T2R2東京工業大学リサーチリポジトリ Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	ダルカン受容体デクチン1結合性オリゴ糖誘導体の合成とその生物 機能評価
Title(English)	
著者(和文)	河合徹也
Author(English)	Tetsuya Kawai
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第8472号, 授与年月日:2011年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:高橋 孝志
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第8472号, Conferred date:2011/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:
 学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

β グルカン受容体デクチン1結合性オリゴ糖誘導体の合成と

その生物機能評価

東京工業大学大学院

理工学研究科応用化学専攻

高橋·田中研究室 河合 徹也

Abbreviations

第1章「序論」		1
1 1 14114	517	0
		ئ 0
		3
		6
1 - 3 - 1	SPG とのテクチン1に対する競合阻害活性試験の方法	6
1 - 3 - 2	オリゴ糖鎖の測定	7
1 - 3 - 3	βグルカンの過去の合成例	9
1 - 3 - 4	保護糖鎖の脱保護	15
1 - 3 - 5	糖鎖のクラスター化	18
1-4 本論3	文の概要	19
References		23
第2章 「デクラ	チン1の低分子リガンド探索を目的とする糖鎖合成」	27
2-1 はじぬ	りに	29
2-2 低分子	子リガンド探索	29
2 - 2 - 1	SPG とのデクチン1に対する競合阻害活性試験の方法	31
2 - 2 - 2	オリゴ糖鎖の測定	32
2-3 合成語	计画	34
2 - 3 - 1	標的分子	34
2 - 3 - 2	合成上の問題点	34
2-4 メチバ	レグリコシド体および TTK9 とその還元体の合成	35
2 - 4 - 1	メチルグリコシド体の合成	35
2 - 4 - 2	TTK9 と還元体の合成	37
2 - 4 - 3	競合結合阻害試験	41
2-5 従来法	去による TTK9 合成とその競合阻害活性試験	43
2 - 5 - 1	従来法による TTK9 合成	43

目次

2-5-2 競合結合阻害試験	46
2-6 まとめ	47
2-7 基質の合成	47
References	49
Experimental Section	51
第3章「β(1,3)グルカン糖鎖の合成法の開発」	65
3-1 はじめに	67
3-2 標的分子の設定	67
3-3 βグルカン直鎖16糖の合成	68
3-4 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の直線的合成法の開発	68
3-4-1 直線的合成戦略に基づく合成計画	68
3-4-2 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の直線的合成	68
3-4-3 まとめ	75
3-5 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の収束的合成法の開発	76
3-5-1 収束直的合成戦略に基づく合成計画	76
3-5-2 糖受容体の検討	79
3-5-2-1 3, 4位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化	79
3-5-2-2 2, 3位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化	80
3-5-3 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の収束的合成	81
3-5-3-1 2, 3位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化	84
3-5-3-2 8糖糖供与体の合成	85
3-5-3-3 8糖糖受容体の合成	86
3-5-3-4 16糖の合成	89
3-5-4 まとめ	90
3-6 脱保護の検討	90
3-7 競合阻害活性試験	96
3-8 まとめ	97
3-9 基質の合成	98
References	102
Experimental Section	103

4-1 はじめに	187
4-2 標的化合物の設計	187
4-3 合成戦略	188
4-4 多様性指向型合成戦略に基づく合成	189
4-5 結合試験および免疫活性化試験	217
4-5-1 競合阻害活性試験	217
4-5-2 NMR を用いる結合様式の検討	218
4-5-3 免疫活性化試験	221
4-6 まとめ	223
4-7 基質の合成	224
References	225
Experimental Section	227
第5章「βグルカン糖鎖固定化微粒子の開発」	293
5-1 はじめに	295
5-2 合成計画	295
5-3 糖鎖固定化微粒子の合成法の確立と機能評価	297
5-3-1 微粒子に対する糖鎖担持の検討	297
5-3-2 BioAct gel を用いた糖鎖固定化微粒子の機能評価	299
5-3-3 まとめ	301
5-4 糖鎖固定化蛍光微粒子の合成法の確立と機能評価	302
5-4-1 微粒子に対する糖鎖担持の検討	302
5-4-2 糖鎖固定化蛍光微粒子の形状の評価	304
5-4-3 糖鎖固定化蛍光微粒子の機能評価	305
5-4-4 まとめ	305
5-5 まとめ	306
References	307
Experimental Section	309

