目的物 94 を高収率で合成できた.得られた 94 の 6 位をベンゾイル化し、ガラクトシ ルドナー77 へと誘導した.



Figure 2-2 ガラクトシルドナー77 の合成

## 2-3 H抗原 84 の合成

共通中間体である H 抗原保護体 96 を合成した(Figure 2-3). ガラクトシルドナー77 とグルコ サミニルアクセプター76 を, NIS, TfOH を活性化剤として用いてグリコシル化し, 2 糖 78 を 76%で得た. 2 糖 78 の Fmoc 基を 20%トリエチルアミンで除去した. 続いて,得られた 95 とフ コシルドナー79 をグリコシル化し,化合物 80 を 88%で得た.得られた 80 を 30% HF・Pyridine で処理することで、TBS 基を除去し、共通中間体 3 糖 96 を 86%の収率で合成した.



Figure 2-3 共通中間体-H抗原保護体 96 の合成

H 抗原 84 を合成した (Figure 2-4). 共通中間体 3 糖 96 の Troc 基を Zn-Cu を用いて除去した 後, アセチル基を導入した. この際, ガラクトース 3 位の遊離のヒドロキシ基も同時に Ac 化さ れた. 続いて, オレフィンメタセシス反応により, 97 の還元末端の Allyl 基に対し, Methyl Acrylate を導入した. Grubbs 第二世代触媒を 20 mol%用いて, 50 ℃ で反応を行い, 98 を 40%で得た. 化合物 98 を, パールマン触媒を用いた水素添加の条件に付し, Bn 基を除去して 99 を得た. 最 後に LiOH で処理することでアシル系保護基, メチルエステルを加水分解し, H 抗原 84 の合成 を達成した.



Figure 2-4 H 抗原 84 の合成

2-4 A 抗原 81 の合成

A 抗原 21 を合成した(Figure 2-5). 共通中間体 3 糖 96 に対し,別途合成したガラクトサミニ ルドナー16 を,AgClO4を活性化剤として用いてグリコシル化することで,A 抗原保護体 100 を 90%の収率で合成した.続いて,Zn-Cuを用いて,Troc 基の除去とN3 基の還元を同時に行った のち,Ac 化することで,101 を 75%の収率で得た.さらに,H 抗原 84 の合成と同様にオレフィ ンメタセシス反応を経て 102 へと誘導し,パールマン触媒を用いた水素添加,続く塩基性条件 でのアシル系保護基,メチルエステルの加水分解を経て,A 抗原 81 の合成を達成した.



Figure 2-5 A 抗原 81 の合成

## 2-5 B抗原 83 の合成

B 抗原 83 を合成した (Figure 2-6). 共通中間体 3 糖 96 に対し, ガラクトシルドナー82 をグリ コシル化することで, B 抗原保護体 104 を 91%の収率で合成した. 続いて, Zn-Cu を用いた Troc 基の除去, Ac 化を行い, 105 を 99%の収率で得た. さらに, Methyl Acrylate とのオレフィンメ タセシス反応により, 106 を得, Pd(OH)<sub>2</sub>を用いた水素添加, 続く塩基性条件でのアシル系保護 基,メチルエステルの加水分解を経て, B 抗原 83 の合成を達成した.



Figure 2-6 B 抗原 83 の合成

2-6 結論

筆者はすべてのグリコシル化反応を高収率,かつ完全な立体選択性で制御し,ABO 式血液型 糖鎖抗原(Type II) 81,83,84の効率合成を達成した(Figure 2-7).筆者は,直交型保護基で ある Fmoc 基と TBS 基を用いることで,ルート途中での保護基の改変を行うことなく,短工程 で糖鎖骨格の構築を行った.また,これらの糖鎖が共通3糖構造を持つことに着目し,共通中 間体96を設定することで,目的糖鎖81,83,84を効率的に合成した.これらの糖鎖81,83, 84 は,還元末端にカルボン酸を導入しており,以降の生物活性試験のための誘導体を容易に合 成できる.



**Figure 2-7** 合成ルートまとめ

<参考文献-第二章>

- Tanaka, S.; Takashina, M.; Tokimoto, H.; Fujimoto, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K., Highly beta-selective mannosylation towards Man beta 1-4GlcNAc synthesis: TMSB(C6F5)(4) as a Lewis acid/cation trap catalyst. *Synlett* 2005, (15), 2325-2328.
- 2. Love, K. R.; Seeberger, P. H., Automated solid-phase synthesis of protected tumor-associated antigen and blood group determinant oligosaccharides. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43* (5), 602-605.
- 3. Werz, D. B.; Castagner, B.; Seeberger, P. H., Automated synthesis of the tumor-associated carbohydrate antigens Gb-3 and Globo-H: Incorporation of alpha-galactosidic linkages. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (10), 2770-+.
- Horlacher, T.; Oberli, M. A.; Werz, D. B.; Krock, L.; Bufali, S.; Mishra, R.; Sobek, J.; Simons, K.; Hirashima, M.; Niki, T.; Seeberger, P. H., Determination of Carbohydrate-Binding Preferences of Human Galectins with Carbohydrate Microarrays. *Chembiochem* 2010, *11* (11), 1563-1573.
- Sibold, J.; Kettelhoit, K.; Vuong, L.; Liu, F.; Werz, D. B.; Steinem, C., Synthesis of Gb3 Glycosphingolipids with Labeled Head Groups: Distribution in Phase-Separated Giant Unilamellar Vesicles. *Angewandte Chemie International Edition* 2019, *58* (49), 17805-17813.
- Wong, C. H.; Ye, X. S.; Zhang, Z. Y., Assembly of oligosaccharide libraries with a designed building block and an efficient orthogonal protection-deprotection strategy. *Journal of the American Chemical Society* 1998, *120* (28), 7137-7138.
- Paulsen, H.; Richter, A.; Sinnwell, V.; Stenzel, W., Darstellung selektiv blockierter 2-azido-2-desoxy-Dgluco- und -D-galactopyranosylhalogenide: reaktivität und 13C-NMR-spektren. *Carbohydrate Research* 1978, 64, 339-362.
- Zhang, Z. Y.; Ollmann, I. R.; Ye, X. S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C. H., Programmable onepot oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 1999, *121* (4), 734-753.
- 9. Jiang, L.; Chan, T. H., Borane/Bu2BOTf: A mild reagent for the regioselective reductive ring opening of benzylidene acetals in carbohydrates. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (5-6), 355-358.

第三章 アミノ糖含有糖鎖の効率合成を目指したジアセチルストラテジーの確立

天然に存在する糖鎖には*N-アセチルグルコサミンやN-アセチルノイラミン酸などのアミノ糖を* 含むものが多く,糖鎖の構造多様性の一端を担っている.そのため,アミノ糖の効率合成は糖鎖機 能の解明において重要である.アミノ糖は,天然において,アセトアミド(NHAc)体で存在する ものがほとんどである.この点に注目し,筆者の研究室では,NHAc基を持つアミノ糖含有糖鎖の 効率合成を可能とする合成戦略として,ジアセチルストラテジーを提唱している<sup>1,2</sup>(後述).一方 で,本手法はこれまで*N-アセチルノイラミン酸でのみ*検討されており,天然で最も豊富に存在す る*N-アセチルグルコサミン*含有糖鎖の合成には適用されていなかった.そこで,本章では,ジア セチルストラテジーを利用して*N-*アセチルグルコサミン含有のH抗原糖鎖を合成し,本手法の有 効性を検証した.

3-1 NHAc構造による反応性の低下とジアセチルストラテジー

NHAc 基を含むアミノ糖は分子間で水素結合を形成し、グリコシル化において反応性が低下 する<sup>1.8</sup>. Crich らは、グルコサミンフラグメントを用いたグリコシル化において、アジド体 110 やフタロイル体 111 は NHAc 体 109 と比べて高い反応性を示すことを報告した<sup>4</sup> (Figure 3-1). また、ジアセチルイミド (NAc<sub>2</sub>) 体 115、*N*-アセチル-*N*-ベンジル体 117 もグリコシル化におい て、NHAc 体 109 よりも高い反応性を示すことを報告している (Figure 3-2). さらに、*N*-アセチ ルグルコサミン 109 の <sup>1</sup>HNMR を異なる濃度・温度条件で測定し、アミドプロトンの化学シフ トが濃度・温度依存的に変化したことから、109 が分子間水素結合を形成していることを示し た. Crich らは、これらの結果から、NHAc 体は分子間水素結合を形成するために、反応性が低 いと結論付けた. また、2015 年には Auzanneau らも NHAc 基を含む 4 糖が、分子間水素結合を 形成することを <sup>1</sup>HNMR を用いて示した<sup>8</sup>.

42



Figure 3-1 Crich らによる GlcNAc-2 位の保護基による反応性検証



Figure 3-2 N,N-ジアセチル体 8, N-アセチル-N-ベンジル体 10 を用いたグリコシル化

Boons らは, 1998 年に *N*-アセチルノイラミン酸を用いたグリコシル化において, NHAc 体 119 に比べ, NAc<sub>2</sub>体 120 が劇的に高い反応性を示し, 収率が向上することを報告した<sup>3</sup> (Figure 3-3).



Figure 3-3 Boons らによる NAc2 基を用いた反応性向上

一方, 2008 年に Kononov らは, *N*-アセチルノイラミン酸 **130** が分子間水素結合を形成して いることを IR スペクトルにより示した<sup>5</sup>. 加えて,シアリル化反応において, NHAc 体 **130** を NAc<sub>2</sub> 体 **131** と混合して反応を行うことで反応性が向上することを見出した (Figure 3-4, Table, Entries 1, 2). これは, NAc<sub>2</sub> 体 **131** が NHAc 体 **130** の分子間水素結合を阻害し,反応性を向上さ せたものと考察した.



Figure 3-4 Kononov らによる N-アセチルノイラミン酸における反応性向上の検証

上記の通り、アミノ糖を含む糖鎖の合成において、アミノ基の保護基の選択は極めて重要で ある(Figure 3-5). これまでに、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル(Troc)基<sup>9,10</sup>、アリルオ キシカルボニル(Alloc)基<sup>11,12</sup>、トリクロロアセチル基<sup>13,14</sup>、トリフルオロアセチル(TFA)基 <sup>15</sup>、フタロイル(Phth)基<sup>16</sup>などのさまざまな保護基を用いた合成戦略が検討されてきた. これ らの保護基は、グリコシル化の反応性を担保し、隣接基関与などを介した立体選択性制御にも寄 与する. また、アジドをアミノ基の等価体とした合成も多数報告されている<sup>17</sup>. 一方、上記の保 護基を用いた合成戦略においては、最終段階において、脱保護、Ac 化のステップを経た NHAc 基への変換が必要で、ステップ数の増加を避けられない. 多糖合成の最終段階でのステップ数の 増加は、合成の効率化という観点からは望ましくない. また、脱保護後の化合物は高極性でその 取扱いが難しく、この官能基変換は低収率にとどまる場合も多い. さらに脱保護の際、フリーの アミノ基(-NH<sub>2</sub>)が露出するため、副反応の懸念も生じる.

9 <u></u>		
基質	反応性	天然体構造への変換
HO HO NHAC X	低い	必要なし
HO $R$ = NHTroc, NHAlloc, NPhth, N <sub>3</sub> , etc.	高い	脱保護, アセチル化の ステップを要し, 反応性 の高いアミンを経由する
HO NAC2 X	高い	塩基性条件下で 簡便に除去可能

Figure 3-5 アミノ基の保護基の選択

筆者の研究室ではアミノ基の保護基として NAc2基に着目し、これを利用した合成戦略(ジア セチルストラテジー)を提案している<sup>1,2</sup> (Figure 3-6). NAc2基は、水素結合ネットワークの形 成の原因となるアミドプロトンを持たず、高い反応性が期待できる. さらに、塩基処理により、 NAc2基の2つのアセチル基のうち、1つのみを選択的に切断することで、容易に NHAc 体へ変 換でき、糖鎖合成最終段階で煩わしい官能基変換を行う必要がない.



Figure 3-6 ジアセチルストラテジー

Zhou らは*N*-アセチルノイラミン酸を含む [2+2] グリコシル化による4糖合成において,*N*-アセチルノイラミン酸5位をNHAcからNAc<sub>2</sub>とすることで,反応性が劇的に向上することを報告した<sup>1</sup> (Figure 3-7). ここで用いた2糖ドナー133,2糖アクセプター134のNHAc 基はグリコシル化の反応点から離れているにもかかわらず,グリコシル化の反応性に大きく低下させた.このような遠隔位のNHAc 基の影響を示したのは,この例が初めてである.



Figure 3-7 Zhou らによるジアセチルストラテジーを用いた [2+2] グリコシル化

また, Nagasaki らも *N*-アセチルノイラミン酸を含むグリコシル化において,同様の効果を報告した<sup>2</sup>. ドナー**139** の NHAc を NAc<sub>2</sub> へと変換した **142** を用いることで,グリコシル化の反応性が大きく向上することを確認し,ジアセチルストラテジーを用いた *N*-アセチルノイラミン酸含有 12 糖の合成に至った (Figure 3-8, Entries 1, 2).



Figure 3-8 Nagasaki らによるジアセチルストラテジーを用いた [2+2] グリコシル化

これらの報告に基づき, 筆者は N-アセチルノイラミン酸含有糖鎖の合成に用いられてきたジアセ チルストラテジーを, N-アセチルグルコサミンへと適用し, その汎用性の拡大を試みた. N-アセ チルグルコサミンは天然に最も多く存在するアミノ糖であり, これに適用できれば, 多様な糖鎖の合 成に応用可能な合成戦略となりうる. 筆者は H 抗原の合成にジアセチルストラテジーを適用し, そ の有用性について検証した.

3-2 ジアセチルストラテジーを用いた H 抗原の合成計画

筆者は Figure 3-9 に示す H 抗原 151 の合成において,ジアセチルストラテジーの有効性を検 証する計画を立てた.グルコサミニルアクセプターとして NHAc 体 145 もしくは NAc<sub>2</sub>体 146 を 用いて,2 糖 147,148 を得,これに対して,フコシルドナー79 をそれぞれグリコシル化し,H 抗原保護体 149,150 を得る.これらのグリコシル化における反応性を比較する.さらに,150 を脱保護し,H 抗原 151 へと誘導する.



Figure 3-9 ジアセチルストラテジーを用いた H 抗原の合成戦略

3-3 NMR を用いた N-アセチルグルコサミンの分子間水素結合の検証

NAc<sub>2</sub>保護したグルコサミニルアクセプター146を合成した (Figure 3-10). Kusumoto らの報告に従って, *N*-アセチル-D-グルコサミン (152)をアリルアルコール中でクロロトリメチルシランを用いて Fisher グリコシド化することで1位にアリル基を導入した<sup>18</sup>. 続く4,6位をベンジリデンアセタール保護,3位ヒドロキシ基のベンジル保護を経て,153を3段階,27%で合成した<sup>19</sup>. 続いて,アリル基をオゾン分解したのち,得られたアルデヒドをPinnick酸化でカルボン酸へと変換し,ヨウ化メチルを用いてメチルエステル化することで154を得た.さらに,154の2位 NHAcを,塩化アセチルを用いて NAc<sub>2</sub>化し,収率93%で155を得た.最後に,BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>Oの存在下,トリエチルシランで処理することで4,6-O-ベンジリデンアセタールを4位選択的に開裂し,NAc<sub>2</sub>体のグルコサミニルアクセプター146を収率66%で合成した.

ー方,ジアセチルストラテジーの有効性検証のために,NHAc体 145 も合成した.上記の合成の中間体 154 の 4,6-O-ベンジリデンアセタールを 4 位選択的に開裂することで,目的の 145 を 収率 76%で得た.



Figure 3-10 GlcNAc アクセプターの合成

NAc<sub>2</sub>体 146 を用いた糖鎖骨格構築に先立ち,合成したグルコサミニルアクセプター145 が分 子間水素結合を形成するかを検証した(Figure 3-11).まず,1 mM,10 mM,50 mM の 145 の CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液を調整し,25 °C,-40 °C で <sup>1</sup>HNMR を測定した(Figure 4-10, i) ~iii),iv)~vi)).そ の結果,化合物 145 の濃度が高くなるにつれてアミドプロトンのピークは低磁場シフトした. さらに温度低下によるアミドプロトンの低磁場シフトも観測できた.この結果から,Crichらを 含む過去の報告例<sup>4,20-22</sup>と同様に,NHAc体 145 が分子間水素結合を形成することを示す結果を 得た.



Figure 3-11 NHAc 体 145 のアミドプロトンの温度・濃度依存的ピークシフト

ー方,前章で用いた Troc 保護体 76 についても 1 mM, 10 mM, 50 mM の CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液を調整し, <sup>1</sup>HNMR を測定した.その結果,76 においては,アミドプロトンの化学シフトは濃度にほとんど 依存的しなかった (Figure 3-12).これは Troc 基では,カルバメート構造による共鳴安定化の寄 与が大きく (Figure 3-13),アミドプロトンの水素結合ドナー性が低下し,分子間水素結合を形 成しづらいためであると考えている.



Figure 3-12 Troc 保護されたアクセプター76 のアミドプロトンのピーク変化



Figure 3-13 Troc 基の共鳴安定化

さらに, 筆者は, NHAc 体 145 と NAc2 体 146 の Diffusion-ordered two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (DOSY) を測定し,自己拡散係数の違いを検証した (Figure 3-14). DOSY とは、1992 年に Johnson らによって報告された、磁場勾配パルスを利用した二次元 NMR の一 種である<sup>23</sup>. DOSY スペクトルは, 横軸に化学シフト値, 縦軸に自己拡散係数 (D) が示される. 混合物の DOSY 測定を行うと、各分子の D の大小によって NMR スペクトルを分離し、解析 が可能である.そのため、多成分混合物の解析、分子量の見積もり、また、超分子などの大きさ の見積もりに使われることもある.ここでは、化合物145と146の自己拡散係数Dの見積もり に利用した. NHAc 体 145 と、NAc2 体 146 の 50 mM CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液を調整し、-40 ℃ でそれぞれ DOSY を測定した. その結果, NHAc 体 145 (赤) は, NAc2 体 146 (黒) より小さい自己拡散係 数を示した (Figure 3-12). さらに, 分子を球状と仮定する Stokes-Einstein の近似式<sup>24,25</sup>を適用 し、分子の実効体積を算出した. その結果、NHAc体 145の体積は 3.98×10<sup>-27</sup> m<sup>3</sup> (V<sub>145</sub>), NAc2 体 146 の体積は 3.31 × 10<sup>-27</sup> m<sup>3</sup> (V<sub>146</sub>)で,NHAc 体 145 は NAc<sub>2</sub> 体 146 より,1.2 倍大きい実効体 積を示した.これは NHAc 体が分子間水素結合を介した超分子構造を形成していることを示唆 する結果である.過去に Bahri, Nasr らによって,ニートの N-メチルアセトアミド溶液が三量 体のクラスターを形成することが推察されている<sup>26,27</sup>.この点を考慮すると、V<sub>145</sub>とV<sub>146</sub>の差は わずかではあるが、有意なものであると考えている. NHAc 体 145 の分子間で形成される水素結 合ネットワークは,NMRの時間スケール (≈10<sup>4</sup>秒)で速やかに組み換えが起きているものの, 平均として分子の実行体積の増加として DOSY で観測できたと考察している.これは、DOSY NMR 分光法による GlcNAc の超分子構造形成を初めて示した例である.



Figure 3-14 DOSY による自己拡散係数の検証

3-4 ジアセチルストラテジーを用いた H 抗原の合成

NHAc 体 145 と NAc<sub>2</sub>体 146 のグリコシル化における反応性を比較した.そのための基質として, まず,ガラクトシルドナー144 を合成した (Figure 3-15). "第 2 章 2-2 ガラクトシルドナー77 の合成"で得た 93 の 4,6-O-ベンジリデンアセタールを除去し,Ac 化することで目的の 144 を 73% で得た.



Figure 3-15 ガラクトシルドナー144 の合成

[1+1] グリコシル化を検討した (Figure 3-16). Entry 1 では, NHAc 体アクセプター145 を用い, ジクロロメタン中 NIS-TfOH 条件下でグリコシル化を行ったところ,0℃までの昇温が必要で,収 率は 24%にとどまった.一方, NAc<sub>2</sub> 体アクセプター146 を用いたところ,反応は-20℃で速やか に進行し,目的の2糖148を76%で得ることができた (Table 1, Entry 2).



**Figure 3-16** [1+1] グリコシル化による反応性の検証

得られた 2 糖 147, 148 を用いて, H 抗原 151 を合成した(Figure 3-17). NHAc 体 145, NAc<sub>2</sub> 体 146 の Fmoc 基を 20%トリエチルアミンで除去することで, 2 糖アクセプター156, 157 をそれぞれ得た. 続いて,得られた 156, 157 とフコシルドナー79<sup>28</sup>の[2+1] グリコシル化を検討した.活性化剤とし て NIS, TfOH を用いて 79 を活性化したところ,NHAc 体 156 との反応では,室温までの昇温が必要 で,3 糖 149 の収率は 45%と中程度にとどまった(Table 2 Entry 1).一方,NAc<sub>2</sub> 体 157 を用いたとこ ろ、反応は低温で速やかに進行し、目的の 150 を 83%の収率で得ることができた(Table 2, Entry 2). この結果から、グルコサミンにおいても *N*-アセチルノイラミン酸の場合と同様に、NHAc 基の NAc<sub>2</sub> 保護は、反応点から離れた場所であってもグリコシル化の反応性を大きく向上することが明らかとなった.

H 抗原保護体 150 を脱保護した. TBS 基をジフルオロトリメチルケイ酸トリス(ジメチルアミノ)スル ホニウム (TASF) を用いて除去したのち,塩基処理によりアシル系保護基とエステルを加水分解した. この際, NAc2基は,一つだけアセチル基が除去され,速やかに NHAc 構造を与えた.最後にベンジル 基をパールマン触媒によって除去することで,ジアセチルストラテジーを用いた H 抗原 151 の合成を 達成した.



Figure 3-17 H 抗原 151 の合成

3-5 結論

ジアセチルストラテジーを用いて血液型糖鎖 H 抗原 151 を合成した(Figure 3-18a). <sup>1</sup>HNMR スペクトルにおけるアミドプロトンの濃度依存的な化学シフト変化や, DOSY スペクトルによる自己拡散係数の値から, グルコサミンの NHAc 体 145 が分子間水素結合を形成していることを示す結果を得た. さらに, NHAc 基を NAc<sub>2</sub>として保護することでグリコシル化の反応性が大

幅に向上することを示し, H 抗原 151 の合成を達成した. NAc<sub>2</sub>保護は反応点から離れた場所で あっても有効であることから,本合成戦略の汎用性の高さを示した.本合成はジアセチルストラ テジーを *N*-アセチルグルコサミン含有糖鎖合成に適用した初めての報告である.

一方,筆者の研究室では,ジアセチルストラテジーを用いてα-gal 抗原の効率合成にも成功した<sup>29</sup>. 共同研究者の Sianturi は本戦略を用いたワンポット反応,並びにより簡便にスケールアッ プ可能なワンフローでの合成にジアセチルストラテジーを適用し,本手法により,反応性を大 幅に改善し,収率の劇的な向上に成功した (Figure 3-18b). この結果は,著者の開発したジアセ チルストラテジーの汎用性の高さを実証している.



Figure 3-18 ジアセチルストラテジーを用いた効率合成, (a) H 抗原, (b) α-gal 抗原

<参考文献-第三章>

- Zhou, J. Z.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K., Efficient Synthesis of the Disialylated Tetrasaccharide Motif in N-Glycans through an Amide-Protection Strategy. *Chemistry-an Asian Journal* 2016, *11* (9), 1436-1440.
- Nagasaki, M.; Manabe, Y.; Minamoto, N.; Tanaka, K.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K., Chemical Synthesis of a Complex-Type N-Glycan Containing a Core Fucose. *Journal of Organic Chemistry* 2016, *81* (22), 10600-10616.
- 3. Demchenko, A. V.; Boons, G. J., A novel and versatile glycosyl donor for the preparation of glycosides of N-Acetylneuraminic acid. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (19), 3065-3068.
- Crich, D.; Dudkin, V., Why are the hydroxy groups of partially protected N-acetylglucosamine derivatives such poor glycosyl accepters, and what can be done about it? A comparative study of the reactivity of Nacetyl-, N-phthalimido-, and 2-azido-2-deoxy-glucosamine derivatives in glycosylation. 2-picolinyl ethers as reactivity-enhancing replacements for benzyl ethers. *Journal of the American Chemical Society* 2001, *123* (28), 6819-6825.
- Kononov, L. O.; Malysheva, N. N.; Kononova, E. G.; Orlova, A. V., Intermolecular hydrogen-bonding pattern of a glycosyl donor: The key to understanding the outcome of sialylation. *European Journal of Organic Chemistry* 2008, 2008 (19), 3251-3255.
- Kononov, L. O.; Malysheva, N. N.; Orlova, A. V., Stereoselectivity of Glycosylation May Change During the Reaction Course: Highly alpha-Stereoselective Sialylation Achieved by Supramer Approach. *European Journal of Organic Chemistry* 2009, 2009 (5), 611-616.
- Kononov, L. O.; Malysheva, N. N.; Orlova, A. V.; Zinin, A. I.; Laptinskaya, T. V.; Kononova, E. G.; Kolotyrkina, N. G., Concentration Dependence of Glycosylation Outcome: A Clue to Reproducibility and Understanding the Reasons Behind. *European Journal of Organic Chemistry* 2012, 2012 (10), 1926-1934.
- Kuir, D.; Guillemineau, M.; Auzanneau, F. I., Aggregation of a Tetrasaccharide Acceptor Observed by NMR: Synthesis of Pentasaccharide Fragments of the Le(a)Le(x) Tumor-Associated Hexasaccharide Antigen. *Journal of Organic Chemistry* 2015, *80* (10), 5004-5013.
- Imoto, M.; Yoshimura, H.; Shimamoto, T.; Sakaguchi, N.; Kusumoto, S.; Shiba, T., Total synthesis of Escherichia-Coli lipid-A, the endotoxically active principle of cell-surface lipopolysaccharide. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1987, 60 (6), 2205-2214.
- Kusumoto, S.; Yoshimura, H.; Imoto, M.; Shimamoto, T.; Shiba, T., Chemical synthesis of 1dephospho derivative of Escherichia-Coli lipid-A. *Tetrahedron Letters* 1985, 26 (7), 909-912.
- Boullanger, P.; Banoub, J.; Descotes, G., N-Allyloxycarbonyl derivatives of D-glucosamine as promoters of 1,2-trans-glucosylation in Koenigs-Knorr reactions and in lewis acid-catalyzed condensations. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 1987, 65 (6), 1343-1348.
- Boullanger, P.; Jouineau, M.; Bouammali, B.; Lafont, D.; Descotes, G., The use of N-alkoxycarbonyl derivatives of 2-Amino-2-deoxy-D-glucose as donors in glycosylation reactions. *Carbohydrate Research* 1990, *202*, 151-164.
- 13. Wolfrom, M. L.; Bhat, H. B., Trichloroacetyl and trifluoroacetyl as N-blocking groups in nucleoside

synthesis with 2-amino sugars. Journal of Organic Chemistry 1967, 32 (6), 1821-&.

- 14. Blatter, G.; Beau, J. M.; Jacquinet, J. C., The use of 2-deoxy-2-trichloroacetamido-D-glucopyranose derivatives in syntheses of oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **1994**, *260* (2), 189-202.
- 15. Meyerzur.W; Wassilia.N, Glycosides of amino sugars .2. Synthesis of 2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranosides. *Chemische Berichte-Recueil* **1970**, *103* (6), 1792-&.
- 16. Lemieux, R.; Takeda, T.; Chung, B., Synthetic methods for carbohydrates. 1976.
- 17. Lemieux, R. U.; Ratcliffe, R. M., Azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1979**, *57* (10), 1244-1251.
- Izumi, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S., TMSC1 as a mild and effective source of acidic catalysis in Fischer glycosidation and use of propargyl glycoside for anomeric protection. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2002, 66 (1), 211-214.
- 19. Wakamiya, T.; Yamanoi, K.; Kanou, K.; Shiba, T., Synthesis of Dehydroxymethylbulgecin-A. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28* (47), 5887-5888.
- Fowler, P.; Bernet, B.; Vasella, A., A H-1-NMR spectroscopic investigation of the conformation of the acetamido group in some derivatives of N-acetyl-D-allosamine and -D-glucosamine. *Helvetica Chimica Acta* 1996, 79 (1), 269-287.
- 21. Vasella, A.; Witzig, C., Glycosylidene carbenes .22. alpha-D-selectivity in the glycosidation by carbenes derived from 2-acetamido-hexoses. *Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78* (8), 1971-1982.
- 22. Gellman, S. H.; Dado, G. P.; Liang, G. B.; Adams, B. R., Conformation-directing effects of a single intramolecular amide-amide hydrogen-bond variable-temperature NMR and IR studies on a homologous diamide series. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (4), 1164-1173.
- 23. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Diffusion-ordered 2-dimensional nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (8), 3139-3141.
- 24. Einstein, A., Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* **1905**, *322* (8), 549–560.
- 25. von Smoluchowski, M., Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik* **1906**, *326* (14), 756-780.
- Trabelsi, S.; Bahri, M.; Nasr, S., X-ray scattering and density-functional theory calculations to study the presence of hydrogen-bonded clusters in liquid N-methylacetamide. *Journal of Chemical Physics* 2005, *122* (2).
- Trabelsi, S.; Nasr, S.; Bahri, M.; Bellissent-Funel, M. C., Local order in fully deuterated liquid N-methylacetamide (C3D7NO) as studied by neutron diffraction and density-functional theory calculations. *Journal of Physical Chemistry B* 2006, *110* (49), 25021-25025.
- 28. Zhang, Z. Y.; Ollmann, I. R.; Ye, X. S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C. H., Programmable one-pot oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (4), 734-753.
- Tsutsui, M.; Sianturi, J.; Masui, S.; Tokunaga, K.; Manabe, Y.; Fukase, K., Efficient Synthesis of Antigenic Trisaccharides Containing N-Acetylglucosamine: Protection of NHAc as NAc2. *European Journal of Organic Chemistry* 2020, 2020 (12), 1802-1810.

第四章 IgM 抗体と血液型糖鎖の結合を制御する多価分子の創製

4-1 免疫グロブリンと IgM 抗体

抗体は免疫グロブリンと呼ばれるタンパク質で、異物となる抗原を認識し、補体系の活性化や オプソニン作用、エフェクター細胞の活性化、中和作用などを介して、生体防御における中心的 な役割を果たす. 抗体は軽鎖と重鎖がそれぞれ 2 本ずつ組み合わさった Y 字型の 4 本鎖構造を 持つ (Figure 4-1a). 抗原認識部位は可変領域と呼ばれ、認識対象の抗原に合わせて多様なアミノ 酸配列を取る. 一方、可変領域以外の部分は定常領域と呼ばれ、共通の配列を持つ.

抗体には5つのアイソタイプがあり, それぞれ IgG, IgA, IgM, IgD, IgE に分類される (Figure 4-1b).

IgG はヒト免疫グロブリンの 75%を占める分子量 150 kDa の単量体である. 血清中での寿命 が長く,受動免疫に最も有用である. ヒト IgG は IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の 4 つのサブクラス がある. 選択的 IgG サブクラス欠損症は 1 つ,もしくは複数のサブクラスの欠損あるいは低下 によって感染症を繰り返す. IgG1 の欠損は,低ガンマグロブリン血症の兆候を示す. 最も一般的 な IgG2 欠損の場合,莢膜(きょうまく)に対する抗体が含まれていることもあり,莢膜をもつ 肺炎球菌やインフルエンザ菌等による感染症(中耳炎,肺炎,下気道感染等)を繰り返すことが ある. 成人に多い IgG3 欠損症は副鼻腔炎,下気道感染,中耳炎を繰り返すといった特徴がある.

IgA はヒト免疫グロブリンの 15%を占める分子量 160 kDa(単量体) もしくは 320 kDa(分泌性,二量体)の抗体である.二量体である分泌型 IgA は、粘膜分泌物(例:唾液,涙など)中に 豊富に存在し,リゾチームとともに働くことで,細菌細胞壁中の糖鎖を加水分解し,感染を未然 に防ぐ.ヒト IgA は IgA1, IgA2 の 2 つのサブクラスがある.

IgM はヒト免疫グロブリンの 10%程度を占め、その分子量は 900 kDa である.単量体の抗体 がジスルフィド結合とJ 鎖を介して5量体構造を取っている. IgM 抗体は侵入した微生物上の抗 原を認識し、中和作用を発揮する.その後、補体系の活性化やマクロファージによる貪食を誘導 する. IgG が血中安定性に優れているのに対し、IgM は半減期が5日程と短い.

IgD, IgE は他の抗体と比べて存在比率は低く,分子量 180~200 kDa の単量体である. IgE 抗体は主にアレルギー反応に関連する.一方, IgD 抗体の機能は未だに不明である.

60



**Figure 4-1** (a) 抗体の構造 (b) 抗体のサブタイプ

免疫グロブリンは無脊椎動物にはなく、軟骨魚類以降の脊椎動物に存在し、生物ごとにいく つかのアイソタイプを持つが、その種類は綱ごとに異なる<sup>1</sup>. 興味深いことに、IgM のみがすべ ての生物で共通に存在する. このことからも IgM の重要性が分かる. 感染初期には IgM 抗体の 抗体価が上がり、その後に IgG 抗体にクラススイッチする. つまり IgM 抗体の増加は病原体への 曝露の兆候ともいえる. また、IgM は、ウイルスなどの中和作用に優れ、補体系を効率的に活性 化できることから、病原体に対する初期免疫応答において、中心的な役割を持つ. IgM は単量体 構造が正五角形様に5量体を組んで存在するといわれてきた. しかしながら、近年、その構造は 歪んだ5量体構造で、J 鎖部分に空洞があることが、東京大学の宮崎、新井らによって報告され た<sup>2</sup>. 2019 年にはクライオ電顕によって補体と結合した状態の構造が解かれ<sup>3</sup>、その詳細な構造 解析が進みつつある<sup>47</sup>.

筆者は、血液型糖鎖を用いた生体機能制御を目指し、血液型糖鎖に対する IgM 抗体と高い親 和性を有する多価分子の合成、ならびにその機能解析を検討した.

61

## 4-2 多価効果を再現できる糖鎖デンドリマーの設計

第一章で述べた通り,糖鎖の活性発現には,多価効果が非常に重要な役割を果たす.生体系 では細胞表面に無数の糖鎖が存在し,各々の糖鎖と糖鎖認識分子の相互作用は弱くても,総和 として生物活性を制御する相互作用につながる<sup>8,9</sup>.この多価の相互作用を再現することで,糖 鎖機能を効率的に制御できる.このような多価分子材料として,多価骨格(カリックスアレーン <sup>10-13</sup>やシクロデキストリン<sup>14-16</sup>,シクロペプチド<sup>17-20</sup>など<sup>21</sup>)やポリマー<sup>22-25</sup>,リポソーム<sup>26</sup>,デ ンドリマー<sup>27-31</sup>,ナノ粒子<sup>32,33</sup>,自己集積体<sup>34-36</sup>など,多岐にわたるマテリアルの利用が検討さ れてきた.さらに,その活性評価には,表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance, SPR) 分析法や,等温滴定カロリメトリー(Isothermal Titration Calorimetry, ITC),血球凝集試験 (Hemagglutination assay, HA), ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法などが用いら れ,これらの測定から複数の多価結合様式のモデルが提唱されている(Figure 4-2)<sup>25,37-53</sup>.代表 例としては,複数の抗原認識部位に同時に結合するキレートモデル(Figure 4-2a)や,複数の受 容体のクラスター化(Figure 4-2b),近傍の相互作用を利用する結合モデル(Figure 4-2c),抗原 が解離と結合を繰り返す再結合モデル(Figure 4-2f) などが推定されている.



Figure 4-2 多価分子の結合様式モデル

また、IgM 抗体は抗原結合部位を 10 個持つ一方で、個々の結合部位と抗原との親和性は低く、 多価の相互作用により高いアビディティーを発現する <sup>54,55</sup>.また、IgM の結合価は抗原の分子量 に依存する <sup>56,57</sup>.1972 年に Carel J.Van Oss らは、MW 数百程度の低分子抗原であれば 10 価、 MW = 7,000~500,000 程度で 5 価以下、MW = 1,870,000 では 2~3 価であると報告している <sup>56</sup>. 筆者は、血液型糖鎖に対する IgM 抗体の高親和性リガンドを創製するために、血液型糖鎖のデ ンドリマーを設計・合成した.デンドリマーは化学合成によって調製可能で、担持量を正確に制 御した均一な物質として調製できる.理化学研究所の田中らは、自己活性型クリック反応を用い た効率的なポリリジンデンドリマーの合成を報告している(Figure 4-3) <sup>58,59</sup>.本手法では、アル キン近傍に導入したベンジルヒスチジンに銅イオンが配位し、近接効果により銅触媒を用いる アジドとアルキンとの環化付加反応(Cu-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition, CuAAC)反応<sup>60,</sup> <sup>61</sup>を加速する.ここでは,糖鎖の還元末端にアジドを有するリンカーを導入し,本手法で血液型 糖鎖担持デンドリマーの合成を行うこととした.また,今回筆者は IgM の抗原認識部位に対し, 十分量の抗原を提示できる 16 量体のデンドリマーを用いた.



Figure 4-3 16 量体デンドリマー骨格と自己活性化型クリック反応

IgM の構造をもとに血液型糖鎖導入デンドリマーを精密に設計した. IgM 抗体は直径 290 Å 程度の分子サイズ<sup>62</sup>で,各々の抗原結合部位間の距離は 60~80 Å である (Figure 4-4a). 筆者は Figure 4-2a, d で示したキレーションモデルと再結合モデルでの多価効果発現を指向したデンド リマーを設計した (Figure 4-4b). 再結合モデルでは,一か所の抗原結合サイトにおいて,解離・ 再結合を繰り返す.そのため,デンドリマー上の糖鎖密度が重要である.一方,キレーションモ デルでは,複数の抗原結合サイトにおいて,同時に相互作用する必要がある.そのため,デンド リマーが同時にカバーできる結合サイトの数が重要である.このような指針をもとに,リンカー のサイズを変えたデンドリマー158-160 を設計した. デンドリマー158 のサイズは IgM 抗体の各 抗原結合サイト間の距離よりも小さく,同時に複数の結合サイトを埋めることはできず,キレー ションモデルでの多価効果は得られない. 一方で,比較的小さなサイズのデンドリマーに 16 個 の糖鎖を担持できることから,デンドリマー上の糖鎖密度は高く,再結合モデルは有効に機能す ると推測できる. これに対し, 159 は 2-3 個, 160 はほぼすべての抗原結合サイトと同時に相互 作用できるサイズで,キレーションモデルによる多価効果が期待できるが,サイズが大きくなる につれて再結合モデルでの多価効果獲得は不利に働く. これらのデンドリマー158-159 と IgM 抗 体の相互作用を解析することで,デンドリマーの分子設計の指針を明確に示すことを目的とす る.



(b)





**Figure 4-4** (a) IgM 抗体のサイズ, (b) 糖鎖デンドリマーの設計

## 4-3 糖鎖デンドリマーの合成

B 型糖鎖抗原 83 に 3 種類のリンカー161, 162, 163 を導入し,サイズの異なるデンドリマー 158, 159, 160 を合成した (Figure 4-5).まず, 83 を TSTU で処理し,活性エステル化し, 3-ア ジドプロピルアミン (161) (C3 リンカー), Amine-PEG11-Azide (162) (PEG11 リンカー), Amine-PEG35-Azide (163) (PEG35 リンカー) をそれぞれ反応させ,糖鎖―リンカー複合体 164, 165, 166 を合成した.続いて,自己活性型クリック反応によりデンドリマーに誘導した.反応は良好 に進行し,目的物をそれぞれ 72% (C3 リンカー体 158), 39% (PEG11 リンカー体 159), 59% (PEG35 リンカー体 160) で得た. <sup>1</sup>HNMR においてδ=9.0 付近のデンドリマー骨格内に存在す るベンジルヒスチジンのプロトンと,δ=8.0 付近にクリック反応によって生成するトリアゾー ル骨格内のプロトンの積分値の比から,望む 16 量体が得られたことを確認した (Figure 4-6).



Figure 4-5 デンドリマーの合成



Figure 4-6 <sup>1</sup>HNMR を用いた糖鎖導入量の確認

4-4 表面プラズモン共鳴分析法による糖鎖デンドリマーと IgM 抗体の親和性評価

続いて,表面プラズモン共鳴(SPR)分析法による糖鎖デンドリマー158,159,160と IgM 抗体間の相互作用解析を試みた.SPR 分析法はセンサーチップ上に固定した分子に対して相互作用する分子(アナライト)を流すことで,その親和性や結合速度を求めることができる.得られた値から結合モデルに合わせて結合速度定数や解離速度定数を算出し,その相互作用を定量的に評価可能である.

今回筆者は、Cytiva 社の Biacore T200 を用いてデンドリマーによる抗原抗体反応を測定した(Figure 4-7). 分子量約 900 kDa の抗 B 型抗原抗体 (クローン: Z5H-2) をアミンカップリング

法によって、カルボキシメチルデキストラン層を有する CM5 センサーチップ上に固定化した. センサーチップ上でアナライトの添加終了後、デンドリマーが近接位の IgM 抗体と次々相互作 用を示す疑似的な再結合モデルを再現することを狙い、IgM を高密度で固定化することとした. 固定化後のセンサーチップのレスポンス強度は 10129 RU を示した.これに対し、マルチサイク ル法による相互作用解析を行った.



Figure 4-7 SPR 測定

まず初めに,第2章で合成したB型糖鎖抗原の単量体83とIgMの相互作用を測定した(Figure 4-8a). その結果,測定濃度10-1000µMにおいて有意な結合を示さず,親和性が非常に弱いことが分かった. 続いて,各サイズの16量体糖鎖デンドリマー158,159,160をアナライトとして用いて測定した結果,測定濃度0.1-10µMにおいて,IgM抗体と明確な相互作用を示した(Figure 4-8b~c). 結合様式を1:1 binding であると仮定し,キネティクス解析を行ったところ,解離定数(Kp値)はC3リンカー体158で6.330×10<sup>-7</sup>, PEG11リンカー体159で3.836×10<sup>-7</sup>,
PEG35 リンカー体 160 で 1.093×10<sup>-6</sup> であった (Figure 4-9). 結合速度定数 (k<sub>on</sub>) と解離速度定数 (k<sub>off</sub>) において PEG11 リンカー体 159 がわずかによい値を示した. ここで, 各デンドリマーの 10 µM サンプルによるセンサーグラムについて, 100 s 時点でのレスポンス強度から, IgM 1 分 子あたりのデンドリマーの結合量を概算したところ, C3 リンカー体 158 では 0.19 個, PEG11 リ ンカー体 159 では 0.36 個, PEG35 リンカー体 160 では 0.06 個であった. このように, 比較的サ イズの小さいデンドリマーが IgM に対して多く結合していることが分かる.





Figure 4-8 糖鎖デンドリマーによるセンサーグラム (a) B型抗原単量体, (b) C3 リンカー体,
 (c) PEG11 リンカー体, (d) PEG35 リンカー体

リンカー構造	К <sub>р</sub>	k <sub>on</sub>	k <sub>off</sub>
C <sub>3</sub>	6.330 ×10 <sup>-7</sup>	2094	1.325 ×10 <sup>-3</sup>
PEG11	3.836 ×10 <sup>-7</sup>	2570	9.861 ×10 <sup>-4</sup>
PEG35	1.093 ×10⁻ <sup>6</sup>	2160	2.361 ×10 <sup>-3</sup>

Figure 4-9 1:1 binding 仮定時の解離定数 KD, 結合速度定数 kon, 解離速度定数 koff

デンドリマーの結合,解離モデルについて推定を行った.2009年にRiguera, Femandez-Megia ら はデンドリマーの SPR 分析において,多価分子の解離が2段階のフェーズからなるモデルを提唱 している<sup>50,51</sup>.第一フェーズでは単糖分子同様,1価で相互作用している多価分子が放出される. そして第二フェーズにおいてはリガンドと多価で相互作用している分子のみが残り,解離速度が 劇的に遅くなる.この過程でアナライト分子は近接位に存在する別のリガンドと再結合し,その 結果としてセンサーグラムの減衰曲線が1:1 bindingの理想曲線から外れる.この解釈に基づくと, 今回得られたセンサーグラムでは, ~300s程度までは1価で相互作用していたデンドリマーが乖 離しており,センサーグラムの急激な減衰が観測されている.一方,それ以降では相互作用がプ ラトーに近づいており,これは,センサーチップ上で,リガンドとアナライト(デンドリマー)が 多価で相互作用し,解離と再結合が生じていると考えている.本測定では高密度で IgM 抗体を固 定化しているため,単量体についても似たようなセンサーグラムが得られている.しかしながら そのレスポンス強度は非常に弱く,加えて減衰の傾きも大きく,解離速度が早いことから,単量 体は解離後,再結合を起こすことはできていないと推測できる.これらの結果からデンドリマー 骨格を用いることで多価効果によって親和性が増強されることは明確に示された.さらに再結合 モデルを考慮した設計が,デンドリマー骨格による多価効果を得るのに有用であることを示した.