第4章「βグルカン関連オリゴ糖鎖の合成法の開発」

Experimental Section

第6章「結論」

謝辞

Abbreviations

Ac	acetyl	HRMS	high resolution mass spectra
ADDP	1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine	Hz	hertz
Ala	alanine	IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
AOC	allyl oxycarbonyl	IR	infrared
aq.	aqueous	J	coupling constant
AZMB	2-(azidomethyl)benzoyl	L	liter(s)
Bn	benzyl	Lev	levulinoyl
br	broad	liq.	liquid
BSM	benzenesulfinyl morpholine	LPS	lipopolysaccharide
BSP	1-benzenesulfinyl piperidine	Lys	Lysine
Bu	butyl	Μ	moles per liter
Bz	benzoyl	m	milli
CAc	chloroacetyl	<i>m</i> -	meta
COSY	correlation spectroscopy	μ	micro
DAST	(diethylamino)sulfur trifluoride	Me	methyl
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene	MHz	megahertz
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-	min	minute(s)
	1,4-benzoquinone	mol	mole(s)
$^{\circ}\mathrm{C}$	degrees Celsius	п	normal
δ	chemical shift in parts per million	Nap	2-naphthylmethyl
	down field from tetramethylsilane	NBS	N-bromosuccinimide
DIEA	N,N ⁻ diisopropylethylamine	NIS	Niodosuccinimide
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine	NMR	nuclear magnetic resonance
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	0-	ortho
DMT-M	M	Р	protecting group
	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-	<i>p</i> -	para
	methylmorpholinium chloride	PGN	peptidoglycan
DTBMF	2,6-di- <i>tertiary</i> -butyl-4-methylpyridine	Ph	phenyl
EDCI	1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethyl-	PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
	carbodiimide	ppm	parts per million
\mathbf{Et}	ethyl	Py.	pyridine
eq.	equivalent	r.t.	room temperature
g	gram(s)	t-	tertiary
gem	geminal	TBAF	tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
Glu	glutamine	TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
GPC	gel permeation chromatography	Tf	trifluoromethane sulfonyl
h	hour(s)	TFA	trifluoroacetic acid
HPLC	high performance liquid	THF	tetrahydrofuran
	chromatography	THP	tetrahydropyranyl

- TLC thin layer chromatography
- TMB 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
- TMEDA N,N,N',N'-tetramethyl

ethylenediamine

- TMS trimethylsilyl
- Ts *p*-toluenesulfonyl
- TTBP 2,4,6-tri-*tert*-butylpyridine
- UV ultra violet
- X, Y halide, leaving group

第1章 序論

1-1 はじめに

)糖鎖は、核酸やタンパク質に次ぐ第3の生体高分子である。1811 年 Kirchhoff は、デンプンに酸 を作用させ、それから甘味ある結晶性の物質を分離した¹⁾。間もなく、それがブドウや蜂蜜から得 られていた物質と同じものであることが分かった。後に、Dumas (1833) はこの物質をグルコース と名付けた。このようにして、単糖およびその誘導体がグリコシド結合で多数重合した物質として の多糖が認識された。単糖類は一般に非常に水溶性は高いが、重合度の高い多糖は、水に不溶性に なるか、または溶解してもコロイド溶液を作る不思議な性質を有すること明らかにされた。一方、 Helferich は、単糖の重合度が低く、水に可溶なものをオリゴ糖と名付けた。多糖は、重合度およ そ9以上とする説もあるが、明確な線引きはなされていない。それは、オリゴ糖と多糖の区別は、 それらのもつ性質で決められることが多いためである。このような多糖類は、植物の乾燥量の 3/4 を占めると言われている。現在においても、植物由来の多糖類であるデンプンは食品として、セル ロースは、紙、人絹、セルロイドその他多くの工業的応用をもち、人間生活に欠くことができない。 さらに、1930年頃になって初めて、糖化学の進歩に伴い、糖鎖の構造を深く研究することが可能に なった。その結果、全ての生物の細胞は多くの複雑な糖鎖で覆われていることが明らかになった。 しかしながら、その真の機能はあまり理解されていなかった。1960年代になり、ウイルスによる細 胞の悪性化において細胞表層の複合糖質糖鎖の構造が変化する現象が示されると、これら糖鎖が細 胞標識の担い手であると考えられるようになった。さらに、その後の研究から、糖鎖は免疫や感染、 がん、発生、再生その他多くのかかわりが報告されるようになった。その後の研究が現在の糖鎖研 究に繋がっている。