### 4-5 糖鎖デンドリマーを用いた血球凝集阻害試験

続いて血球凝集阻害試験(Hemagglutination inhibition assay, HIA)を用いて糖鎖デンドリマー 158, 159, 160と血中の抗血液型抗体との相互作用を検証した.血球凝集試験(HA)は一般に 赤血球が,抗体,レクチン,ウイルスなどにより凝集する反応を測定する手法である.HAには 直接凝集反応と間接血球凝集反応があり,前者は直接赤血球同士を凝集させる反応で,血液型 判定などに用いる.後者は肉眼で観測できない抗原抗体反応を目視できるようにするための手 法で,抗原もしくは抗体を特定の物質に担持させ,凝集の形で観測可能にする.一方,HIA で は,HAの阻害を指標として,凝集活性を持つ分子やウイルスに対する親和性を測定する.赤血 球と抗血液型糖鎖抗体の反応を例にとると,抗体を加えない場合には,赤血球の凝集が起こら ず,well中央に血球の赤い沈降が見られる.これに対し,抗体を加えると血球が凝集し,well中 央に赤い沈降は生じない(Figure 4-10).本研究では,ここに糖鎖デンドリマー158,159,160を 加えて,その凝集阻害活性を測定することで,糖鎖デンドリマーと抗体の親和性を評価した.



Figure 4-10 赤血球凝集阻害試験

血液型 B+のヒト全血より赤血球成分を単離し、PBS buffer によって希釈することで 2% (v/v) 赤血球 (B+) 液を調製した. V 底 96 well プレートに各 16 量体糖鎖デンドリマー158, 159, 160 および B 型糖鎖単量体 83 の希釈系列を作製し, 抗 B 型抗原抗体を有する各血液型 (A+, O+) の血漿 (抗凝固剤として CPD を含む)を添加した. ここに 2% (v/v) 赤血球 (B+) 液を加え, 25 分室温でインキュベートした後, 血球凝集の有無を確認した (Figure 4-11a, b). B 抗原単量体 83 の阻害活性は非常に弱く, 高濃度まで阻害がかからなかった (Figure 4-11a, b, c Lane 1). ま た, デンドリマー158 では, ヒト血漿を用いた HIA において, 高濃度で血球凝集阻害が観測で きず, 分散した (Figure 4-11a, b Lane 2). この理由は不明であるが, 下記で抗 B 型抗原抗体を用 いた実験ではこのような現象は観察できなかった (Figure 4-11c Lane 2) ことから, 血漿中の夾 雑物と 158 の相互作用が原因であると考えている. 一方, 159, 160 は凝集阻害活性を有し, A+, O+のどちらの血漿を用いた場合も 159 の方が低濃度で阻害が観測できた (Figure 4-11a, b Lane 3). ただし, その差は A+に比べ, O+の血漿を用いた場合に顕著であった (Figure 4-12).

血液型抗体は血中に IgG, IgA, IgM のアイソタイプが存在し,主成分は IgM であるが, O+の 血漿中の抗血液型抗体に関しては IgG の割合が多いという報告もある<sup>63-67</sup>. さらに O+の血漿中 においては IgA, IgG にも活性が認められており, IgG のサブクラスは IgG1 であることがわか っている.対象的に A, B 型血清中では IgM 抗体のみに活性がある<sup>68</sup>. これを踏まえると, 今 回の結果は抗体のアイソタイプによってデンドリマーとの親和性に違いがあることを示唆している. IgG 抗体は IgM 抗体と比ベサイズが小さく,抗原認識部位間の距離も近く,抗原認識部位数も2個と少ない.そのため,IgG 抗体との相互作用はより再結合モデルが重視されると考えられる.最もサイズの大きい PEG35 リンカー体 160 は抗体と結合しても,糖鎖抗原の局所濃度に乏しく,再結合モデルを取ることができず,IgG 抗体との相互作用においてサイズの小さいデンドリマーとの活性の差がより顕著に表れたものと考えている.

さらに抗 B 型抗原抗体 (クローン: HEB-29, Supernatant)を用いて、同様の血球凝集阻害試験を行った(Figure 4-11c). この場合は、158 においても血球の沈降が確認でき、すべてのデンドリマーによる凝集阻害が確認できた(Figure 4-11c Lane 2~4). 用いたデンドリマーのうち、159、160の2種が高い阻害活性を示した(Figure 4-12). この結果からも IgM 抗体との相互作用においてはキレーションモデルもある程度有効に働くため、その活性の差は4倍程度にとどまったと推定出来る.





Figure 4-11 糖鎖デンドリマーを用いた赤血球凝集阻害試験

Lane 1: B 抗原単量体 83, Lane 2: C3 リンカー体 158, Lane 3: PEG11 リンカー体

- **159**, Lane 4: PEG35 リンカー体 160
  - (a) ヒト血漿 A+ (Lane 1 の希釈倍率 2<sup>0</sup>の well は 16.7 μM, Lane 2~4 は 3.0 μM の サンプルを使用)
  - (b) ヒト血漿 O+ (Lane 1 の希釈倍率 2<sup>0</sup>の well は 16.7 μM, Lane 2~4 は 3.0 μM の サンプルを使用)
  - (c)抗B型抗原抗体 (HEB-29)(Lame 1の希釈倍率 2<sup>0</sup>は 25 μM, Lane 2~4 は 0.25 μMのサンプルを使用)

	ヒト血漿 A+	ヒト血漿 O+	抗 B 型抗原抗体 (HFB-29)
Lane 1 (B 抗原単量体 <b>83</b> )	1.7×10 <sup>-5</sup>	N. D.	7.8×10 <sup>-7</sup>
Lane 2 (C3 リンカー体 <b>158</b> )	N. D.	N. D.	4.9×10 <sup>-10</sup>
Lane 3 (PEG11 リンカー体 <b>159</b> )	3.8×10 <sup>-7</sup>	5.9×10 <sup>-9</sup>	4.9×10 <sup>-10</sup>
Lane 4 (PEG35 リンカー体 <b>160</b> )	1.5×10 <sup>-6</sup>	1.9×10 <sup>-7</sup>	2.0×10 <sup>-9</sup>

Figure 4-12 HIA における各化合物の阻害濃度(単位はすべて M)

以上の結果から、ヒト血漿、並びに抗B抗原抗体を用いたHIAにおいて各デンドリマー158-160は活性を示し、中程度のサイズを持つ159が最も高い阻害活性値を示した.これはデンドリ マーの結合モデルである、再結合モデルとキレーションモデルの双方の効果を得ることができ たためであると考えている.また、サイズが小さく、再結合モデルのみを再現する158を用い た抗B抗原抗体(HEB-29)とのHIAにおいて、低濃度まで阻害活性を確認できた.これはSPR の結果と同様に、デンドリマー骨格によって多価効果を維持するためには、再結合モデルの寄 与を考慮した設計が重要であることを示すものである.

4-6 結論

筆者は IgM 抗体の抗親和性リガンドを創製するために、血液型糖鎖を用いてデンドリマーを 精密に設計し、その性能を評価した. IgM 抗体のサイズと抗原認識部位の距離を考慮し、多価 分子の結合モデルを踏まえて 3 種類のデンドリマーを設計した. これらのデンドリマーを自己 活性化型クリック反応を用いて合成し、16 量体デンドリマー158, 159, 160 を合成した.

SPR による IgM 抗体との親和性評価の結果, PEG11 リンカー体 159 がよい親和性を示した.

さらに、HIA によって各糖鎖デンドリマーによる血球凝集阻害を確認した.用いたデンドリマ -158-160 はすべて血球凝集阻害活性を示すものの、サイズの小さいデンドリマー158、159 が特 に良好な阻害活性を示したことから、本アッセイ系においては、再結合モデルの寄与が大きいこ とを確認した.SPR の結果と合わせて、中程度のサイズである 159 が今回合成したデンドリマ ーの中で、最も有効に多価効果を発現できるマテリアルであると結論付けた.これは、159 と IgM 抗体の相互作用においては、再結合モデルとキレーションモデルの両方が有効に機能する ためであると考えている.また、サイズの大きい160 は比較的親和性が低く、デンドリマーを多 価分子骨格に用いる際の、糖鎖局所濃度の重要性が明らかとなった.

以上の結果からデンドリマー骨格を用いた多価分子の設計においては、糖鎖の局所濃度を高 く維持することが非常に肝要である.すなわち多価分子の再結合モデルを再現するため、デンド リマー上の抗原密度を担保することが重要であるという分子設計の指針を明らかとした. <参考文献-第四章>

- 1. Stavnezer, J.; Amemiya, C. T., Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology* **2004**, *16* (4), 257-275.
- Hiramoto, E.; Tsutsumi, A.; Suzuki, R.; Matsuoka, S.; Arai, S.; Kikkawa, M.; Miyazaki, T., The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Science Advances* 2018, 4 (10).
- Sharp, T. H.; Boyle, A. L.; Diebolder, C. A.; Kros, A.; Koster, A. J.; Gros, P., Insights into IgMmediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019, *116* (24), 11900-11905.
- 4. Czajkowsky, D. M.; Shao, Z. F., The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (35), 14960-14965.
- 5. Muller, R.; Grawert, M. A.; Kern, T.; Madl, T.; Peschek, J.; Sattler, M.; Groll, M.; Buchner, J., High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, *110* (25), 10183-10188.
- 6. Li, Y. X.; Wang, G. P.; Li, N. N.; Wang, Y. X.; Zhu, Q. Y.; Chu, H. R.; Wu, W. J.; Tan, Y.; Yu, F.; Su, X. D.; Gao, N.; Xiao, J. Y., Structural insights into immunoglobulin M. *Science* 2020, *367* (6481), 1014-+.
- Ido, S.; Kimiya, H.; Kobayashi, K.; Kominami, H.; Matsushige, K.; Yamada, H., Immunoactive twodimensional self-assembly of monoclonal antibodies in aqueous solution revealed by atomic force microscopy. *Nature Materials* 2014, *13* (3), 265-271.
- 8. Collins, B. E.; Paulson, J. C., Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein-glycan interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8* (6), 617-625.
- 9.Paulson, J. C.; Blixt, O.; Collins, B. E., Sweet spots in functional glycomics. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2* (5), 238-248.
- Cecioni, S.; Lalor, R.; Blanchard, B.; Praly, J. P.; Imberty, A.; Matthews, S. E.; Vidal, S., Achieving High Affinity towards a Bacterial Lectin through Multivalent Topological Isomers of Calix 4 arene Glycoconjugates. *Chemistry-a European Journal* 2009, *15* (47), 13232-13240.
- 11. Dondoni, A.; Marra, A., Calixarene and Calixresorcarene Glycosides: Their Synthesis and Biological Applications. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (9), 4949-4977.
- Andre, S.; Grandjean, C.; Gautier, F. M.; Bernardi, S.; Sansone, F.; Gabius, H. J.; Ungaro, R., Combining carbohydrate substitutions at bioinspired positions with multivalent presentation towards optimising lectin inhibitors: case study with calixarenes. *Chemical Communications* 2011, 47 (21), 6126-6128.
- 13. Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F., Multivalent and Multifunctional Calixarenes in Bionanotechnology. *European Journal of Organic Chemistry*.
- 14. Fulton, D. A.; Stoddart, J. F., Neoglycoconjugates based on cyclodextrins and calixarenes. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12* (5), 655-672.

- Gomez-Garcia, M.; Benito, J. M.; Butera, A. P.; Mellet, C. O.; Fernandez, J. M. G.; Blanco, J. L. J., Probing Carbohydrate-Lectin Recognition in Heterogeneous Environments with Monodisperse Cyclodextrin-Based Glycoclusters. *Journal of Organic Chemistry* 2012, 77 (3), 1273-1288.
- Brissonnet, Y.; Mellet, C. O.; Morandat, S.; Moreno, M. I. G.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Sestak, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G., Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases. *Journal of the American Chemical Society* 2013, *135* (49), 18427-18435.
- Ohta, T.; Miura, N.; Fujitani, N.; Nakajima, F.; Niikura, K.; Sadamoto, R.; Guo, C. T.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Monde, K.; Nishimura, S. I., Glycotentacles: Synthesis of cyclic glycopeptides, toward a tailored blocker of influenza virus hemagglutinin. *Angewandte Chemie-International Edition* 2003, *42* (42), 5186-5189.
- Krauss, I. J.; Joyce, J. G.; Finnefrock, A. C.; Song, H. C.; Dudkin, V. Y.; Geng, X.; Warren, J. D.; Chastain, M.; Shiver, J. W.; Danishefsky, S. J., Fully synthetic carbohydrate HIV antigens designed on the logic of the 2G12 antibody. *Journal of the American Chemical Society* 2007, *129* (36), 11042-+.
- Pujol, A. M.; Cuillel, M.; Renaudet, O.; Lebrun, C.; Charbonnier, P.; Cassio, D.; Gateau, C.; Dumy, P.; Mintz, E.; Delangle, P., Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide. *Journal of the American Chemical Society* 2011, *133* (2), 286-296.
- Liet, B.; Laigre, E.; Goyard, D.; Todaro, B.; Tiertant, C.; Boturyn, D.; Berthet, N.; Renaudet, O., Multifunctional Glycoconjugates for Recruiting Natural Antibodies against Cancer Cells. *Chemistry-a European Journal* 2019, 25 (68), 15508-15515.
- Dupin, L.; Noel, M.; Bonnet, S.; Meyer, A.; Gehin, T.; Bastide, L.; Randriantsoa, M.; Souteyrand, E.; Cottin, C.; Vergoten, G.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Chevolot, Y.; Darblade, B., Screening of a Library of Oligosaccharides Targeting Lectin LecB of Pseudomonas Aeruginosa and Synthesis of High Affinity Oligoglycoclusters. *Molecules* 2018, 23 (12).
- Bes, L.; Angot, S.; Limer, A.; Haddleton, D. M., Sugar-coated amphiphilic block copolymer micelles from living radical polymerization: Recognition by immobilized lectins. *Macromolecules* 2003, *36* (7), 2493-2499.
- Otsuka, I.; Blanchard, B.; Borsali, R.; Imberty, A.; Kakuchi, T., Enhancement of Plant and Bacterial Lectin Binding Affinities by Three-Dimensional Organized Cluster Glycosides Constructed on Helical Poly(phenylacetylene) Backbones. *Chembiochem* 2010, *11* (17), 2399-2408.
- Ponader, D.; Wojcik, F.; Beceren-Braun, F.; Dernedde, J.; Hartmann, L., Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity. *Biomacromolecules* 2012, 13 (6), 1845-1852.
- Tsvetkov, D. E.; Cheshev, P. E.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Pazynina, G. V.; Sablina, M. A.; Gambaryan, A. S.; Bovin, N. V.; Rieben, R.; Shashkov, A. S.; Nifant'ev, N. E., Neoglycoconjugates based on dendrimer poly(aminoamides). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2002, *28* (6), 470-486.
- 26. Jayaraman, N.; Maiti, K.; Naresh, K., Multivalent glycoliposomes and micelles to study carbohydrateprotein and carbohydrate-carbohydrate interactions. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (11), 4640-4656.

- Andre, S.; Pieters, R. J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, L.; Liu, F. T.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H. J., Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. *Chembiochem* 2001, 2 (11), 822-830.
- 28. Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., Design and synthesis of glycodendrimers. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90* (3), 231-255.
- 29. Heidecke, C. D.; Lindhorst, T. K., Iterative synthesis of spacered glycodendrons as oligomannoside mimetics and evaluation of their antiadhesive properties. *Chemistry-a European Journal* **2007**, *13* (32), 9056-9067.
- 30. Touaibia, M.; Roy, R., Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated E-coli uropathogenic infections. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2007**, *7* (12), 1270-1283.
- Mintzer, M. A.; Dane, E. L.; O'Toole, G. A.; Grinstaff, M. W., Exploiting Dendrimer Multivalency To Combat Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases. *Molecular Pharmaceutics* 2012, 9 (3), 342-354.
- 32. Marradi, M.; Martin-Lomas, M.; Penades, S., Glyconanoparticles: Polyvalent tools to study carbohydrate-based interactions. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol 64* **2010**, *64*, 211-290.
- Wang, X.; Matei, E.; Deng, L. Q.; Ramstrom, O.; Gronenborn, A. M.; Yan, M. D., Multivalent glyconanoparticles with enhanced affinity to the anti-viral lectin Cyanovirin-N. *Chemical Communications* 2011, 47 (30), 8620-8622.
- Horan, N.; Yan, L.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D., Nonstatistical binding of a protein to clustered carbohydrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96 (21), 11782-11786.
- Vico, R. V.; Voskuhl, J.; Ravoo, B. J., Multivalent Interaction of Cyclodextrin Vesicles, Carbohydrate Guests, and Lectins: A Kinetic Investigation. *Langmuir* 2011, 27 (4), 1391-1397.
- Thoma, G.; Katopodis, A. G.; Voelcker, N.; Duthaler, R. O.; Streiff, M. B., Novel glycodendrimers self-assemble to nanoparticles which function as polyvalent ligands in vitro and in vivo. *Angewandte Chemie-International Edition* 2002, *41* (17), 3195-+.
- Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing receptorligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *Journal of the American Chemical Society* 2002, *124* (50), 14922-14933.
- Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M., Effective inhibitors of hemagglutination by Influenzavirus synthesized from polymers having active ester groups - Insight into mechanism of inhibition. *Journal* of Medicinal Chemistry 1995, 38 (21), 4179-4190.
- 39. Reynolds, M.; Perez, S., Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14* (1), 74-95.
- 40. Schlick, K. H. In *Evaluating protein-carbohydrate interactions induced by multivalent carbohydratefunctionalized dendrimers*, 2010.
- 41. Bell, G. I., Model for the binding of multivalent antigen to cells. *Nature* **1974**, *248* (5447), 430-431.
- 42. Li, J.; Zacharek, S.; Chen, X.; Wang, J. Q.; Zhang, W.; Janczuk, A.; Wang, P. G., Bacteria targeted

by human natural antibodies using alpha-Gal conjugated receptor-specific glycopolymers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7* (8), 1549-1558.

- 43. Kitov, P. I.; Bundle, D. R., On the nature of the multivalency effect: A thermodynamic model. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (52), 16271-16284.
- Uvyn, A.; De Coen, R.; Gruijs, M.; Tuk, C. W.; De Vrieze, J.; van Egmond, M.; De Geest, B. G., Efficient Innate Immune Killing of Cancer Cells Triggered by Cell-Surface Anchoring of Multivalent Antibody-Recruiting Polymers. *Angewandte Chemie-International Edition* 2019, *58* (37), 12988-12993.
- 45. Monsigny, M.; Mayer, R.; Roche, A. C., Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity. *Carbohydrate letters* **2000**, *4* (1), 35-52.
- Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L., Probing low affinity and multivalent interactions with surface plasmon resonance: Ligands for concanavalin A. *Journal of the American Chemical Society* 1998, *120* (41), 10575-10582.
- Dam, T. K.; Gerken, T. A.; Brewer, C. F., Thermodynamics of Multivalent Carbohydrate-Lectin Cross-Linking Interactions: Importance of Entropy in the Bind and Jump Mechanism. *Biochemistry* 2009, *48* (18), 3822-3827.
- Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksch, B.; Dernedde, J.; Graf, C.; Knapp, E. W.; Haag, R., Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angewandte Chemie-International Edition* 2012, *51* (42), 10472-10498.
- Almant, M.; Mastouri, A.; Gallego-Yerga, L.; Fernandez, J. M. G.; Mellet, C. O.; Kovensky, J.; Morandat, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G., Probing the Nature of the Cluster Effect Observed with Synthetic Multivalent Galactosides and Peanut Agglutinin Lectin. *Chemistry-a European Journal* 2013, 19 (2), 728-737.
- Munoz, E. M.; Correa, J.; Fernandez-Megia, E.; Riguera, R., Probing the Relevance of Lectin Clustering for the Reliable Evaluation of Multivalent Carbohydrate Recognition. *Journal of the American Chemical Society* 2009, *131* (49), 17765-17767.
- Munoz, E. M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Real-Time Evaluation of Binding Mechanisms in Multivalent Interactions: A Surface Plasmon Resonance Kinetic Approach. *Journal of the American Chemical Society* 2013, *135* (16), 5966-5969.
- 52. Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G., Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9* (4), 966-979.
- Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Taillefumier, C.; Wimmerova, M.; Praly, J. P.; Imberty, A.; Vidal, S., Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of "Clicked" Multivalent Glycoclusters. *Chemistry-a European Journal* 2011, *17* (7), 2146-2159.
- 54. Karush, F.; Chua, M. M.; Rodwell, J. D., Interaction of a bivalent ligand with IgM Anti-lactose antibody. *Federation Proceedings* **1978**, *37* (6), 1279-1279.
- 55. O'Reilly, M. K.; Collins, B. E.; Han, S.; Liao, L.; Rillahan, C.; Kitov, P. I.; Bundle, D. R.; Paulson, J. C., Bifunctional CD22 Ligands use multimeric immunoglobulins as protein scaffolds in

assembly of immune complexes on B cells. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (24), 7736-7745.

- 56. Edberg, S. C.; Bronson, P. M.; Van Oss, C. J., The valency of IgM and IgG rabbit anti-dextran antibody as a function of the size of the dextran molecule. *Immunochemistry* **1972**, *9* (3), 273-288.
- 57. Goldstein, B., Theory of hapten binding to IgM Question of repulsive interactions between binding-sites. *Biophysical Chemistry* **1975**, *3* (4), 363-367.
- 58. Tanaka, K.; Kageyama, C.; Fukase, K., Acceleration of Cu(I)-mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition by histidine derivatives. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (37), 6475-6479.
- Tanaka, K.; Siwu, E. R. O.; Minami, K.; Hasegawa, K.; Nozaki, S.; Kanayama, Y.; Koyama, K.; Chen, W. C.; Paulson, J. C.; Watanabe, Y.; Fukase, K., Noninvasive Imaging of Dendrimer-Type N-Glycan Clusters: In Vivo Dynamics Dependence on Oligosaccharide Structure. *Angewandte Chemie-International Edition* 2010, *49* (44), 8195-8200.
- Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3 -triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* 2002, 67 (9), 3057-3064.
- 61. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41* (14), 2596-+.
- 62. Jiang, L.; Chan, T. H., Borane/Bu<sub>2</sub>BOTf: A mild reagent for the regioselective reductive ring opening of benzylidene acetals in carbohydrates. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (5-6), 355-358.
- Park, E. S.; Il Jo, K.; Shin, J. W.; Park, R.; Choi, T. Y.; Bang, H. I.; Chai, G. R.; Yun, S. G., Comparison of Total and IgG ABO Antibody Titers in Healthy Individuals by Using Tube and Column Agglutination Techniques. *Annals of Laboratory Medicine* 2014, 34 (3), 223-229.
- 64. Rieben, R.; Buchs, J. P.; Fluckiger, E.; Nydegger, U. E., Antibodies to Histo-blood group substances-A and substances-B - Agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy-persons of different age categories. *Transfusion* **1991**, *31* (7), 607-615.
- 65. Abelson, N. M.; Rawson, A. J., Studies of Blood Group Antibodies. *I. Fractionation of Anti-A and Anti-B Isohemagglutinins by Anion-Cation Cellulose Exchange Chromatography* **1959**, *82* (5), 435-443.
- 66. McDuffie, F. C.; Kabat, E. A.; Allen, P. Z.; Williams, C. A., An Immunochemical Study of the Relationship of Human Blood Group Isoantibodies to  $\gamma_1$  and  $\gamma_2$ -Globulins. *The Journal of Immunology* **1958**, *81* (1), 48-64.
- 67. Flodin, P.; Killander, J., Fractionation of human-serum proteins by gel filtration. *Biochimica et Biophysica Acta* **1962**, *63* (3), 403-410.
- 68. Nishizawa, R., Studies on immunoglobulin classes of human blood group Antibodies II. immunoglobulin classes of immune Antibodies. *The KITAKANTO Medical Journal* **1982**, *32* (5), 439-449.

第五章 合成糖鎖を用いた生体機能解析

## 5-1 抗体の作用と補体系

抗体の作用は、細菌やウイルスの中和反応、オプソニン作用、抗体依存性細胞傷害(Antibody dependent cell cytotoxicity, ADCC)活性、補体依存性細胞傷害(Complement dependent cytotoxicity, CDC)活性、アポトーシス誘導活性に大別される(Figure 5-1).抗体は、ウイルスや細菌、またはそれらから放出された毒素などの異物の表面に存在する抗原を認識して結合することで感染力や毒性が低下する(中和作用).また、異物と複合体を形成した抗体は、マクロファージや好中球などの食細胞のFc 受容体に認識される.これが食作用を活性化する(オプソニン作用). ADCCは、IgG 抗体によって起こり、Fc 受容体を持つエフェクター細胞による細胞傷害作用である.一方 CDCは、IgG、IgM 抗体が誘導し、抗原抗体反応後、補体系の活性化反応が進行する.CDC 活性は抗体の hinge もしくは CH2 ドメインと補体の C1q ドメインが相互作用することで誘起され、この相互作用部位への変異導入により、活性を増強できる<sup>1</sup>.



Figure 5-1 抗体の作用

補体系には古典経路,副経路,レクチン経路が存在し (Figure 5-2), CDC 活性は古典経路によって起こる<sup>2</sup>. 古典経路による補体系は,まず抗体と補体第1成分 (C1) が結合し,補体 C4 の 活性化後,C2~C8 を連続的に活性化する.最終的に C9 複合体である膜障害性複合体 (Membrane attack complex, MAC) を形成し,細胞膜に穴をあけることで細胞死を誘導する.補体系の活性 化は一般的に IgM 抗体であれば 1 分子で引き起こすことが可能である.一方で,IgG 抗体の場 合複数必要であり,IgG3,IgG1,IgG2 の順で活性化能が弱くなり,IgG4 は CDC を誘導しない. そのため,補体の活性化能は IgM 抗体の方が高く,CDC 活性も高い.



Figure 5-2 補体活性化経路

# 5-2 ADCの概念を用いた抗体―糖鎖複合体の調製

抗体と低分子薬物を組み合わせた抗体薬物複合体(Antibody drug conjugate, ADC)<sup>3</sup>は、高い 特異性を持つ抗体を Drug delivery system (DDS)のツールとして用いた次世代抗体医薬品で、 Magic bullet とも呼ばれている<sup>4</sup>. ADC を用いた抗体医薬は、Gemtuzumab Ozogamicin (2000 年) <sup>5</sup>, Brentuximab Vedotin (2011 年)<sup>6,7</sup>, Trastuzumab Emstansine (2013 年)<sup>8</sup>, Inotuzumab Ozogamicin (2017 年)<sup>9</sup>が既に承認を受けている.

ADC は分子設計が非常に重要である<sup>10</sup>. 分子設計においては抗体の選定<sup>11-20</sup>や,リンカー構造<sup>21-29</sup>,低分子薬物<sup>30-33</sup>の担持量や放出メカニズム,さらには標識位置や手法<sup>34-45</sup>などを考慮する必要がある. ADC は、血清中では安定かつ無毒で、標的部位において低分子薬物を速やかに放出する必要がある. そこで、一般的に、標的細胞周辺や、細胞内環境において、切断可能なリンカーを介して、抗体に薬物を連結する.

2018年,筆者の研究室のJ. Sianturi らは合成した  $\alpha$ -gal 糖鎖を用い,ヒト血清中の抗 $\alpha$ -gal 抗体 による CDC 活性の誘導を報告した(Figure 5-3a-d)<sup>46</sup>. ADC の概念を利用し,抗体に $\alpha$ -gal エピ トープを導入することで,標的細胞を $\alpha$ -gal 糖鎖で標識する.ヒト血清中には大量の抗 $\alpha$ -gal 抗体 が存在し,これが補体系を活性化し,CDC により,標的細胞の細胞死を誘導できる.また, $\alpha$ gal デンドリマーによる CDC 活性の増強についても併せて報告している.





(a) α-Gal 糖鎖抗原,(b) ADC の概念を利用した CDC アッセイ (c) 糖鎖担持
 量の異なるα-gal 糖鎖標識抗体による CDC 活性, (d) α-Gal 糖鎖デンドリマー
 担持抗体による CDC 活性

筆者は、ABO 式血液型抗原の引き起こす激しい免疫反応を、Sianturi らの報告に従って、がん の免疫治療に応用することを計画した(Figure 5-4). すなわち、血液型糖鎖標識抗体を用いて、 標的のがん細胞を血液型糖鎖で標識し、抗血液型抗体による CDC 活性を誘導する. Sianturi ら の系では、抗α-gal 抗体として IgM と IgG が両方とも大量に存在するのに対し、抗血液型抗体は IgM 抗体が中心であり、その免疫反応の違いを検証できると考えた. なお、ここでは、がん細胞 として、ヒト由来リンパ芽球様細胞である Raji 細胞を、抗がん抗体として、抗 CD20 抗体(ク ローン: 2H7、マウスモノクローナル抗体)を、血液型抗原として、B型糖鎖抗原を用いた.



Figure 5-4 CDC アッセイ

まず,抗 CD20 抗体に対し B 型糖鎖抗原を導入した(Figure 5-5).第2章で合成した B 型糖 鎖抗原 83 の還元末端のカルボン酸を N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl) uronium tetrafluoroborate (TSTU), DIPEA を用いて活性エステル体 168 へと誘導した.得られた活性エ ステルを PBS buffer 中で抗 CD20 抗体と作用させ,抗体に糖鎖を導入した.この際,用いる糖鎖 の濃度を変更することで,糖鎖導入量の異なる抗体を作製した.得られた標識抗体は SDS-PAGE を行うことで標識濃度依存的に糖鎖担持量が増加することを確認した.



Figure 5-5 合成糖鎖を用いた抗体標識と SDS-PAGE による糖鎖担持量の確認

5-3 CDC 活性試験によるがん細胞特異的細胞死誘導の検証

続いて CDC 活性試験を行った. Raji 細胞を 5-2 で調製した B 型糖鎖抗原標識抗体で処理した 後,抗 B 抗原抗体 (クローン: Z5H-2),ウサギ補体を加え,MTT アッセイにより細胞生存率 を調べた. その結果,予想に反し,糖鎖導入量依存的に細胞生存率が上昇した (Figure 5-6).



Entry	糖鎖導入濃度	抗原導入量
Abs 1	0 mM	0
Abs 2	0.2 mM	2
Abs 3	1 mM	12

Figure 5-6 血液型糖鎖を用いた CDC 活性試験

# 5-4 フローサイトメトリーによる合成糖鎖抗体複合体の性能検証

5-3 において, B 型糖鎖抗原の導入により CDC 活性が向上しなかった原因を追究するために, フローサイトメトリー (Flow cytometry, FCM) によりそれぞれの抗体による抗原の認識を検証 した. (Figure 5-7).まず, Raji 細胞を B 型糖鎖抗原で標識した抗 CD20 糖鎖標識抗体 (マウス モノクローナル IgG) で処理した後,蛍光標識抗マウス IgG 抗体で染色したところ,糖鎖導入量 依存的に蛍光強度の減少した (Figure 5-8).すなわち,糖鎖の導入により,抗 CD20 抗体と Raji 細胞の相互作用,もしくは抗 CD20 抗体と抗マウス IgG 抗体の相互作用のどちらかが減弱した. これは,抗 CD20 抗体の抗原認識部位,もしくは抗マウス IgG 抗体の認識部位周辺に糖鎖標識 が進行したことが原因であると考えている.ただし,糖鎖を導入した抗 CD20 抗体が,有意に Raji 細胞を認識していることは確認できた.



Figure 5-7 フローサイトメトリーによる CDC 実験系の確認



Figure 5-8 蛍光標識抗マウス IgG 抗体を用いた FCM

続いて FITC 標識した抗 B 抗原抗体 (IgM 抗体)を用いて染色した.その結果,抗 CD20 抗体 への糖鎖の導入量に関わらず,Raji 細胞は全く染色されなかった (Figure 5-9).上記において,抗 CD20 抗体と Raji 細胞の結合は確認できていることから,この結果は,抗体に導入した B 型 糖鎖抗原が用いた IgM 抗体により認識されていないことを示している.これは,標識糖鎖の量 が十分でなく,多価効果が働かず,IgM と十分な親和性を示さなかったことが原因であると考えている.



Figure 5-9 蛍光標識抗 B 抗原抗体を用いた FCM

5-5 結論

筆者は合成した血液型糖鎖抗原で標識したがん抗体を用いたがん免疫療法を検討した. B 型 糖鎖抗原を抗 CD20 抗体へ導入し,得られた標識抗体を用いて CDC アッセイを行ったところ, 糖鎖導入による,細胞傷害活性の増強は見られなかった.これは,抗体に導入した B 型糖鎖抗 原が抗 B 抗原抗体により有意に認識されていないことが原因であった.本研究においては,抗 CD20 抗体に複数の糖鎖を導入することで多価効果を得られると考えたが,糖鎖担持量を増やし た場合においても, IgM 抗体による認識は確認できなかった.このことから,効果的に IgM 抗 体との多価効果を得るためには糖鎖の局所濃度を上げる必要があると考えている.すなわち, 前章で合成したデンドリマーはその要請を明確に満たすものであり,デンドリマー-抗体複合 体を作製することで IgM 抗体による CDC 活性が発現すると期待している. <参考文献-第五章>

- 1. Moore, G. L.; Chen, H.; Karki, S.; Lazar, G. A., Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *Mabs* **2010**, *2* (2), 181-189.
- Goldberg, B. S.; Ackerman, M. E., Antibody-mediated complement activation in pathology and protection. *Immunology and Cell Biology* 2020, *98* (4), 305-317.
- Akkapeddi, P.; Azizi, S. A.; Freedy, A. M.; Cal, P.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L., Construction of homogeneous antibody-drug conjugates using site-selective protein chemistry. *Chemical Science* 2016, 7 (5), 2954-2963.
- Strebhardt, K.; Ullrich, A., Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8 (6), 473-480.
- Bross, P. F.; Beitz, J.; Chen, G.; Chen, X. H.; Duffy, E.; Kieffer, L.; Roy, S.; Sridhara, R.; Rahman, A.; Williams, G.; Pazdur, R., Approval summary: Gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 2001, 7 (6), 1490-1496.
- 6. Deng, C.; Pan, B.; O'Connor, O. A., Brentuximab Vedotin. Clinical Cancer Research 2013, 19 (1), 22-27.
- 7. Scott, L. J., Brentuximab Vedotin: A Review in CD30-Positive Hodgkin Lymphoma. *Drugs* 2017, 77 (4), 435-445.
- LoRusso, P. M.; Weiss, D.; Guardino, E.; Girish, S.; Sliwkowski, M. X., Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate in Development for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Cancer. *Clinical Cancer Research* 2011, *17* (20), 6437-6447.
- Takeshita, A.; Shinjo, K.; Yamakage, N.; Ono, T.; Hirano, I.; Matsui, H.; Shigeno, K.; Nakamura, S.; Tobita, T.; Maekawa, M.; Ohnishi, K.; Sugimoto, Y.; Kiyoi, H.; Naoe, T.; Ohno, R., CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma. *British Journal of Haematology* 2009, *146* (1), 34-43.
- Manabe, S., Development and Current Status of Antibody-drug conjugate (ADC). *Drug Delivery System* 2019, 34 (1), 10-21.
- Polson, A. G.; Calemine-Fenaux, J.; Chan, P.; Chang, W.; Christensen, E.; Clark, S.; de Sauvage, F. J.; Eaton, D.; Elkins, K.; Elliott, J. M.; Frantz, G.; Fuji, R. N.; Gray, A.; Harden, K.; Ingle, G. S.; Kljavin, N. M.; Koeppen, H.; Nelson, C.; Prabhu, S.; Raab, H.; Ross, S.; Stephan, J. P.; Scales, S. J.; Spencer, S. D.; Vandlen, R.; Wranik, B.; Yu, S. F.; Zheng, B.; Ebens, A., Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: Target and Linker-Drug Selection. *Cancer Research* 2009, *69* (6), 2358-2364.
- Austin, C. D.; De Maziere, A. M.; Pisacane, P. I.; van Dijk, S. M.; Eigenbrot, C.; Sliwkowski, M. X.; Klumperman, J.; Scheller, R. H., Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Molecular Biology of the Cell* 2004, *15* (12), 5268-5282.
- 13. Hisada, Y.; Yasunaga, M.; Hanaoka, S.; Saijou, S.; Sugino, T.; Tsuji, A.; Saga, T.; Tsumoto, K.;

Manabe, S.; Kuroda, J.; Kuratsu, J.; Matsumura, Y., Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. *Scientific Reports* **2013**, *3*.

- Yasunaga, M.; Manabe, S.; Tarin, D.; Matsumura, Y., Cancer-Stroma Targeting Therapy by Cytotoxic Immunoconjugate Bound to the Collagen 4 Network in the Tumor Tissue. *Bioconjugate Chemistry* 2011, 22 (9), 1776-1783.
- 15. Fuchigami, H.; Manabe, S.; Yasunaga, M.; Matsumura, Y., Chemotherapy payload of anti-insoluble fibrin antibody-drug conjugate is released specifically upon binding to fibrin. *Scientific Reports* **2018**, *8*.
- 16. Raave, R.; van Kuppevelt, T. H.; Daamen, W. F., Chemotherapeutic drug delivery by tumoral extracellular matrix targeting. *Journal of Controlled Release* **2018**, *274*, 1-8.
- Gebleux, R.; Stringhini, M.; Casanova, R.; Soltermann, A.; Neri, D., Non-internalizing antibody-drug conjugates display potent anti-cancer activity upon proteolytic release of monomethyl auristatin E in the subendothelial extracellular matrix. *International Journal of Cancer* 2017, *140* (7), 1670-1679.
- Poole, A. R.; Tiltman, K. J.; Recklies, A. D.; Stoker, T. A. M., Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature* 1978, 273 (5663), 545-547.
- Rossin, R.; Versteegen, R. M.; Wu, J.; Khasanov, A.; Wessels, H. J.; Steenbergen, E. J.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; van Onzen, A.; Hudson, P. J.; Robillard, M. S., Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice. *Nature Communications* 2018, 9.
- Bardia, A.; Mayer, I. A.; Diamond, J. R.; Moroose, R. L.; Isakoff, S. J.; Starodub, A. N.; Shah, N. C.; O'Shaughnessy, J.; Kalinsky, K.; Guarino, M.; Abramson, V.; Juric, D.; Tolaney, S. M.; Berlin, J.; Messersmith, W. A.; Ocean, A. J.; Wegener, W. A.; Maliakal, P.; Sharkey, R. M.; Govindan, S. V.; Goldenberg, D. M.; Vahdat, L. T., Efficacy and Safety of Anti-Trop-2 Antibody Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan (IMMU-132) in Heavily Pretreated Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2017, *35* (19), 2141-+.
- 21. Chari, R. V. J., Expanding the Reach of Antibody-Drug Conjugates. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 7 (11), 974-976.
- Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A., Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjugate Chemistry* 2002, *13* (4), 855-869.
- Doronina, S. O.; Toki, B. E.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cerveny, C. G.; Chace, D. F.; DeBlanc, R. L.; Gearing, R. P.; Bovee, T. D.; Siegall, C. B.; Francisco, J. A.; Wahl, A. F.; Meyer, D. L.; Senter, P. D., Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nature Biotechnology* 2003, *21* (7), 778-784.
- 24. Caculitan, N. G.; Chuh, J. D.; Ma, Y.; Zhang, D. L.; Kozak, K. R.; Liu, Y. C.; Pillow, T. H.; Sadowsky, J.; Cheung, T. K.; Phung, Q.; Haley, B.; Lee, B. C.; Akita, R. W.; Sliwkowski, M. X.; Polson, A. G., Cathepsin B Is Dispensable for Cellular Processing of Cathepsin B-Cleavable Antibody-Drug

Conjugates. Cancer Research 2017, 77 (24), 7027-7037.

- 25. Dorywalska, M.; Dushin, R.; Moine, L.; Farias, S. E.; Zhou, D. H.; Navaratnam, T.; Lui, V.; Hasa-Moreno, A.; Casas, M. G.; Tran, T. T.; Delaria, K.; Liu, S. H.; Foletti, D.; O'Donnell, C. J.; Pons, J.; Shelton, D. L.; Rajpal, A.; Strop, P., Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016, *15* (5), 958-970.
- 26. Anami, Y.; Yamazaki, C. M.; Xiong, W.; Gui, X.; Zhang, N. Y.; An, Z. Q.; Tsuchikama, K., Glutamic acid-valine-citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody-drug conjugates in mice. *Nature Communications* 2018, 9.
- Jeffrey, S. C.; De Brabander, J.; Miyamoto, J.; Senter, P. D., Expanded Utility of the beta-Glucuronide Linker: ADCs That Deliver Phenolic Cytotoxic Agents. *Acs Medicinal Chemistry Letters* 2010, *1* (6), 277-280.
- Gorka, A.; Nani, R.; Nagaya, T.; Kobayashi, H.; Schnermann, M., Near-IR light-mediated cleavage of antibody-drug conjugates using cyanine photocages. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 2016, 252.
- Ogitani, Y.; Aida, T.; Hagihara, K.; Yamaguchi, J.; Ishii, C.; Harada, N.; Soma, M.; Okamoto, H.; Oitate, M.; Arakawa, S.; Hirai, T.; Atsumi, R.; Nakada, T.; Hayakawa, I.; Abe, Y.; Agatsuma, T., DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clinical Cancer Research* 2016, 22 (20), 5097-5108.
- Mitsunaga, M.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Rosenblum, L. T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nature Medicine* 2011, *17* (12), 1685-U210.
- 31. Baumer, S.; Baumer, N.; Appel, N.; Terheyden, L.; Fremerey, J.; Schelhaas, S.; Wardelmann, E.; Buchholz, F.; Berdel, W. E.; Muller-Tidow, C., Antibody-Mediated Delivery of Anti-KRAS-siRNA In Vivo Overcomes Therapy Resistance in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research* 2015, *21* (6), 1383-1394.
- 32. Sugo, T.; Terada, M.; Oikawa, T.; Miyata, K.; Nishimura, S.; Kenjo, E.; Ogasawara-Shimizu, M.; Makita, Y.; Imaichi, S.; Murata, S.; Otake, K.; Kikuchi, K.; Teratani, M.; Masuda, Y.; Kamei, T.; Takagahara, S.; Ikeda, S.; Ohtaki, T.; Matsumoto, H., Development of antibody-siRNA conjugate targeted to cardiac and skeletal muscles. *Journal of Controlled Release* 2016, 237, 1-13.
- 33. Milenic, D. E.; Brady, E. D.; Brechbiel, M. W., Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3* (6), 488-498.
- 34.Strop, P.; Liu, S. H.; Dorywalska, M.; Delaria, K.; Dushin, R. G.; Tran, T. T.; Ho, W. H.; Farias, S.; Casas, M. G.; Abdiche, Y.; Zhou, D. H.; Chandrasekaran, R.; Samain, C.; Loo, C.; Rossi, A.; Rickert, M.; Krimm, S.; Wong, T.; Chin, S. M.; Yu, J.; Dilley, J.; Chaparro-Riggers, J.; Filzen, G. F.; O'Donnell, C. J.; Wang, F.; Myers, J. S.; Pons, J.; Shelton, D. L.; Rajpal, A., Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chemistry & Biology* 2013, 20 (2), 161-167.

- 35. Shen, B. Q.; Xu, K. Y.; Liu, L. N.; Raab, H.; Bhakta, S.; Kenrick, M.; Parsons-Reponte, K. L.; Tien, J.; Yu, S. F.; Mai, E.; Li, D. W.; Tibbitts, J.; Baudys, J.; Saadi, O. M.; Scales, S. J.; McDonald, P. J.; Hass, P. E.; Eigenbrot, C.; Nguyen, T.; Solis, W. A.; Fuji, R. N.; Flagella, K. M.; Patel, D.; Spencer, S. D.; Khawlil, L. A.; Ebens, A.; Wong, W. L.; Vandlen, R.; Kaur, S.; Sliwkowski, M. X.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Junutula, J. R., Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. *Nature Biotechnology* **2012**, *30* (2), 184-189.
- Alley, S. C.; Benjamin, D. R.; Jeffrey, S. C.; Okeley, N. M.; Meyer, D. L.; Sanderson, R. J.; Senter,
  P. D., Contribution of linker stability to the activities of anticancer immunoconjugates. *Bioconjugate Chemistry* 2008, *19* (3), 759-765.
- 37. Lyon, R. P.; Setter, J. R.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Hunter, J. H.; Anderson, M. E.; Balasubramanian, C. L.; Duniho, S. M.; Leiske, C. I.; Li, F.; Senter, P. D., Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nature Biotechnology* 2014, 32 (10), 1059-+.
- 38. Muguruma, K.; Yakushiji, F.; Kawamata, R.; Akiyama, D.; Arirna, R.; Shirasaka, T.; Kikkawa, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Fukuhara, T.; Watabe, T.; Ito, Y.; Hayashi, Y., Novel Hybrid Compound of a Plinabulin Prodrug with an IgG Binding Peptide for Generating a Tumor Selective Noncovalent-Type Antibody-Drug Conjugate. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (7), 1606-1613.
- 39. Ito, Y. SPECIFIC MODIFICATION OF ANTIBODY BY IgG-BINDING PEPTIDE. 2016.
- 40. Paterson, B. M.; Alt, K.; Jeffery, C. M.; Price, R. I.; Jagdale, S.; Rigby, S.; Williams, C. C.; Peter, K.; Hagemeyer, C. E.; Donnelly, P. S., Enzyme-Mediated Site-Specific Bioconjugation of Metal Complexes to Proteins: Sortase-Mediated Coupling of Copper-64 to a Single-Chain Antibody. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53* (24), 6115-6119.
- 41. Appel, M. J.; Bertozzi, C. R., Formylglycine, a Post-Translationally Generated Residue with Unique Catalytic Capabilities and Biotechnology Applications. *Acs Chemical Biology* **2015**, *10* (1), 72-84.
- 42. Axup, J. Y.; Bajjuri, K. M.; Ritland, M.; Hutchins, B. M.; Kim, C. H.; Kazane, S. A.; Halder, R.; Forsyth, J. S.; Santidrian, A. F.; Stafin, K.; Lu, Y. C.; Tran, H.; Seller, A. J.; Biroce, S. L.; Szydlik, A.; Pinkstaff, J. K.; Tian, F.; Sinha, S. C.; Felding-Habermann, B.; Smider, V. V.; Schultz, P. G., Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, *109* (40), 16101-16106.
- 43. Lang, K.; Chin, J. W., Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins. *Acs Chemical Biology* **2014**, *9* (1), 16-20.
- Nakada, T.; Masuda, T.; Naito, H.; Yoshida, M.; Ashida, S.; Morita, K.; Miyazaki, H.; Kasuya, Y.; Ogitani, Y.; Yamaguchi, J.; Abe, Y.; Honda, T., Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, 26 (6), 1542-1545.
- Lyon, R. P.; Bovee, T. D.; Doronina, S. O.; Burke, P. J.; Hunter, J. H.; Neff-LaFord, H. D.; Jonas, M.; Anderson, M. E.; Setter, J. R.; Senter, P. D., Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nature Biotechnology* 2015, *33* (7), 733-

735.

46. Sianturi, J.; Manabe, Y.; Li, H. S.; Chiu, L. T.; Chang, T. C.; Tokunaga, K.; Kabayama, K.; Tanemura, M.; Takamatsu, S.; Miyoshi, E.; Hung, S. C.; Fukase, K., Development of alpha-Gal-Antibody Conjugates to Increase Immune Response by Recruiting Natural Antibodies. *Angewandte Chemie-International Edition* **2019**, *58* (14), 4526-4530. 第六章 総括

筆者はアミノ糖の保護基に着目して ABO 式血液型糖鎖を合成した.まず, Troc 基を保護基として用 いて ABH 抗原を合成した.さらに, NHAc 基を NAc<sub>2</sub>基へと変換して合成を進めるジアセチルストラ テジーを適用して H 抗原を合成した.この際, NHAc 含有グルコサミンフラグメントの分子間水素結 合による多量体の形成を DOSY を用いることで明らかとした.本研究は,ジアセチルストラテジーの グルコサミン含有糖鎖合成への初めての適用例で,アミノ糖含有糖鎖の効率合成の方法論の一つを提 案した.

得られた合成糖鎖を用いて、糖鎖の多価相互作用を模倣した糖鎖デンドリマーの設計指針を検討した.血液型抗体の主なサブタイプである IgM 抗体のサイズ,抗原認識部位間の距離を基に、3 種類の大きさを持つ糖鎖デンドリマーを設計,合成した. IgM 抗体と合成したデンドリマーの相互作用を SPR, HIA を用いて解析した結果,糖鎖デンドリマーの設計においては、必ずしも複数の結合サイトをカバーするサイズが必要なわけではなく,糖鎖の局所濃度が重要であることを示す結果を得た.すなわちデンドリマー骨格を用いた多価効果の獲得には、多価分子の再結合モデルを考慮した分子設計指針が重要であることを明らかとした.

さらに抗体に血液型糖鎖を導入し、自然抗体である血液型抗体を用いた標的細胞特異的な CDC 活性 の増強を検証した.抗 CD20 抗体に複数の血液型糖鎖を導入したが、この標識抗体は CDC 活性を示さ なかった.FCM を用いて解析したところ、抗 CD20 抗体上に標識した糖鎖と抗 B 抗原抗体が相互作用 していないことが分かった.これは、抗体に対しランダムに糖鎖を導入しても十分な糖鎖の局所濃度が 得られず、IgM と十分な親和性を示さなかったと考えている.これは、高密度に糖鎖を提示できるデン ドリマーを抗体に導入することで解決できると考えている.

#### 第七章 実験項

# 1. General Information

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in an indicated solvent with JEOL ECA 500 MHz spectrometer and Bruker AVANCE700 700 MHz spectometer. DOSY spectra were recorded in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> with Agilent VNMR System 600MHz spectrometer. Chemical shifts of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were referenced to the solvent peaks:  $\delta$ =7.26 and  $\delta$ =77.16 for CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ =3.30 and  $\delta$ =49.30 for CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ =5.32 for CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and  $\delta$ =1.24 and  $\delta$ =70.36 for D<sub>2</sub>O (using 'BuOH as internal standard). Multiplicities abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. High-resolution mass spectra were recorded on a ESI-LTQ-Orbitrap XL (FTMS) mass spectrometer and ESI-O-TOF mass spectrometer. Chemical purification was carried out using silica-gel column chromatography. Silica-gel column chromatography was carried out using Silica Gel 60N (Kanto Chemical Co., 40-50 µm or 63-210 µm) at medium pressure (1-4 kg cm<sup>-2</sup>). Gel permeation chromatography was carried out using Sephadex LH-20 at atmospheric pressure. Silica-gel 60 F254 (Merck Co.) was used for TLC analysis and preparative TLC purification, and compounds were visualized by UV (254 nm), pmethoxybenzaldehyde (p-anisaldehyde, 0.03% in EtOH-H2SO4-acetic acid buffer). Anhydrous CH2Cl2 were distilled in the presence of calcium hydride. Anhydrous THF, DMF, distilled water, and toluene were purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Ltd. Nonaqueous reactions were carried out under argon atmosphere. Molecular sieve 4A (MS4A) was activated with a microwave and dried in vacuo for 3 times before use. All other commercially available reagents and solvents were used as purchased.

#### 2. Synthetic procedures



#### **Compound 90**

To a solution of **89** in DMF (107 mL) was added 2,6-lutidine (3.71 mL, 32.08 mmol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 20 min at -20 °C, *tert*-butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (4.90 mL, 21.38 mmol) was added to the solution. After being stirred for 15 min at -20 °C, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1) to give **90** (5.07 g, 97%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.46-7.42 (m, 2H), 7.37-7.33 (m, 3H), 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 4.49 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 12.3, 1.3 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 3.2, 1.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 12.3, 1.3 Hz, 1H), 3.77 (td, *J* = 9.2, 2.0 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 9.2, 3.2 Hz, 1H), 3.49 (br-d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.30 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 0.87 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), 0.08 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 138.02, 137.89, 133.56, 129.58, 128.75, 127.94, 127.61, 126.30, 100.82, 87.52, 76.57, 75.45, 70.06, 69.37, 68.01, 25.70, 21.14, 18.20, -4.37, -4.73.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>SSiNa, 511.1945, found 511.1953.



### **Compound 93**

To a solution of **90** (295.1 mg, 0.604 mmol) in toluene (2.75 mL) and pyridine (0.275 mL) were added *N*,*N*-dimethyl-4-aminopyridine (7.4 mg, 0.0604 mmol) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (782.0 mg, 3.02 mmol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 22.5 h at 80 °C, the reaction was quenched with 1.0 M HCl aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/EtOAc = 30/1) to give **93** (407.0 mg, 95%) as a light yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.76$  (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.67 (dd, J = 9.4, 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.37-7.33 (m, 3H), 7.31-7.27 (m, 2H), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.50 (s, 1H), 5.08 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 9.2, 6.0 Hz, 1H), 4.39 (dd, J = 12.5, 1.7 Hz, 1H), 4.30-4.21 (m, 2H), 4.08 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 12.5, 1.7 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 9.8, 3.5 Hz, 1H), 3.53-3.51 (br m, 1H), 2.27 (s, 3H,), 0.81 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.02 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.03, 143.43, 143.31, 141.23, 141.20, 137.92, 137.76, 134.66, 133.62, 129.46, 129.04, 128.79, 128.13, 127.99, 127.79, 127.76, 127.17, 127.11, 126.31, 125.44, 125.25, 124.27, 120.28, 119.94, 119.92, 100.91, 85.49, 76.51, 73.74, 73.41, 70.07, 69.95, 69.18, 46.68, 25.45, 21.15, 17.95, -4.69, -4.80.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>SSiNa, 733.2626, found 733.2607.

## **Compound 94**

To a solution of **93** (20.5 mg, 28.83  $\mu$ mol) in THF (290  $\mu$ L) were added 1.0 M BH<sub>3</sub>·THF (288.3  $\mu$ L, 288.3  $\mu$ mol) and 1.0 M Bu<sub>2</sub>BOTf·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (28.83  $\mu$ L, 28.83  $\mu$ mol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred

for 10.5 h at 0 °C and the reaction was quenched with MeOH and sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silicagel column chromatography (toluene/EtOAc = 25/1) to give **94** (18.7 mg, 91%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.77$  (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.68 (dd, J = 12.7, 7.6 Hz, 2H), 7.44-7.37 (m, 4H), 7.37-7.28 (m, 7H), 7.05 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.18 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 5.05 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 10.2, 7.0 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.31 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 10.2, 7.0 Hz, 1H), 3.88 (dd, J = 10.0, 2.7 Hz, 1H), 3.86-3.80 (m, 1H), 3.73 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 2.35 (s, 1H), 2.30 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.16 (s, 3H), 0.11 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 154.39$ , 145.65, 143.51, 143.22, 141.29, 141.22, 138.26, 137.76, 132.47, 129.58, 129.51, 129.00, 128.36, 127.96, 127.83, 127.78, 127.75, 127.15, 127.06, 125.47, 125.15, 125.09, 119.99, 119.96, 119.90, 87.00, 78.81, 76.63, 75.56, 74.83, 74.75, 70.08, 62.09, 46.69, 25.56, 21.10, 17.88, -4.17, -5.14.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]+ calcd for C<sub>41</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>SSiNa, 735.2782, found 735.2781.



# **Compound 77**

To a solution of **94** (200.8 mg, 281.6  $\mu$ mol) and *N*,*N*-dimethyl-4-aminopyridine (3.5 mg, 28.16  $\mu$ mol) in pyridine (2.81 mL) was added benzoyl chloride (65.4  $\mu$ L, 563.3  $\mu$ mol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 3.5 h at rt, to the reaction solution were added *N*,*N*-dimethyl-4-aminopyridine (3.4 mg, 27.83  $\mu$ mol) and benzoyl chloride (65.0  $\mu$ L, 559.5  $\mu$ mol) at 0 °C. After being stirred for 3.5 h at rt and the reaction was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/EtOAc = 30/1) to give **77** (173.2 mg, 75%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.00$  (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.68 (dd, J = 15.8, 7.4 Hz, 2H), 7.59 (tt, J = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 7.48-7.25 (m, 13H), 6.88 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.21 (t, J = 9.5 Hz, 1H),

5.11 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.68-4.59 (m, 3H), 4.51 (dd, *J* = 11.5, 7.6 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 11.5, 4.6 Hz, 1H), 4.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.24 (dd, *J* = 10.3, 7.9 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 7.6, 3.5 Hz, 1H), 3.82 (d-br, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.17 (s, 3H), 0.12 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.23, 154.46, 143.56, 143.22, 141.32, 141.24, 138.12, 137.58, 133.13, 132.33, 129.99, 129.81, 129.69, 129.45, 128.37, 128.32, 127.92, 127.85, 127.80, 127.69, 127.17, 127.07, 125.52, 125.16, 120.01, 119.97, 87.26, 76.30, 75.50, 75.03, 74.74, 70.16, 64.09, 46.72, 25.58, 21.08, 17.91, -0.03, -4.15, -5.13.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>48</sub>H<sub>52</sub>O<sub>8</sub>SSiNa, 839.3044, found 839.3046.

### **Compound 78**

To a suspension of donor 77 (170.8 mg, 208.9  $\mu$ mol), acceptor 76 (100.1 mg, 174.1  $\mu$ mol), *N*-iodosuccinimide (47.9 mg, 208.9  $\mu$ mol), and MS4A powder (ca. 300 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.50 mL) was added trifluoromethanesulfonic acid (6.1  $\mu$ L, 69.65  $\mu$ mol) at -40 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at -40 °C, the reaction was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silicagel column chromatography (toluene/EtOAc = 50/1 to 20/1) to give 78 (167.0 mg, 76%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.96$  (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.78 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (dd, J = 7.5, 1.1 Hz, 2H), 7.58-7.54 (m, 1H), 7.48-7.39 (m, 4H), 7.33-7.27 (m, 6H), 7.25-7.18 (m, 8H), 7.18-7.11 (m, 3H), 5.84-5.75 (m, 1H), 5.19 (dq, J = 17.3, 1.5 Hz, 1H), 5.12 (dt, J = 11.7, 1.3 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 5.05-4.98 (m, 2H), 4.95 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.89 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.61-4.53 (m, 3H), 4.50 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 10.5, 6.3 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.31 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 4.05-3.96 (m, 2H), 3.96-3.89 (m, 2H), 3.69 (dd, J = 11.0, 2.9 Hz, 1H), 3.62-3.56 (m, 3H), 3.50 (dd, J = 9.7, 2.9 Hz, 1H), 3.45 (dd, J = 11.0, 1.6 Hz, 1H), 3.40 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.11, 154.33, 154.18, 143.41, 141.50, 141.38, 138.82, 138.38, 138.18, 133.39, 133.08, 129.85, 129.67, 128.41, 128.36, 128.29, 127.94, 127.92, 127.89, 127.73, 127.67, 127.58, 127.51, 127.45, 127.13, 127.10, 127.05, 124.84, 124.75, 120.10, 120.07, 117.83, 100.72, 96.58, 95.49, 77.71, 77.48, 77.21, 76.88, 75.17, 74.56, 74.18, 72.99, 72.21, 70.71, 69.47, 68.33, 67.65, 62.96, 54.70, 46.83, 25.59, 17.88, -4.23, -5.21.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>67</sub>H<sub>74</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>15</sub>SiNa 1290.3756, found 1290.3781.

BnO

## **Compound 95**

To a solution of **78** (2.083 g, 1.643 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20.0 mL) was added triethylamine (5.0 mL) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 16 h at rt, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The crude compound was azetropic-dried with toluene three times. The residue was purified by silicagel column chromatography (Toluene/AcOEt = 9/1 to 4/1) to give **95** (1.685 g, 98%) as a light yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.89 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.38-7.29 (m, 8H), 7.29-7.12 (m, 9H), 5.90-5.80 (m, 1H), 5.24 (dq, *J* = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 5.19 (dq, *J* = 10.4, 1.2 Hz, 1H), 5.05 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.72-4.63 (m, 4H), 4.57-4.52 (m, 3H), 4.33 (dd, *J* = 11.1, 6.1 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 4.13-4.10 (m, 1H), 4.05 (dd, *J* = 11.5, 3.0 Hz, 1H), 3.99-3.92 (m, 2H), 3.85-3.80 (m, 1H), 3.79-3.71 (m, 2H), 3.69 (dd, *J* = 11.5, 1.7 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz, 1H), 3.51 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.18 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 0.94 (s, 9H), 0.13 (s, 3H), 0.11 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 175.66$ , 169.56, 166.05, 138.93, 137.62, 133.02, 129.82, 129.57, 128.45, 128.34, 128.24, 127.96, 127.79, 127.75, 127.69, 127.51, 127.48, 127.07, 126.53, 126.32, 126.06, 125.84, 125.77, 125.60, 125.56, 102.81, 98.22, 77.38, 77.35, 77.20, 76.91, 75.98, 75.34, 75.08, 74.83, 73.58, 73.21, 72.68, 72.49, 71.14, 70.57, 68.22, 63.66, 63.41, 59.29, 51.87, 26.68, 25.90, 23.99, 18.27, -4.42, -4.47.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>52</sub>H<sub>64</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>13</sub>SiNa 1068.3075, found 1068.3083.

#### **Compound 80**

To a suspension of donor **79** (1.438 g, 2.66 mmol), acceptor **95** (926.7 mg, 0.886 mmol), *N*-iodosuccinimide (717.7 mg, 3.191 mmol), and MS4A powder (ca. 2.7 g) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (17.7 mL) was added trifluoromethanesulfonic acid (31.2  $\mu$ L, 0.354 mmol) at -40 °C under Ar atmosphere. After being stirred at -40 °C for 20 mins, the reaction was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (Toluene/AcOEt = 20/1 to 10/1) to give **80** (1.139 g, 88%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.01$  (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.57 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.40-7.27 (m, 20H), 7.25-7.17 (m, 10H), 5.87-5.78 (m, 1H), 5.50 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.23-5.17 (m, 1H), 5.10 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 5.03-4.93 (m, 5H), 4.89 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.84-4.59 (m, 9H), 4.54 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.37-4.18 (m, 3H), 4.14-4.04 (m, 4H), 4.00-3.83 (m, 4H), 3.69-3.64 (m, 2H), 3.61-3.46 (m, 3H), 1.14 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.02 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 176.37, 138.90, 138.65, 138.61, 138.57, 138.46, 138.10, 133.61, 133.08, 130.00, 129.62, 129.48, 128.45, 128.42, 128.34, 128.30, 128.27, 128.24, 128.21, 128.14, 128.12, 128.03, 128.00, 127.92, 127.67, 127.57, 127.53, 127.51, 127.47, 127.41, 127.31, 127.25, 127.13, 117.27, 100.95, 97.40, 93.96, 80.26, 79.15, 77.59, 77.31, 77.20, 77.05, 76.24, 76.09, 74.85, 74.61, 74.59, 74.20, 74.18, 73.28, 72.98, 72.76, 72.04, 71.93, 67.90, 66.72, 66.26, 26.09, 17.90, 16.73, 16.59, -0.02, -3.30, -4.80.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>79</sub>H<sub>92</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>17</sub>SiNa, 1484.5063, found 1484.5074.



## **Compound 96**

To a solution of **80** (1.13 g, 0.773 mmol) in THF (6.25 mL) was added 70% HF·pyridine (2.50 mL) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 16 h at rt, to the reaction mixture was added 70% HF·pyridine (2.19 mL) at rt. After being stirred for 13.5 h, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (Toluene/AcOEt = 20/1 to 9/1) to give **96** (894.4 mg, 86%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.98-7.94 (m, 2H), 7.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.46-7.38 (m, 6H), 7.36-7.29 (m, 13H), 7.24-7.13 (m, 13H), 5.86-5.77 (m, 1H), 5.20 (dd, *J* = 17.2, 1.4 Hz, 1H), 5.14 (dd, *J* = 10.4, 1.1 Hz, 1H), 5.00-4.54 (m, 17H), 4.38-4.23 (m, 4H), 4.11-4.04 (m, 3H), 3.96-3.87 (m, 3H), 3.83 (dd, *J* = 10.6, 2.7 Hz, 1H), 3.80-3.75 (m, 2H), 3.73-3.68 (m, 2H), 3.61-3.59 (br m, 1H), 3.57-3.47 (m, 4H), 1.02 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166.03, 154.17, 138.73, 138.63, 138.49, 138.42, 137.81, 137.19, 133.47, 133.07, 129.91, 129.67, 128.77, 128.52, 128.44, 128.41, 128.39, 128.33, 128.28, 128.25, 128.22, 128.19, 128.19, 128.10, 127.84, 127.75, 127.69, 127.54, 127.47, 127.35, 118.05, 101.03, 100.78, 96.47, 95.53, 81.42, 79.35, 77.40, 77.36, 77.22, 77.17, 75.43, 75.12, 74.79, 74.65, 74.61, 74.57, 73.89, 73.50, 72.96, 71.98, 70.59, 68.42, 67.93, 67.65, 62.84, 54.32, 16.79.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m*/*z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>73</sub>H<sub>78</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>17</sub>Na 1370.4198, found 1370.4225.



#### **Compound 97**

To a solution of **96** (731.8 mg, 0.543 mmol) in THF (5.4 mL) and AcOH (5.4 mL) was added Zn-Cu complex (ca. 1.40 g) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 1.5 h at rt, the reaction mixture was filtered, and concentrated *in vacuo* to give amine as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of crude product in pyridine (5.0 mL) were added Ac<sub>2</sub>O (5.0 mL) and *N*,*N*-dimethyl-4aminopyridine (6.7 mg, 54.3  $\mu$ mol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 2.5 d at rt, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, quenched with 1.0 M HCl aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (Toluene/AcOEt = 7/3) to give **97** (602.0 mg, 88% in 2 steps) as a light yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.01-7.95$  (m, 2H), 7.60-7.55 (m, 1H), 7.46 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.38-7.18 (m, 30H), 5.86-5.76 (m, 1H), 5.28 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.18 (dq, J = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.11 (dq, J = 10.5, 1.2 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.91-4.87 (m, 2H), 4.82 (dd, J = 10.1, 3.1 Hz, 2H), 4.80 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 4.72 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.69-4.63 (m, 4H), 4.57 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.30-4.03 (m, 8H), 3.94-3.88 (m, 2H), 3.82-3.74 (m, 2H), 3.62-3.57 (m, 2H), 3.54-3.45 (m, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.22, 169.71, 165.89, 138.89, 138.68, 138.55, 138.53, 137.79, 137.77, 133.74, 133.17, 129.71, 129.66, 129.60, 129.01, 128.57, 128.46, 128.38, 128.34, 128.30, 128.21, 128.17, 128.14, 127.85, 127.83, 127.78, 127.75, 127.62, 127.55, 127.35, 127.24, 125.27, 117.40, 100.71, 98.01, 96.50, 79.19, 77.40, 76.54, 76.36, 75.10, 74.99, 74.68, 74.30, 73.64, 73.42, 73.34, 73.25, 72.61, 71.75, 70.79, 68.13, 67.74, 66.77, 62.33, 51.96, 43.92, 23.32, 20.97, 16.68.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>74</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>17</sub>Na 1278.5397, found 1278.5433.


To a solution of **97** (602.0 mg, 0.479 mmol) in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> (9.6 mL) were added methyl acrylate (431  $\mu$ L, 4.79 mmol) and Grubbs catalyst 2nd generation (4.4 mg, 5.18  $\mu$ mol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 8.5 h at 50 °C, to the reaction mixture was added Grubbs catalyst 2nd generation (8.1 mg, 9.54  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 15.5 h at 50 °C, to the reaction mixture was added Grubbs catalyst 2nd generation (12.0 mg, 14.1  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 23 h at 50 °C, the reaction mixture were added Grubbs catalyst 2nd generation (12.0 mg, 14.1  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 23 h at 50 °C, the reaction mixture were added Grubbs catalyst 2nd generation (12.6 mg, 14.8  $\mu$ mol) and methyl acrylate (210  $\mu$ L, 2.22 mmol) at rt. After being stirred for 17.5 h, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (Toluene/AcOEt = 5/1 to 3/2 to 1/1) to give **98** (246.4 mg, 40%) as a light brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.00-7.96$  (m, 2H), 7.60-7.55 (m, 1H), 7.48-7.43 (m, 2H), 7.38-7.16 (m, 30H), 6.91 (dt, J = 15.8, 4.5 Hz, 1H), 5.97 (dt, J = 15.8, 1.9 Hz, 1H), 5.26 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.89 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.84 (dd, J = 10.0, 3.2 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.73-4.63 (m, 5H), 4.62 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.31-4.22 (m, 3H), 4.20 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 1H), 4.17-4.04 (m, 6H), 3.88 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 3.80 (dd, J = 11.0, 3.2 Hz, 1H), 3.76 (dd, J = 10.2, 2.7 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.63 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.61-3.47 (m, 4H), 1.87 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.16 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.22, 169.79, 166.22, 165.88, 143.33, 138.68, 138.65, 138.52, 137.75, 137.69, 133.17, 129.69, 129.64, 128.57, 128.44, 128.37, 128.35, 128.30, 128.27, 128.24, 128.17, 128.13, 127.86, 127.79, 127.73, 127.59, 127.53, 127.51, 127.22, 121.12, 100.83, 98.11, 96.96, 79.17, 77.84, 76.69, 76.46, 76.15, 75.08, 74.94, 74.89, 74.28, 73.90, 73.42, 73.40, 73.33, 72.44, 71.78, 71.14, 67.65, 66.84, 65.85, 62.33, 52.06, 51.67, 23.23, 20.97, 16.66.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>76</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>19</sub>Na 1336.5452, found 1336.5451.



To a solution of **98** (297.6 mg, 226.4  $\mu$ mol) in 'BuOH (2.83 mL), AcOH (1.13 mL), and H<sub>2</sub>O (566  $\mu$ L) was added palladium hydroxide on activated carbon (Pd 20%, wetted with ca.50% water, 158.9 mg, 1.13 mmol) at rt. After being stirred for 8 h under H<sub>2</sub> atmosphere with the pressure of 1.0 MPa, the reaction mixture was filtered through Hyflo Super-Cel<sup>®</sup> and concentrated *in vacuo* to give a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of crude product in THF (11.3 mL) and  $H_2O$  (11.3 mL) was added LiOH· $H_2O$  (95.0 mg, 2.26 mmol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 16 h at rt, the reaction mixture was quenched with AcOH (130 µL), concentrated *in vacuo*, and lyophilized with  $H_2O$ . The residue was purified by gel filtration chromatography (MeOH) to give **84** (119.1 mg, 85% in 2 steps) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 5.24 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.21 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 10.7, 3.6 Hz, 1H), 3.87-3.62 (m, 14H), 3.56 (dd, *J* = 7.7, 4.2 Hz, 1H), 3.41 (dt, *J* = 11.8, 4.8 Hz, 1H), 2.31-2.18 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.20 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 173.67, 166.29, 102.37, 101.62, 98.52, 78.60, 78.32, 77.06, 75.42, 73.55, 72.54, 71.69, 71.00, 70.75, 70.57, 68.92, 68.14, 62.60, 61.53, 55.03, 27.61, 22.56, 16.78.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z  $[M-H]^-$  calcd for C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>17</sub> 614.2291, found 614.2304.



To a suspension of donor **16** (60.1 mg, 152.5  $\mu$ mol), acceptor **96** (100.9 mg, 74.86  $\mu$ mol), and MS4A powder (ca. 300 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (748.6  $\mu$ L, 0.05 M) and toluene (748.6  $\mu$ L, 0.05 M) were added Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (42.1 mg, 152.7  $\mu$ mol) and AgClO<sub>4</sub> (about 9 mg, 43.4  $\mu$ mol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 13.5 h at rt, the reaction mixture was filtered, washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/EtOAc = 15/1) to give **100** (111.7 mg, 90%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.99 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 7.56 (tt, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 7.50-7.43 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 19H), 7.24-7.12 (m, 9H), 5.90-5.80 (m, 1H), 5.55 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.27-5.17 (m, 4H), 5.15-5.10 (m, 2H), 5.06 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 5.02-4.98 (m, 2H), 4.91 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.85 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.78-4.72 (m, 3H), 4.69-4.55 (m, 6H), 4.37 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 11.2, 6.0 Hz, 1H), 4.26-4.15 (m, 3H), 4.12-3.96 (m, 7H), 3.94-3.86 (m, 2H), 3.82-3.75 (m, 2H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.61-3.46 (m, 5H), 3.37 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 10.9, 3.2 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.87, 169.74, 169.59, 166.08, 154.19, 139.56, 138.74, 138.71, 138.63, 138.56, 137.91, 133.68, 133.11, 129.92, 129.70, 129.03, 128.59, 128.50, 128.46, 128.30, 128.22, 128.11, 128.08, 128.06, 127.90, 127.78, 127.68, 127.64, 127.44, 127.35, 127.27, 127.05, 125.30, 117.60, 100.45, 97.53, 97.47, 96.69, 95.49, 79.95, 77.84, 77.47, 77.23, 76.38, 76.26, 75.63, 75.25, 74.86, 74.68, 74.64, 74.49, 74.38, 73.52, 72.13, 72.02, 70.97, 69.28, 68.28, 67.78, 67.69, 66.30, 62.92, 62.31, 59.32, 54.54, 53.42, 21.45, 20.65, 20.63, 20.46, 16.74.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>85</sub>H<sub>93</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>24</sub>Na, 1683.5108, found 1683.5104.

108



To a solution of **100** (622.2 mg, 0.375 mmol) in THF (3.8 mL) and AcOH (3.8 mL) was added Zn-Cu complex (ca. 1.90 g) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 3 h at rt, the reaction mixture was filtered, and concentrated *in vacuo* to give amine as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of crude product in pyridine (6.0 mL) was added  $Ac_2O$  (6.0 mL) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 1.5 d at rt, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, quenched with 1.0 M HCl aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (Toluene/AcOEt = 1/1) to give **101** (432.7 mg, 75% in 2 steps) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.42-7.27 (m, 12H), 7.25-7.15 (m, 18H), 5.89-5.79 (m, 1H), 5.58-5.45 (m, 2H), 5.32-5.17 (m, 4H), 5.13-5.03 (m, 2H), 5.01-4.87 (m, 5H), 4.70-4.50 (m, 11H), 4.43-4.24 (m, 5H), 4.23-4.13 (m, 3H), 4.08 (dd, *J* = 13.2, 5.1 Hz, 1H), 4.00 (br s, 1H), 3.94 (dd, *J* = 13.2, 5.7 Hz, 1H), 3.92-3.85 (m, 3H), 3.76-3.54 (m, 6H), 3.04 (brs, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 1.51 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.53, 170.40, 170.13, 169.94, 169.73, 165.99, 139.14, 138.86, 138.45, 138.15, 138.03, 137.64, 133.81, 133.30, 129.66, 129.60, 128.53, 128.48, 128.34, 128.30, 128.26, 128.24, 128.18, 127.92, 127.72, 127.68, 127.58, 127.50, 127.41, 127.18, 127.15, 126.57, 117.06, 100.82, 98.36, 96.46, 80.42, 77.64, 76.82, 75.92, 75.50, 74.65, 73.72, 73.64, 73.47, 72.10, 71.38, 71.07, 68.59, 67.94, 67.65, 67.12, 66.79, 62.85, 52.10, 47.06, 23.29, 22.62, 20.62, 20.60, 20.43, 16.72.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>86</sub>H<sub>98</sub>N<sub>2</sub>O<sub>24</sub>Na, 1565.6402, found 1565.6394.



To a solution of **101** (21.0 mg, 13.6  $\mu$ mol) in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> (270  $\mu$ L) were added methyl acrylate (12.26  $\mu$ L, 136  $\mu$ mol) and Grubbs catalyst 2nd generation (2.34 mg, 2.76  $\mu$ mol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at 50 °C, the reaction mixture was added methyl acrylate (12.25  $\mu$ L, 136  $\mu$ mol) and Grubbs catalyst 2nd generation (2.33 mg, 2.74  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 11 h at 50 °C, the reaction mixture was heated to 80 °C. After being stirred for 31.5 h at 80 °C, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 3/1) to give **102** (17.3 mg, 79%) as a brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8.02$ -7.97 (m, 2H), 7.61-7.56 (m, 1H), 7.47 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.41-7.16 (m, 30H), 6.94 (dt, J = 15.8, 4.4 Hz, 1H), 6.00 (dt, J = 15.8, 2.0 Hz, 1H), 5.62 (brs, 1H), 5.47 (brs, 1H), 5.25-5.18 (m, 3H), 5.06 (dd, J = 11.6, 3.2 Hz, 1H), 5.03-4.85 (m, 4H), 4.70-4.49 (m, 10H), 4.46-4.21 (m, 7H), 4.19-4.13 (m, 2H), 4.10 (ddd, J = 16.1, 4.7, 2.0 Hz, 1H), 4.01 (brs, 1H), 3.93-3.85 (m, 3H), 3.81 (s, 1H), 3.78-3.52 (m, 7H), 3.71 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.26 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170.60, 170.53, 170.19, 170.01, 169.93, 166.23, 166.04, 143.48, 139.15, 138.68, 138.61, 138.22, 137.97, 137.63, 133.37, 129.69, 129.60, 128.59, 128.54, 128.36, 128.34, 128.29, 128.12, 128.05, 127.78, 127.77, 127.65, 127.58, 127.57, 127.23, 127.18, 126.72, 126.63, 120.99, 100.92, 98.33, 96.84, 80.23, 77.62, 75.86, 75.48, 75.10, 73.80, 73.72, 73.49, 72.10, 71.90, 71.72, 71.04, 68.53, 67.85, 67.65, 67.12, 66.88, 65.68, 62.86, 52.19, 51.77, 47.08, 23.27, 22.65, 20.68, 20.66, 20.49, 16.72.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{88}H_{100}N_2O_{26}Na$  1623.6457, found 1623.6506.



To a solution of **102** (171.1 mg, 106.9  $\mu$ mol) in 'BuOH (1.34 mL), AcOH (535  $\mu$ L), and H<sub>2</sub>O (267  $\mu$ L) was added palladium hydroxide on activated carbon (Pd 20%, wetted with ca.50% water, 75.02 mg, 534.3  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 20.5 h under H<sub>2</sub> atmosphere with the pressure of 1.0 MPa, the reaction mixture was filtered through Hyflo Super-Cel<sup>®</sup> and concentrated *in vacuo* to give a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction. To a solution of crude product in THF (5.3 mL) and H<sub>2</sub>O (5.3 mL) was added LiOH·H<sub>2</sub>O (45.2 mg, 1.08 mmol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 24.5 h at rt, the reaction mixture was quenched with AcOH (61.1  $\mu$ L), concentrated *in vacuo*, and lyophilized with H<sub>2</sub>O. The residue was purified by gel filtration chromatography (MeOH only) to give **81** (69.4 mg, 79% in 2 steps) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 5.33$  (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 13.0, 6.3 Hz, 1H), 4.32 (dd, J = 11.0, 3.6 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 6.6, 5.0 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.03-3.89 (m, 4H), 3.86-3.61 (m, 14H), 3.54 (dd, J = 7.2, 4.8 Hz, 1H), 3.42 (dt, J = 11.6, 4.8 Hz, 1H), 2.37-2.23 (m, 2H), 2.01 (d, J = 4.2 Hz, 6H), 1.91-1.86 (m, 2H), 1.21 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 180.16, 174.47, 173.62, 102.11, 100.28, 98.53, 93.56, 78.45, 77.93, 76.85, 73.56, 73.47, 72.69, 72.65, 71.83, 71.17, 70.54, 70.01, 69.83, 68.70, 67.71, 64.95, 63.36, 62.54, 61.53, 55.09, 51.27, 49.85, 34.31, 27.23, 22.76, 22.55, 16.68.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>32</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>22</sub> 817.3084, found 817.3113.



To a suspension of donor **82** (26.3 mg, 47.4  $\mu$ mol), acceptor **96** (20.3 mg, 15.1  $\mu$ mol), *N*-iodosuccinimide (12.6 mg, 56.0  $\mu$ mol), and MS4A powder (ca. 63 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (301.2  $\mu$ L) was added trifluoromethanesulfonic acid (0.5  $\mu$ L, 5.66  $\mu$ mol) at -60 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 30 mins at -60 °C, the reaction mixture was diluted with CHCl<sub>3</sub>, quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/AcOEt = 7/1) to give **104** (24.5 mg, 91%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.97-7.92$  (m, 2H), 7.57-7.52 (m, 1H), 7.52-7.49 (m, 2H), 7.46-7.39 (m, 7H), 7.38-7.26 (m, 15H), 7.23-7.06 (m, 23H), 5.87-5.78 (m, 1H), 5.63 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 5.22-5.16 (m, 1H), 5.11-5.07 (m, 1H), 5.01-4.95 (m, 4H), 4.90 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.77-4.61 (m, 10H), 4.57 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.49 (t, J = 10.7 Hz, 2H), 4.35-4.25 (m, 4H), 4.21-4.00 (m, 7H), 3.99-3.93 (m, 2H), 3.93-3.87 (m, 1H), 3.85-3.75 (m, 5H), 3.67 (dd, J = 9.7, 2.6 Hz, 1H), 3.61-3.47 (m, 5H), 3.40 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.25 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 1.17 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 165.84, 154.17, 139.18, 138.67, 138.63, 138.60, 138.53, 138.39, 138.10, 137.96, 137.92, 133.64, 130.06, 129.89, 129.66, 128.54, 128.38, 128.29, 128.25, 128.19, 128.10, 128.03, 127.96, 127.94, 127.83, 127.70, 127.64, 127.57, 127.44, 127.34, 127.25, 127.20, 126.33, 117.43, 100.77, 100.51, 97.46, 97.23, 96.53, 95.45, 80.59, 80.23, 76.39, 76.09, 75.69, 74.97, 74.91, 74.78, 74.62, 74.26, 74.19, 74.12, 73.62, 73.51, 72.25, 72.04, 71.33, 71.22, 69.25, 68.11, 67.96, 67.19, 66.20, 63.41, 62.70, 54.49, 33.88, 28.55, 16.70.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>100</sub>H<sub>104</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>22</sub>Na, 1801.6012, found 1801.6016.



**Compound 105** 

To a solution of **104** (77.9 mg, 43.8  $\mu$ mol) in THF (440  $\mu$ L) and AcOH (440  $\mu$ L) was added Zn-Cu complex (ca. 80 mg) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 4.5 h at rt, to the reaction mixture was added Zn-Cu complex (ca. 84 mg). After being stirred for 2.5 h at rt, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo* to give amine as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of crude product in pyridine (2.0 mL) was added  $Ac_2O$  (2.0 mL) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 6.5 h at rt, the reaction mixture diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The reaction mixture was dissolved in CHCl<sub>3</sub>, washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/AcOEt = 35/1) to give **105** (71.0 mg, 99% in 2 steps) as a light yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.97-7.93 (m, 2H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.52-7.49 (m, 2H), 7.46-7.39 (m, 7H), 7.38-7.25 (m, 17H), 7.24-7.06 (m, 21H), 5.87-5.77 (m, 1H), 5.64 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.29-5.25 (m, 2H), 5.18 (dd, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 10.4, 1.6 Hz, 1H), 4.98 (t, *J* = 10.1 Hz, 2H), 4.90 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.73-4.60 (m, 8H), 4.56 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.38-4.25 (m, 5H), 4.21 (dd, *J* = 11.0, 6.6 Hz, 1H), 4.17-4.10 (m, 3H), 4.09-4.00 (m, 4H), 3.97-3.91 (m, 2H), 3.87-3.75 (m, 5H), 3.68 (dd, *J* = 9.7, 2.6 Hz, 1H), 3.62-3.55 (m, 3H), 3.54-3.47 (m, 1H), 3.44-3.38 (m, 1H), 3.27 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.20 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.76, 165.89, 139.16, 138.96, 138.70, 138.67, 138.53, 138.40, 138.10, 138.03, 137.97, 137.94, 133.83, 133.08, 129.66, 129.01, 128.84, 128.54, 128.52, 128.42, 128.37, 128.31, 128.23, 128.20, 128.12, 128.08, 128.06, 127.99, 127.82, 127.71, 127.66, 127.63, 127.56, 127.33, 127.28, 127.26, 127.16, 126.33, 117.16, 100.76, 100.59, 97.49, 97.23, 96.47, 80.59, 80.27, 77.36, 77.32, 76.40, 76.10, 75.67, 75.03, 74.90, 74.80, 74.61, 74.56, 74.18, 74.12, 73.69, 73.67, 73.51, 72.29, 72.04, 71.33, 69.28, 69.25, 69.22, 68.05, 68.01, 66.18, 63.41, 62.76, 52.19, 23.32, 21.43, 16.74.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) *m*/*z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>99</sub>H<sub>105</sub>NO<sub>21</sub>Na, 1667.7105, found 1667.7130.



To a solution of **105** (20.2 mg, 12.3  $\mu$ mol) in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> (246  $\mu$ L, 0.05 M) were added methyl acrylate (11.0  $\mu$ L, 123  $\mu$ mol) and Grubbs catalyst 2nd generation (1.03 mg, 1.21  $\mu$ mol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 1.5 h at 50 °C, to the reaction mixture was added methyl acrylate (11.0  $\mu$ L, 123  $\mu$ mol) and Grubbs catalyst 2nd generation (1.12 mg, 1.32  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 30 mins at 50 °C, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/AcOEt = 1/4) to give **106** (14.9 mg, 71%) as a light yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.97-7.93$  (m, 2H), 7.58-7.53 (m, 1H), 7.52-7.48 (m, 2H), 7.46-7.39 (m, 6H), 7.37-7.32 (m, 7H), 7.30-7.06 (m, 32H), 6.93 (dt, J = 15.8, 4.4 Hz, 1H), 5.98 (dt, J = 15.8, 1.9 Hz, 1H), 5.62 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.39 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.17 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.01-4.94 (m, 3H), 4.89 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.72-4.61 (m, 7H), 4.57 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.48 (t, J = 11.4 Hz, 2H), 4.34 (q, J = 6.5 Hz, 1H), 4.29 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.27 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.25-4.19 (m, 2H), 4.17-4.02 (m, 5H), 4.00 (dd, J = 10.2, 3.9 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.87-3.76 (m, 5H), 3.71 (s, 2H), 3.71-3.67 (m, 1H), 3.66-3.64 (m, 1H), 3.59 (dd, J = 11.1, 1.4 Hz, 1H), 3.57-3.47 (m, 3H), 3.38 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.28 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.26 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169.83, 166.20, 165.88, 143.41, 139.17, 138.87, 138.76, 138.62, 138.54, 138.38, 138.09, 137.95, 137.93, 133.09, 129.86, 129.64, 128.82, 128.53, 128.41, 128.33, 128.29, 128.22, 128.19, 128.07, 127.97, 127.83, 127.71, 127.67, 127.63, 127.51, 127.50, 127.47, 127.42, 127.31, 127.23, 127.17, 126.31, 120.91, 100.73, 100.69, 97.49, 97.15, 96.81, 80.51, 80.14, 78.03, 76.35, 75.97, 75.65, 75.00, 74.87, 74.84, 74.75, 74.53, 74.18, 74.12, 73.75, 73.60, 73.51, 72.07, 72.01, 71.70, 71.31, 69.21, 67.94, 66.23, 65.71, 63.39, 62.77, 52.29, 51.70, 23.24, 16.72.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>101</sub>H<sub>107</sub>NO<sub>23</sub>Na, 1724.7126, found 1724.7167.



To a solution of **106** (300.7 mg, 177  $\mu$ mol) in 'BuOH (2.21 mL), AcOH (880  $\mu$ L), and H<sub>2</sub>O (440  $\mu$ L) was added palladium hydroxide on activated carbon (Pd 20%, wetted with ca.50% water, 124.1 mg, 884  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 12 h under H<sub>2</sub> atmosphere with the pressure of 1.0 MPa, the reaction mixture was filtered through Hyflo Super-Cel<sup>®</sup> and concentrated *in vacuo* to give a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction. To a solution of crude product in THF (9.0 mL) and H<sub>2</sub>O (9.0 mL) was added LiOH·H<sub>2</sub>O (74.9 mg, 1.79 mmol) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 16.5 h at rt, the reaction mixture was quenched with AcOH (100  $\mu$ L), concentrated *in vacuo*, and lyophilized with H<sub>2</sub>O. The residue was purified by gel filtration chromatography (MeOH only) to give **83** (115.4 mg, 84%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 5.32 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 4.76 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.35 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.17-4.11 (m, 2H), 4.02-3.89 (m, 4H), 3.88-3.55 (m, 16H), 3.45-3.38 (m, 1H), 2.33-2.21 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.20 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 180.79, 173.65, 102.19, 100.36, 98.59, 96.10, 79.76, 78.58, 76.68, 73.69, 73.62, 73.12, 72.65, 71.84, 71.44, 71.33, 71.18, 70.06, 69.93, 68.88, 67.70, 65.82, 63.35, 62.67, 61.58, 55.06, 49.90, 34.87, 27.51, 22.59, 16.70.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z [M-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>22</sub>, 776.2819, found 776.2836.



 $O_3$  was bubbled into a solution of **153** (8.84 g, 20.11 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (201 mL) at -78 °C. After being stirred for 40 mins, the solution became blue because of remaining O<sub>3</sub>. Then, the bubbling gas was changed from O<sub>3</sub> to O<sub>2</sub> and the solution was stirred until the color was disappeared. After stopping O<sub>2</sub> bubbling, PPh<sub>3</sub> (7.90 g, 30.16 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.0 mL) was added to the reaction mixture. After being stirred for 2 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and roughly purified with silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 30/1) to give aldehyde as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of obtained crude product in 'BuOH (161 mL) and H<sub>2</sub>O (40 mL) were added 2-Methyl-2-butene (10.7 mL, 100.6 mmol), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (3.14 g, 20.1 mmol), and NaClO<sub>2</sub> (5.46 g, 60.3 mmol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 14 h at rt, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl aq. and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give carboxylic acid as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of obtained crude product in DMF (101 mL) were added  $K_2CO_3$  (5.60 g, 40.2 mmol), MeI (2.50 mL, 40.2 mmol), at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 1.5 h at rt, the reaction mixture was quenched with H<sub>2</sub>O and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by recrystalization with CHCl<sub>3</sub> and Hexane to give **154** (7.76 g, 16.5 mmol, 82% in 3 steps) as a yellow solid.

<sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR, and HRMS were identical to the previous report<sup>1</sup>.



To a solution of **154** (1.00 g, 2.12 mmol) in CH<sub>2</sub>ClCH<sub>2</sub>Cl (21.3 mL) were added *i*-Pr<sub>2</sub>NEt (3.70  $\mu$ L, 21.2 mmol) and AcCl (1.51 mL, 21.2 mmol) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at 80 °C, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/AcOEt = 5/1) to give **155** (1.02 g, 93%) as a yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.51-7.46 (m, 2H), 7.42-7.36 (m, 3H), 7.31-7.26 (m, 2H), 7.26-7.21 (m, 3H), 5.59 (s, 1H), 4.98 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.78 (dd, *J* = 11.1, 8.6 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.61 (dd, *J* = 11.1, 3.8 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 10.3, 5.0 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.99 (td, *J* = 9.9, 5.0 Hz, 1H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.34 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 175.5, 169.6, 138.6, 137.4, 129.1, 128.4, 127.9, 127.7, 126.2, 101.3, 98.8, 83.8, 75.1, 74.0, 68.8, 64.0, 63.4, 58.8, 52.0, 26.8.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>9</sub>Na, 536.1891, found 536.1904.



# **Compound 146**

To a solution of **155** (381.7 mg, 0.743 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.43 mL) and Et<sub>3</sub>SiH (1.18 mL, 7.43 mmol, dried over MS4A and passed through neutral alumina column before using.) was added BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (560  $\mu$ L, 4.46 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) at -20 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 2 h under 0 °C, the reaction mixture was added BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (280  $\mu$ L, 2.23 mmol) at -20 °C. After being stirred for 3 h at 0 °C, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. at 0 °C and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/acetone = 7/1) to give **146** (247.3 mg, 66%) as a yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.38-7.27 (m, 10H), 5.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 11.0, 3.6 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 3.83 (dt, *J* = 9.6, 4.2 Hz, 1H), 3.74-3.66 (m, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.42 (br-d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 2.36 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 175.83, 169.63, 138.72, 137.72, 128.52, 128.46, 127.83, 127.78, 127.71, 98.14, 78.38, 73.68, 73.28, 73.03, 70.86, 69.52, 63.35, 59.08, 51.87, 26.66.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>9</sub>Na, 538.2048, found 538.2055.



## **Compound 145**

To a solution of **154** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.06 mL) and Et<sub>3</sub>SiH (101.4  $\mu$ L, 0.636 mmol, dried over MS4A and passed through neutral alumina column before using.) was added BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (79.9  $\mu$ L, 0.636 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.06 mL) at -20 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at -10 °C, the reaction mixture was heated to 0 °C. After being stirred for 3.5 h at 0 °C, the reaction mixture was heated to rt. After being stirred for 1.5 h under rt, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/AcOEt = 7/1) to give **145** (76.3 mg, 76%) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and HRMS were identical to the previous report<sup>1</sup>.



To a solution of **93** (302.8 mg, 0.425 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.52 mL) were added trifluoroacetic acid (352  $\mu$ L) and H<sub>2</sub>O (352  $\mu$ L) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at 50 °C, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was roughly purified by silica-gel column chromatography (toluene/EtOAc = 4/1) to give diol as a crude mixture. This crude mixture was used for next reaction.

To a solution of crude product in pyridine (1.7 mL) were added *N*,*N*-dimethyl-4-aminopyridine (4.5 mg, 0.0351 mmol) and acetic anhydride (1.7 mL) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 20 mins at rt, the reaction mixture was quenched with 1.0 M HCl aq. and extracted with  $CH_2Cl_2$ . The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/EtOAc = 13/1) to give **144** (219.2 mg, 73% in 2 steps) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.70-7.65 (m, 2H), 7.44-7.39 (m, 4H), 7.34-7.29 (m, 2H), 7.12-7.08 (m, 2H), 5.30-5.28 (m, 1H), 4.96 (dd, *J* = 10.0, 9.3 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 4.63 (dd, *J* = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 4.34-4.25 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 3.89-3.83 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 0.79 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8: 170.52, 170.12, 154.42, 143.43, 143.21, 141.33, 141.27, 138.17, 132.87, 129.57, 129.43, 127.90, 127.86, 127.18, 127.11, 125.43, 125.13, 120.06, 120.02, 87.20, 77.21, 74.81, 74.63, 72.19, 70.25, 69.86, 62.41, 46.72, 25.32, 21.13, 20.70, 20.68, 17.75, -4.88, -5.23.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z  $[M+Na]^+$  calcd for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>O<sub>9</sub>SSiNa, 729.2524, found 729.2509.



To a suspension of donor 144, acceptor 145, *N*-iodosuccinimide (13.7 mg, 60.9  $\mu$ mol), and MS4A powder (ca. 50 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.00 mL) was added trifluoromethanesulfonic acid (1.8  $\mu$ L, 20.1  $\mu$ mol) at -20 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 2 h at -20 °C, the reaction mixture was heated to 0 °C. After being stirred for 1.5 h at 0 °C, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/acetone = 1/1) to give the mixture of 147 and accepter 145 as a light yellow oil. Yield was estimated by NMR (NMR yield : 24%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.79 (dd, *J* = 7.6, 4.1 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.37-7.22 (m, 12H), 5.76-5.73 (m, 1H), 5.08 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.58-4.53 (m, 2H), 4.46 (dd, *J* = 11.0, 6.5 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.26-4.20 (m, 3H), 4.12 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.08 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 11.5, 6.8 Hz, 1H), 3.72-3.57 (m, 7H), 3.48-3.41 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 0.79 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.04 (s, 3H).

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>56</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>17</sub>SiNa, 1078.4227, found 1078.4221.

### **Compound 148**

To a suspension of donor 144 (25.9 mg, 36.65  $\mu$ mol), acceptor 146 (15.8 mg, 30.5  $\mu$ mol), *N*-iodosuccinimide (8.25 mg, 36.65  $\mu$ mol), and MS4A powder (ca. 32 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (610  $\mu$ L) was added trifluoromethanesulfonic acid (1.1  $\mu$ L, 12.21  $\mu$ mol) at -20 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 20 mins at -20 °C, the reaction

mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (hexane/EtOAc = 1/1) to give **148** (25.4 mg, 76%) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.79 (dd, *J* = 7.6, 2.6 Hz, 2H), 7.62 (dd, *J* = 7.3, 2.6 Hz, 2H), 7.43 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.36-7.19 (m, 12H), 5.06 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 9.4, 8.1 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.63-4.56 (m, 3H), 4.48 (dd, *J* = 10.3, 6.2 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 11.3, 3.7 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.16 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.11 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.96 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 11.3, 6.6 Hz, 1H), 3.76-3.69 (m, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.44-3.36 (m, 3H), 2.30 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 0.77 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), - 0.06 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 175.49$ , 170.33, 169.95, 169.45, 154.12, 143.45, 143.40, 141.53, 141.38, 139.18, 137.90, 128.47, 127.93, 127.89, 127.85, 127.78, 127.34, 127.14, 127.12, 127.02, 124.82, 124.79, 120.07, 120.05, 100.08, 98.24, 77.90, 77.20, 76.61, 76.04, 73.22, 71.11, 70.91, 70.64, 69.45, 69.22, 67.39, 63.85, 61.46, 59.06, 51.84, 46.81, 26.72, 25.30, 20.62, 17.67, -4.93, -5.32.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>58</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>18</sub>SiNa, 1120.4333, found 1120.4320.

#### **Compound 156**

To a solution of crude product of 147 (12.6 mg, 11.9  $\mu$ mol, calculated from NMR yield, including 1) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800  $\mu$ L) was added triethylamine (200  $\mu$ L) at rt under Ar atmosphere. After being stirred for 14.5 h at rt, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The crude compound was azetropic-dried with toluene three times, and dried under reduced pressure. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/acetone = 1/1) to give 156 (9.3 mg, 94%) as a light yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.37-7.25 (m, 10H), 5.84 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.89

(d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.62-4.60 (m, 1H), 4.54 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.31-4.26 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 4.13 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 11.6, 3.3 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 11.4, 6.2 Hz, 1H), 3.91-3.86 (m, 2H), 3.79-3.73 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.68 (dd, *J* = 11.6, 1.7 Hz, 1H), 3.57 (t, 6.9 Hz, 1H), 3.53-3.51 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 0.85 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>SiNa, 856.3546, found 856.3509.

### **Compound 157**

To a solution of **148** (23.7 mg, 21.58  $\mu$ mol) in dried CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (345.3  $\mu$ L) was added triethylamine (86.3  $\mu$ L) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 3 h at rt, the solution was added dried CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.60 mL) and triethylamine (400  $\mu$ L) at rt. After being stirred for 13.5 h at rt, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo*. The crude compound was azetropic-dried with toluene three times, and dried under reduced pressure. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/acetone = 5/1) to give **157** (17.8 mg, 94%) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.37 (d, *J* = 4.4 Hz, 4H), 7.34-7.19 (m, 6H), 5.10 (dd, *J* = 3.6, 0.9 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.79-4.74 (m, 1H), 4.73 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 11.0, 3.9 Hz, 1H), 4.21-4.13 (m, 3H), 4.06 (dd, *J* = 11.4, 2.8 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 11.4, 6.4 Hz, 1H), 3.93 (dt, *J* = 10.0, 2.1 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 11.4, 6.7 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.67 (dd, *J* = 11.4, 1.7 Hz, 1H), 3.57-3.45 (m, 3H), 2.31 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), 0.07 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8: 175.65, 170.39, 169.99, 169.53, 138.98, 137.48, 128.51, 128.11, 127.97, 127.94, 127.31, 102.65, 98.27, 77.59, 77.31, 77.18, 73.80, 73.03, 72.94, 72.73, 71.04, 71.01, 69.41, 68.23, 63.67, 61.97, 59.31, 51.90, 26.71, 25.58, 20.63, 18.07, -4.71, -5.01.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]+ calcd for C43H61NO16SiNa, 898.3652, found 898.3693.

### **Compound 149**

To a suspension of donor **79**, acceptor **156**, *N*-iodosuccinimide (7.9 mg, 35.11 µmol), and MS4A powder (ca. 20 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (223 µL) were added trifluoromethanesulfonic acid (0.3 µL, 3.35 µmol) at -30 °C under Ar atmosphere. After being stirred at -30 °C for 40 min, the solution was heated to -10 °C. After being stirred at - 10 °C for 30 min, donor **30** (18.7 mg, 34.6 µmol) was added to the solution. After being stirred for 1.5 h, the solution was heated to rt. After being stirred at rt for 15.5 h, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative layer chromatography (toluene/acetone = 2/1) to give **149** (6.3 mg, 45%) as a light yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$ : 7.41-7.19 (m, 25H), 5.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.47 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.02-4.96 (m, 3H), 4.92 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.75-4.68 (m, 5H), 4.63 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.38-4.33 (m, 1H), 4.24 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.23-4.05 (m, 5H), 3.98-3.80 (m, 6H), 3.67 (s, 3H), 3.59-3.51 (m, 2H), 3.46 (dd, J = 10.8, 1.5 Hz, 1H), 3.42-3.37 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>68</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>19</sub>SiNa 1250.5714, found 1250.5686.



To a suspension of donor **79**, acceptor **157**, *N*-iodosuccinimide (36.5 mg, 162.2 µmol), and MS4A powder (ca. 100 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.06 mL) was added and trifluoromethanesulfonic acid (1.41 µL, 16.0 µmol) at -30 °C under Ar atmosphere. After being stirred at -30 °C for 20 min, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. and 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq. and extracted with CHCl<sub>3</sub>. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica-gel column chromatography (toluene/acetone = 5/1) to give **150** (57.2 mg, 83%) as a light yellow oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 7.42-7.19 (m, 25H), 5.46 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 5.01-4.97 (m, 3H), 4.94 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.74-4.68 (m,4H), 4.64 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.53 (dt, *J* = 10.6, 5.0 Hz, 2H), 4.42-4.35 (m, 3H), 4.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.14-4.06 (m, 3H), 3.99-3.93 (m, 2H), 3.89-3.78 (m, 5H), 3.66 (s, 3H), 3.53 (dd, *J* = 9.3, 3.4 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 10.8, 1.5 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.00 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.28 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.79 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.01 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) & 175.49, 170.41, 170.16, 169.66, 139.02, 138.97, 138.80, 138.65, 137.90, 128.59, 128.36, 128.22, 128.14, 127.99, 127.97, 127.92, 127.79, 127.68, 127.57, 127.50, 127.31, 127.19, 127.15, 100.52, 98.74, 97.43, 79.99, 77.51, 76.27, 76.04, 75.91, 74.97, 74.26, 73.74, 73.52, 73.42, 73.32, 71.73, 71.27, 70.59, 70.33, 67.77, 66.53, 64.49, 61.95, 59.15, 51.81, 26.66, 25.75, 20.69, 20.65, 17.57, 16.70, -4.07, -4.57.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>70</sub>H<sub>89</sub>NO<sub>20</sub>SiNa 1314.5639, found 1314.5661.



**Compound S1** 

To a solution of **150** (4.6 mg, 3.559  $\mu$ mol) in DMF (500  $\mu$ L) was added tris(dimethylamino) sulfonium difluorotrimethylsilicate (27.9 mg, 101.3  $\mu$ mol) in DMF (500  $\mu$ L) under rt under Ar atmosphere. After being stirred for 30 min at rt, the reaction mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. The organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, concentrated *in vacuo*. Purified with PLC (toluene/acetone = 4/1) to give a crude compound.

To a solution of crude compound in THF (330  $\mu$ L) and MeOH (110  $\mu$ L) were added LiOH·H<sub>2</sub>O (0.93 mg, 22.05  $\mu$ mol) in H<sub>2</sub>O (20  $\mu$ L) at 0 °C under Ar atmosphere. After being stirred for 1 h at 0 °C, the reaction mixture was quenched with DOWEX<sup>TM</sup>, filtered, and concentrated *in vacuo*. Purified with PLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1/1) to give carboxylic acid **S1** (4.1 mg, 90%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 7.40-7.07 (m, 25H), 5.34 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.98 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.82 (dd, J = 11.3, 7.2 Hz, 2H), 4.66-4.60 (m, 4H), 4.54 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.26 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.14 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 4.02 (dd, J = 10.7, 3.7 Hz, 1H), 3.97 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 3.93-3.85 (m, 2H), 3.74-3.61 (m, 8H), 3.56-3.52 (m, 1H), 3.47 (dd, J = 9.7, 3.5 Hz, 1H), 3.43 (dd, J = 12.1, 3.5 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 10.9, 1.3 Hz, 1H), 3.25 (s, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.11 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>57</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>17</sub>Na 1060.4307, found 1060.4285.



**Compound 151** 

To a solution of **S1** in MeOH (800  $\mu$ L) was added palladium hydroxide on activated carbon (Pd 20%, wetted with ca.50% water, 46.3 mg, 65.95  $\mu$ mol) in MeOH (300  $\mu$ L) at rt. After being stirred for 1 h under H<sub>2</sub> atmosphere with the pressure of 1.0 MPa, the reaction mixture was filtered through Hyflo Super-Cel<sup>®</sup> and concentrated *in vacuo* to give **151** (2.3 mg, quant.) as a colorless oil.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 5.25 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.22 (dd, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 1H), 4.11-4.04 (m, 2H), 3.93-3.73 (m, 10H), 3.72-3.56 (m, 4H), 2.04 (s, 3H), 1.22 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 177.00, 173.63, 102.38, 101.74, 98.87, 78.84, 77.96, 77.14, 75.40, 73.56, 72.71, 71.81, 71.70, 70.84, 70.61, 68.25, 67.97, 62.70, 61.41, 54.60, 22.79, 16.69.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>17</sub>Na, 610.1954, found 610.1947.



# **Compound 164**

To a solution of compound **83** (5.6 mg, 7.20  $\mu$ mol) in anhydrous DMF (145  $\mu$ L) were added TSTU (3.5 mg, 11.6  $\mu$ mol) and DIPEA (3.8  $\mu$ L, 21.8  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 2 h under Ar atmosphere, 3-Azido-1-

propanamine **161** (0.78  $\mu$ L, 7.95  $\mu$ mol) was treated to the stirring mixture. After being stirred for 1 h at rt under Ar atmosphere, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH and purified by using ether precipitation to give **164** (6.19 mg, quant.) as a light yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 5.31 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 5.15 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 4.52 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 4.36-4.30 (1H, m), 4.16-4.10 (2H, m), 4.02-3.54 (22H, m), 3.51-3.38 (1H, m), 3.35 (1H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.25 (1H, td, *J* = 6.8, 2.1 Hz), 2.27 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.99 (3H, s), 1.94-1.82 (2H, m), 1.78-1.73 (2H, m), 1.18 (3H, d, *J* = 6.6 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ = 175.69, 173.53, 102.21, 100.39, 98.53, 96.12, 79.74, 78.77, 76.60, 73.91, 73.66, 73.13, 72.75, 71.83, 71.35, 71.25, 71.00, 69.97, 69.92, 68.45, 67.58, 65.75, 63.31, 62.57, 61.68, 55.00, 50.12, 37.80, 33.84, 29.74, 27.18, 22.53, 16.68.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>21</sub>Na, 882.3438, found 882.3464.



#### **Compound 165**

To a solution of compound **83** (9.6 mg, 12.3  $\mu$ mol) in anhydrous DMF (248  $\mu$ L) were added TSTU (6.0 mg, 19.9  $\mu$ mol) and DIPEA (6.5  $\mu$ L, 37.3  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 2 h under Ar atmosphere, 3-Azido-PEG11-Amine **162** (8.2 mg, 14.4  $\mu$ mol) was treated to the stirring mixture. After being stirred for 1 h at rt under Ar atmosphere, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH and purified by using ether precipitation to give **165** (16.4 mg, quant.) as a light yellow solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 5.31 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 5.15 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 4.52 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 4.38-4.28 (1H, br m), 4.17-4.09 (2H, m), 4.02-3.92 (3H, m), 3.91-3.88 (1H, m), 3.87-3.56 (47H, m), 3.54 (2H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.46-3.33 (6H, m), 3.21 (1H, q, *J* = 7.4 Hz), 2.64 (3H, s), 2.28 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 5.5 Hz)

= 7.4 Hz), 1.99 (3H, s), 1.93-1.81 (2H, m), 1.36 (3H, s), 1.35 (1H, d, *J* = 14.6 Hz), 1.35 (3H, s), 1.18 (3H, d, *J* = 6.6 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ = 175.64, 173.51, 102.23, 100.40, 98.56, 96.14, 79.78, 78.78, 76.62, 73.90, 73.66, 73.14, 72.76, 71.83, 71.64, 71.56, 71.36, 71.26, 71.15, 71.03, 70.59, 69.99, 69.93, 68.44, 67.59, 65.76, 63.32, 62.59, 55.71, 55.01, 51.80, 49.63, 49.46, 49.29, 49.11, 48.94, 43.72, 40.42, 33.81, 27.20, 22.57, 16.73, 13.25.

HRMS (ESI-Q-TOF) m/z [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>54</sub>H<sub>99</sub>N<sub>5</sub>O<sub>32</sub>Na, 1352.6165, found 1352.6199.



**Compound 166** 

To a solution of compound **83** (8.4 mg, 10.8  $\mu$ mol) in anhydrous DMF (216  $\mu$ L) were added TSTU (4.9 mg, 16.3  $\mu$ mol) and DIPEA (5.64  $\mu$ L, 32.4  $\mu$ mol) at rt. After being stirred for 2 h under Ar atmosphere, 3-Azido-PEG35-Amine **163** (19.5 mg, 12.0  $\mu$ mol) was treated to the stirring mixture. After being stirred for 1 h at rt under Ar atmosphere, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in MeOH and purified by using ether precipitation to give **166** (22.8 mg, 88%) as a white solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  = 5.32 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 5.15 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 4.56-4.50 (1H, m), 4.33 (1H, dd, *J* = 12.2, 5.8 Hz), 4.17-4.11 (2H, m), 4.03-3.51 (152H, m), 3.49 (1H, t, *J* = 4.7 Hz), 3.45-3.33 (5H, m), 3.23 (1H, q, *J* = 7.4 Hz), 2.67 (3H, s), 2.29 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.00 (3H, s), 1.93-1.84 (2H, m), 1.37 (5H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.18 (3H, d, *J* = 6.4 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ = 175.61, 173.49, 138.68, 135.60, 132.95, 98.56, 96.21, 89.31, 89.02, 84.45, 83.17, 79.86, 78.84, 78.24, 76.61, 73.63, 73.15, 72.76, 71.83, 71.65, 71.58, 71.37, 71.27, 71.14, 70.59, 70.53, 69.99, 69.95, 68.46, 65.80, 63.32, 62.57, 55.87, 55.03, 51.81, 49.46, 49.29, 49.11, 46.67, 43.79, 43.71, 40.42, 33.81, 27.19, 26.28, 22.59, 16.73, 13.15.

HRMS (ESI-LTQ-Orbitrap) m/z [M+3Na]<sup>3+</sup> calcd for C<sub>102</sub>H<sub>195</sub>N<sub>5</sub>O<sub>56</sub>Na, 2386.2565, found 2386.2492.



## **Compound 158**

To a solution of dendrimer core **167** (1.01 mg, 0.128 µmol) in anhydrous DMF (12.8 µL) were added DIPEA (6.40 µL, 5.63 µmol in DMF), azide **164** (2.64 mg, 3.07 µmol in DMF, 12.8 µL), CuSO<sub>4</sub> (0.33 mg, 2.05 µmol in distilled water, 3.20 µL), and Na-L-ascorbate (1.22 mg, 6.14 µmol in water, 3.20 µL) at rt. After being shaken at rt for 36 h. The reaction was quenched with DOTA (2.4 mg, 5.93 µmol). After adding water (300 µL), the suspension was centrifuged using 3K Da Amicon Ultra (0.5 mL) under 140,000 g for 10 mins. To the supernatant was then added water (350 µL). The step of centrifugation and water addition was repeated for 6 times to remove copper ion. The residue was purified by RP-HPLC on a Nacalai Tesque  $5C_{18}$ -AR-300 column (4.6 × 250 mm) at a flow rate of 1 mL/min, eluted by 0.1% TFA in water (Solvent A) and CH<sub>3</sub>CN (Solvent B) with linear gradient from 2% to 50% of B over 60 mins to give **158** (2.0 mg, 72%) as a light brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ = 8.92 (16H, br s), 7.86 (16H, br s), 7.37 (99H, br s), 5.50-5.26 (42H, m), 5.18-5.17 (16H, m), 4.89 (16H, s), 4.82 (16H, s), 4.78 (16H, br s), 4.53 (16H, br s), 4.39 (16H, s), 4.33 (16H, s), 4.26-4.10 (35H, m), 4.08-3.55 (103H, m), 3.48 (10H, s), 3.45-3.43 (5H, m), 3.42-3.41 (5H, m), 3.38 (10H, s), 3.34 (201H, s), 3.25-3.09 (39H, m), 2.37-2.24 (31H, m), 2.12-1.82 (100H, m), 1.70-1.10 (259H, m), 0.99-0.82 (71H, m)

<sup>13</sup>C NMR (700 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 176.78, 176.72, 176.70, 176.67, 174.86, 174.82, 174.80, 173.05, 172.65, 143.51, 143.46, 143.44, 130.45, 129.83, 129.80, 129.76, 129.72, 129.69, 129.67, 129.64, 129.58, 129.57, 129.55, 129.48, 129.20, 129.12, 129.08, 129.03, 128.96, 128.93, 128.59, 128.55, 128.52, 128.45, 128.39, 128.33, 124.85, 124.81, 124.78, 124.63, 100.81, 99.71, 99.61, 99.55, 97.33, 96.83, 93.77, 77.13, 77.10, 77.07, 77.04, 76.99, 76.89, 76.78, 76.39, 75.63, 73.52, 72.53, 71.84, 71.76, 71.71, 71.69, 70.76, 70.41, 70.33, 70.30, 70.28, 70.19, 69.99, 68.78,

68.73, 68.39, 67.80, 67.74, 67.40, 64.21, 64.16, 61.99, 61.94, 61.85, 60.75, 54.37, 54.35, 54.28, 54.26, 54.14, 54.09, 54.02, 53.98, 53.91, 50.00, 48.58, 48.53, 48.49, 48.47, 48.45, 39.74, 39.51, 39.41, 36.98, 36.93, 36.89, 36.82, 33.37, 33.28, 26.25, 26.25, 22.61, 22.54, 22.48, 22.46, 16.08.



### **Compound 159**

To a solution of dendrimer core **167** (3.02 mg, 0.382 µmol) in anhydrous DMF (16.0 µL) were added DIPEA (7.99 µL, 7.03 µmol in DMF), azide **164** (5.10 mg, 3.84 µmol in DMF, 16.0 µL), CuSO<sub>4</sub> (0.41 mg, 2.56 µmol in distilled water, 4.00 µL), and Na-L-ascorbate (1.52 mg, 7.67 µmol in water, 4.00 µL) at rt. After being shaken at rt for 36 h. The reaction was quenched with DOTA (3.27 mg, 8.09 µmol). After adding water (300 µL), the suspension was centrifuged using 3K Da Amicon Ultra (0.5 mL) under 140,000 g for 10 mins. To the supernatant was then added water (350 µL). The step of centrifugation and water addition was repeated for 6 times to remove copper ion. The residue was purified by RP-HPLC on a Nacalai Tesque  $5C_{18}$ -AR-300 column (10 × 250 mm) at a flow rate of 4 mL/min, eluted by 0.1% TFA in water (Solvent A) and CH<sub>3</sub>CN (Solvent B) with linear gradient from 2% to 50% of B over 60 mins to give **159** (4.31 mg, 39%) as a light brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta = 8.94$  (16H, br s), 7.88 (16H, br s), 7.37 (120H, br s), 5.40 (21H, br s), 5.32 (16H, br s), 5.17 (16H, br s), 4.66 (8H, br s), 4.53 (56H, br s), 4.33 (16H, d, J = 6.7 Hz), 4.14 (24H, br s), 4.01-3.47 (961H, br m), 3.45-3.32 (322H, m), 2.29 (31H, t, J = 7.7 Hz), 2.01-1.84 (71H, m), 1.40-1.26 (70H, m), 1.18 (48H, d, J = 6.3 Hz), 0.90 (14H, t, J = 6.7 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (700 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 176.23, 174.22, 163.29, 163.09, 162.89, 162.69, 130.01, 129.94, 129.90, 129.87, 129.85, 29.80, 128.99, 128.97, 128.93, 125.40, 125.38, 117.94, 116.29, 114.63, 100.88, 99.68, 97.46, 97.42, 93.83, 77.21, 76.95, 75.70, 73.58, 72.64, 72.60, 71.93, 71.82, 70.83, 70.52, 70.18, 70.06, 70.01, 69.64, 68.85, 68.53, 68.46, 67.92, 67.51, 64.27, 62.06, 61.92, 61.14, 60.82, 54.23, 54.19, 50.93, 50.72, 39.83, 39.81, 39.78, 129.85, 129.8

### 39.69, 33.43, 30.57, 26.33, 23.24, 22.69, 22.52, 22.49, 20.53, 16.15.



### **Compound 160**

To a solution of dendrimer core **167** (2.00 mg, 0.253  $\mu$ mol) in anhydrous DMF (25.3  $\mu$ L) were added DIPEA (12.7  $\mu$ L, 11.1  $\mu$ mol in DMF), azide **166** (14.5 mg, 6.08  $\mu$ mol in DMF, 25.3  $\mu$ L), CuSO<sub>4</sub> (0.647 mg, 4.05  $\mu$ mol in distilled water, 6.33  $\mu$ L), and Na-L-ascorbate (2.41 mg, 12.2  $\mu$ mol in water, 6.33  $\mu$ L) at rt. After being shaken at rt for 36 h. The reaction was quenched with DOTA (4.9 mg, 12.1  $\mu$ mol). After adding water (300  $\mu$ L), the suspension was centrifuged using 3K Da Amicon Ultra (0.5 mL) under 140,000 g for 10 mins. To the supernatant was then added water (350  $\mu$ L). The step of centrifugation and water addition was repeated for 6 times to remove copper ion. The residue was purified by RP-HPLC on a Nacalai Tesque 5C<sub>18</sub>-AR-300 column (10 × 250 mm) at a flow rate of 4 mL/min, eluted by 0.1% TFA in water (Solvent A) and CH<sub>3</sub>CN (Solvent B) with linear gradient from 2% to 50% of B over 60 mins to give **160** (6.9 mg, 59%) as a light brown solid.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta = 8.81$  (16H, br s), 7.87 (16H, br s), 7.36 (113H, s), 5.38 (13H, s), 5.32 (16H, d, J = 3.3 Hz), 5.16 (12H, d, J = 2.3 Hz), 4.53 (45H, d, J = 6.9 Hz), 4.34 (15H, d, J = 6.4 Hz), 4.22 (7H, dd, J = 5.2, 2.5 Hz), 4.14 (24H, br s), 4.08-3.52 (1621H, br m), 3.49 (18H, s), 3.35 (800H, br s), 3.21 (7H, s), 3.17-2.92 (45H, m), 2.37-2.27 (58H, m), 2.03 (67H, s), 2.00 (44H, s), 1.97-1.86 (65H, m), 1.66-1.58 (19H, m), 1.41-1.27 (243H, br m), 1.19 (48H, d, J = 6.4 Hz), 0.97-0.86 (51H, m), 0.10 (13H, s).

<sup>13</sup>C NMR (700 MHz, D<sub>2</sub>O) : δ = 177.06, 175.05, 164.08, 163.88, 163.67, 163.48, 143.46, 143.39, 134.76, 129.96, 129.92, 129.88, 129.84, 129.79, 129.76, 129.69, 129.62, 129.60, 129.56, 129.54, 129.52, 129.49, 128.90, 128.88, 128.84, 128.81, 128.76, 128.74, 128.68, 128.65, 125.43, 125.35, 125.33, 125.29, 119.61, 117.94, 116.29, 114.63, 100.86, 99.80, 99.67, 97.42, 97.38, 93.81, 77.17, 76.94, 75.70, 73.57, 72.59, 72.49, 71.96, 71.91, 71.81, 71.76, 71.62, 71.52, 71.27, 71.12, 71.09, 71.05, 70.97, 70.88, 70.81, 70.72, 70.18, 70.06, 70.01, 69.63, 69.56, 68.84,

68.45, 67.93, 67.51, 64.26, 62.05, 61.98, 61.91, 61.14, 60.81, 54.54, 54.36, 54.31, 54.28, 54.26, 54.18, 54.00, 50.92, 50.75, 50.70, 50.64, 39.78, 39.69, 38.01, 33.42, 27.81, 26.33, 22.67, 22.61, 22.55, 22.52, 16.18, 16.13, 15.52, 8.58.

### 3. Materials and methods for bio assay

### Materials and cells

Raji cells were purchase from JCRB Cell Bank (JCRB9012). Roswell Park Memorial Institute (RMPI-1640; 189-02025), penicillin-Streptomycin Solution (×100; 168-23191), SDS-PAGE sample buffer solution (2ME+, ×4; 191-13272) were purchased from Wako. Fetal Bovine Serum (FBS; 10270-106), Trypan Blue Stain (0.4%; 15250-061), and anti-mouse IgG antibody fluorescently labeled with Alexa 488 were purchased from Thermo Fisher Scientific. Standard complement, Rabbit complement was purchased Cedarlane. Cell counting Kit-8 (343-07623) was purchased form Dojindo. 96 well plate (3860-096) was purchased from IWAKI Brand Asahi glass CO., LTD. 96 well microplate V-bottom (P96V03N; 1-6776-02) was purchased from AS ONE CO. 10% gel (SDG521, acrylamide gel, for SDS-PAGE) was purchased from Bio Craft. 2D-Silver Stain-II and reagents for electrophoresis were purchased from Cosmo Bio Co., LTD (423413). Purified anti-human CD20 antibody (Isotype: Mouse IgG2b) was purchased from BioLegend, Inc (302302), Anti-B antigen antibody (sc-69952, Isotype: IgM) and anti-B antigen antibody fluorescently labeled with FITC (sc-69952 FITC, Isotype: IgM) was purchased from . Abcam. PD SpinTrap G-25 (28918004) and regent for SPR analysis was purchased from Cytiva. Thermo Fisher Scientific Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer was used for flow cytometry analysis.

#### SPR analysis

All binding assay were carried out on the Biacore biosensor system (Biacore T200) using a car-boxylmethylated Dextran-coated gold sensor surface (CM-5). Anti-B antigen antibody was covalently immobilized on the dextran polymer. Carboxyl groups of the dextran polymer were activated with a solution of 100 mM NHS and 400 mM EDC in HBS buffer (pH 7.4), for 420 s at a flow rate of 10  $\mu$ L/min. Then, Anti-B antigen antibody (50  $\mu$ g/mL) in acetate buffer (pH 5.0) was injected over the activated sensor surface for 420 s at flow rate of 10  $\mu$ L/min. The remaining activated residues were blocked with ethanolamine (1 M, pH 8.0) for 420 s at flow rate of 10  $\mu$ L/min. Glyco-dendrimers were diluted in HBS buffer to corresponding concentration and exposed to the immobilized Anti-B antigen antibody on the sensor surface for 120 s at a flow rate of 30  $\mu$ L/min. Then, Anti-B antigen antibody was regenerated by 10 mM glycine-HCl aq. (pH = 2.29) for 60 s at a flow rate of 30 µL/min two times.

### Hemagglutination inhibition assay

For carrying out hemagglutination inhibition assay, "V bottom" 96-well microtiter plate was used and 12.5  $\mu$ L phosphate buffer saline (pH = 7.2) was added as a diluent in each well using a multichannel auto pipette. A 25  $\mu$ L of dendrimer solution (18.0  $\mu$ M) was added in the first well of each row. Two-fold dilutions of the sample were made by transferring 12.5  $\mu$ L suspension from the first well of each column to the next well by using a multichannel auto pipette. This procedure was repeated till the last column of the 96-well microtiter plate. After serially diluting the sample, 12.5  $\mu$ L of Human plasma (A+ or O+) was added to each well. 50  $\mu$ L of 2% (v/v) red blood cells (RBCs) (blood type: B+) in PBS buffer was added to each well, and the plate was incubated at rt for 25 mins before visual scoring for hemagglutination inhibition activity.

For carrying out hemagglutination inhibition assay, "V bottom" 96-well microtiter plate was used and 18.8  $\mu$ L phosphate buffer saline (pH = 7.2) was added as a diluent in each well using a multichannel auto pipette. A 37.6  $\mu$ L of dendrimer solution (1.0  $\mu$ M) was added in the first well of each row. Two-fold dilutions of the sample were made by transferring 18.8  $\mu$ L suspension from the first well of each column to the next well by using a multichannel auto pipette. This procedure was repeated till the last column of the 96-well microtiter plate. After serially diluting the sample, 6.25  $\mu$ L of anti-B antibody (clone : HEB-29, supernatant, 10  $\mu$ L in 70  $\mu$ L PBS buffer, 1 : 7) was added to each well. 50  $\mu$ L of 2% (v/v) red blood cells (RBCs) (blood type: B+) in PBS buffer was added to each well, and the plate was incubated at rt for 25 mins before visual scoring for hemagglutination inhibition activity.

## **Protocol for cell culture**

Raji cells were cultured at 37 °C with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37 C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified chamber.

### Protocol for B antigen-antibody conjugates using B antigen NHS ester

The antibody (anti-CD20 antibody,  $80 \ \mu$ L,  $40 \ \mu$ g) was transferred into PDSpin-Trap G-25 containing PBS buffer (60 \ \muL). The column was centrifuged under 800 g for 2 mins at 4 °C. To the filtrate was then added PBS buffer (70 \ \muL). After the antibody was divided equally into 4 tubes (10 \ \mug in 50 \ \muL PBS buffer), the B antigen ONSu ester at various concentrations (final concentrations: 0, 0.2, 1.0 and 5.0 mM) were added to antibody solution and mixed by pipetting. After being incubated for 30 mins at 4 °C, the reaction mixture was transferred into PDSpin-Trap G-25, and centrifuged under 800 g for 2 mins at 4 °C to give B antigen antibody conjugates. This antibody was stored at 4 °C, short term (1-2 weeks).

Anti-CD20 antibody (80  $\mu$ L, 40  $\mu$ g) was transferred into 50 kDa Amicon ultra (0.5 mL) and PBS (300  $\mu$ L) was added. The solution was centrifuged under 14,000 × g for 10 mins at 4 °C. To the supernatant was then added PBS (300  $\mu$ L). The step of centrifugation and PBS addition was repeated for three times. After the antibody was divided equally into 3 tubes (10  $\mu$ g in 50  $\mu$ L PBS buffer), the B antigen NHS ester at various concentrations (final concentrations: 0, 0.2, 1.0, and 5.0 mM) were added to antibody solution and mixed by pipetting. After being incubated for 30 mins at 4 °C, the reaction mixture (in 50 kDa Amicon ultra) was centrifuged under 14,000 × g for 10 mins at 4 °C. To the supernatant was then added PBS (350  $\mu$ L). The step of centrifugation and PBS addition was repeated for five times to give B antigen-antibody conjugates. These antibodies were stored at 4 °C for short term (1-2 weeks).

### **SDS PAGE analysis**

10% gel (acrylamide gel) was used. To 0.4  $\mu$ g of sample (antibody alone or B antigen-antibody conjugates) in 13  $\mu$ L PBS buffer were added 5  $\mu$ L SDS-PAGE sample buffer (4×) and 2  $\mu$ L 1.0 M dithiothreitol solution in PBS buffer, and heated at 100 °C for 5 mins. 3  $\mu$ L standard protein marker was used. After loading the samples to the gels, SDS-PAGE were run using Tris-Glycine buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS) at 20 mA for 1 h. The gels were immediately stained with silver stain kit reagents (2D-Silver Stain-II) and scanned using ImageQuantTM LAS 500. After measuring the distance from the top of the gel to each MW marker band (210, 140, 90, 70, 55, 40, 35, 20 kDa), MW was plotted against the distance and a logarithmic approximation curve was drawn. The MW of target band was estimated using this curve.

# **CDC** assay

Raji cells were cultured using RPMI. To the cells  $(2.5 \times 10^5)$  in RPMI (90 µL) were added 10 µL B antigen antibody conjugates (1.0 µg/mL for antibody labelled with B antigen ONSu ester at 0, 0.2 or 1 mM glycan concentration) or PBS buffer and incubated at 37 °C for 1 h under CO<sub>2</sub> atmosphere. After the cells were divided equally into 5 wells ( $5.0 \times 10^4$  in 80 µL RPMI), 10 µL of Anti B antibody or RPMI were added and incubated for 15 mins. Then, 10 µL of rabbit complement (RC) or RPMI were added and incubated for 1 h. 10 µL of cell counting kit 8 (10 times diluted with RPMI) was added to the wells. After being incubated for 2 h, cell viability was measured by micro-plate reader at 450 nm.

### Flow cytmetry

Raji cells (ca.  $3.0 \ge 10^5$  cells/tube) were incubated with B antigen-antibody conjugates (0.1 µg in 100 µL PBS buffer) or PBS buffer on ice for 1 h. The cells were washed three times with PBS buffer and incubated with Alexa Fluro®488-goat anti-mouse IgG antibody (0.05 µL in 100 µL PBS buffer, 1:2000) or anti-B antigen antibody fluorescently labeled with FITC (clone: Z5H-2, 2 µL in 98 µL PBS buffer, 1:50) on ice for 1 h. The cells were washed twice and suspended in 0.3 mL of PBS buffer and analyzed with flow cytometer.

<参考文献-第七章>

 Sianturi, J.; Manabe, Y.; Li, H. S.; Chiu, L. T.; Chang, T. C.; Tokunaga, K.; Kabayama, K.; Tanemura, M.; Takamatsu, S.; Miyoshi, E.; Hung, S. C.; Fukase, K., Development of alpha-Gal-Antibody Conjugates to Increase Immune Response by Recruiting Natural Antibodies. *Angewandte Chemie-International Edition* **2019**, *58* (14), 4526-4530.






















НÒ

AcO

-OH

НO

OH

юн 0-

AcHN,

84

0

ΟН

























РРы прилитриниционализионализионализионализионализионализионализионализионализионализионализионализионализионализи 20.0 210.0 200.0 190.0 180.0 170.0 160.0 150.0 140.0 130.0 120.0 110.0 100.0 90.0 80.0 70.0 60.0 50.0 40.0 30.0 20.0 10.0 0.0 -10.0 -20.0



<u>10000 1900 1800 1700 1600 1500 1400 1300 1200 1100 1000 900 800 700 600 500 400 300 200 100 000 -</u>







































## 謝辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻・天然物有機化学研究室において 2014 年 4 月~2020 年 9 月に行われたものである.本研究を進めるにあたり,適切かつ温かいご指導を賜り,素晴らし い実験環境に加えて,国内,国際学会への参加機会を与えて下さった大阪大学大学院理学研究科 深 瀬浩一教授に心より厚く御礼申し上げます.また,本研究の遂行に際し,実験手法や方向性のみな らず,学術的知識,研究思考,研究者としての姿勢や,研究室の在り方など幅広い内容を暖かくご指 導いただきました大阪大学大学院理学研究科 真鍋良幸助教に深く御礼申し上げます.本論文を審 査していただき,有益なご教示,ご指導を賜りました大阪大学大学院理学研究科 生体分子化学研究 室 村田道雄教授,サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 G 長・主幹研究員,並びに大阪 大学大学院理学研究科 島本啓子特任教授に深く感謝いたします.また,生物実験において様々な ご指導,ご助言をいただいた大阪大学大学院理学研究科 樺山一哉准教授,糖鎖有機合成において 種々の反応条件のご相談に乗っていただいた大阪大学大学院理学研究科 下山敦史助教に深く感謝 いたします.定期的に研究内容についてご指導いただき,お世話いただいた大阪大学大学院理学研 究科 有機生物化学研究室 梶原康宏教授に感謝申し上げます.

第四章のジアセチルイミド基の機能解析において DOSY 測定を行って頂いた大阪大学大学院理学 研究科 分析機器測定室 稲角直也博士に深く感謝いたします. ABO 式血液型抗原の合成を行うに あたり、オゾン発生装置をお貸しいただいた大阪大学大学院理学研究科生体分子研究室 村田道雄 教授, 土川博史助教(現 大分大学全学研究推進機構 客員研究員)に深く感謝いたします. ジアセ チルストラテジーを用いたワンポット・ワンフロー反応の開発,並びに CDC 活性の測定にあたり, 実験手法の指導、アッセイ系の確立、コントロール実験用のα-gal 糖鎖をご提供いただいた大阪大学 大学院理学研究科 天然物有機化学研究室 Julinton Sianturi 博士 (現 Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Postdoc)に深く感謝いたします.ポリリジンデンドリマーのコア骨格を合成頂いた大 阪大学大学院理学研究科 天然物有機化学研究室 Kindi Farabi 博士に感謝いたします. また、CDC 活性の測定にあたり、データ収集の補助をして頂いた University of California San Diego の Mai Engelberg さんに感謝申し上げます. ABO 式血液型抗原の合成を行うにあたり、単糖フラグメントの 基質をご提供いただきました大阪大学大学院理学研究科 天然物有機化学研究室 Tsung-che Chang 特任研究員(現 理化学研究所 開拓研究本部 特別研究員),李昊晟博士,增井誠二博士(現 京都 大学大学院薬学研究科 有機触媒化学研究室 博士研究員),徳永健斗修士に深く感謝いたします. また、血球凝集阻害試験を行うにあたり、見知らぬ私の研究のためにヒト全血、ヒト血清をご提供 いただいた、すべての方々に感謝いたします.

176

博士後期課程の学生として, Research Assistant にご採用頂き, 経済的援助をいただきました産学共 創プラットフォーム共同研究推進プログラム OPERA-QiSS (Quantum Innovation for Safe and Smart Society) プロジェクト, 奨学生としてご採択頂き, 3 年間の経済的援助を継続していただいた一般財 団法人 伊藤忠兵衛基金 様に深く感謝いたします.また,私に個人事業主として業務を与えていた だき,社会勉強と経済的援助に加え,拙著の修士論文をラジオでご紹介いただくなど貴重な機会と 経験を与えて下さった株式会社 NEXT EDUCATION (坪田塾) 塾長の坪田信貴様に心より感謝申し 上げます.

研究室生活を進めるにあたり、細やかな心遣いやお声掛け、学会参加を含む諸手続きにおいて手 厚いご支援をいただいた秘書の山田よりみ様、根岸智代様、中本美智代様に深く感謝いたします. また、筆者の研究手法・実験手技について適切なご指導をいただきました徳永健斗修士に心より感 謝申し上げます. 同期として私のつたない英語を理解し、助け合いながら切磋琢磨した Kindi Farabi 博士に心より御礼申し上げます. また、研究室生活を共に過ごし、気難しい私と気さくに話し、多く の議論を交わし、様々な我儘を聞いて支えていただいた大阪大学大学院理学研究科化学専攻・天然 物有機化学研究室の先輩方、同期の皆様、後輩諸氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げます. 誠に ありがとうございました.

最後に、私の学生生活を生活面で陰ながら支えてくれた弟、そして何より私の進路に理解をいた だき、9年半にも及ぶ大学、大学院生活を心身ともに支え、ご支援いただいた両親、筒井正様、敏子 様、両名に心より御礼申し上げます.

学部生活を含め9年と6か月間,苦難の連続ではありましたが,環境と人に恵まれた学生生活で あったと思います.

学生生活を支えて頂いたすべての皆様に御礼申し上げます.お世話になりました.

令和2年9月25日

大阪大学大学院理学研究科 化学専攻

天然物有機化学研究室

博士後期課程4年

## 筒井 正斗