1-2 糖鎖と免疫

細胞表層の糖鎖は、糖鎖細胞の一番外側に存在するため、細胞の性質や役割を示す物質として利 用される場合が多い。例えば、細胞の分化誘導、接着などの現象の多くに糖鎖と生体高分子の認識 が関わっていることが報告されている。特に、ウイルスは宿主細胞の表面上に存在する糖鎖を特異 的に認識し、感染を行う。また、免疫システムにおける自己と非自己の認識においても糖鎖が利用 される場合が多い。例えば、自然免疫は、ほとんどの生物に広く分布している重要なシステムであ り、宿主に無条件に害を与える物質を排除するシステムである。ヒトは人類古来からの病原体であ る細菌を排除するために、細菌表面の糖鎖誘導体を指標としている。リポ多糖(LPS)はグラム陰 性細菌の細胞外膜の主要構成成分であり、宿主に対して強力な自然免疫誘導活性を持つことが知ら れている²⁹。細菌種・菌株に特異的なオリゴ糖による繰り返し構造(多糖)とリピドAと総称される 糖脂質から構成される(Figure 1-1)。リピドAは、リン酸化されたグルコサミン2糖に複数の脂 肪酸エステルが結合した構造をもっており、LPSの免疫誘導活性の本体として認識されている。こ れまでに多くの種類のリピドAおよびその類縁体が合成され、それらの構造活性相関が検討された ³⁰。その結果リピドAの活性は、脂肪鎖長、結合位置、およびリン酸基の数など違いによって大き く異なることが示された。



Figure 1-1 LPS の構造

 β -D-グルカンはキノコや酵母などの細胞壁を構成する多糖類である。グルコースが β (1,3) 結合でつながるものを主鎖とし β (1,6)結合を側鎖とする糖鎖である (Figure 1-2)。半世紀 近く前から、 β -D-グルカンが免疫刺激に関係していることが知られており、現在においても精力 的に研究が続けられている⁴⁾。特に、レンチナン (Lentinan、LNT) やソニフィラン (Schizophyllan、 Sonifilan、SPG) と呼ばれる β -D-グルカンは抗がん剤として利用されている。他の化学療法との 併用投与による腫瘍増殖抑制作用及び延命効果が認められる⁵⁾ことから、低下した免疫力を補う効 果があると考えられる。



Figure 1-2

近年、白血球であるマクロファージ・樹状細胞に特異的に発現するβグルカンの受容体として、 デクチン1が明らかにされた⁶。デクチン1によるβグルカンの認識は、マクロファージ・樹状細 胞の活性化し、真菌性病原菌への食作用や防御的炎症反応の引き起こしに関わっていることが知ら れてきている。しかし、真菌に対する免疫機構が関連する疾患においてデクチン1がどのような役 割を演じているかは明確ではない。この役割を解明することは、感染防御や炎症性疾患の発症と対 策を考慮するために重要であり、病気の予防・治療に貢献するなど、幅広い応用が期待できる。

大野尚仁教授、安達禎之准教授らは、天然から得られる様々な分岐鎖を持つβグルカンおよびα グルカンの、ソニフィラン(以下 SPG)のデクチン1への結合に対する競合阻害試験を報告している ⁷⁾。その結果、短いβ(1, 6)側鎖を持つβ(1, 3)グルカンである Laminarin、SPG、SPG-OH、 GRN、SSG が、デクチン1と強く結合することを明らかにしている。

Table 1-1 にグルカンの構造、Figure 1-3 に測定結果を示した。Figure 1-3 の横軸の値が低いも のほどデクチン1に対する結合力が高いことを表している。

Glucan Source		Primary structure		
Curdlan	Alcaligenes faecalis	Linear 1,3-β-glucan	ų	
Laminarin	Laminaria digitata	Linear 1,3- and 1,6-β-glucan	ē	
SPG	Schizophyllum commune	1,6-Monoglucosyl-branched 1,3-β-glucan	Ę	
SPG-OH	Schizophyllum commune	1,6-Monoglucosyl-branched 1,3-β-glucan ^b	2	
GRN	Grifola frondosa	1,6-Monoglucosyl-branched 1,3-β-glucan ^b	ŧ	
SSG	Sclerotinia sclerotiorum	1,6-Monoglucosyl-branched 1,3-β-glucan ^b	a	
CSBG	Candida albicans 1,3-β-glucan with 1,6 long glucosyl side chair		Ę	
Pullulan	Pullularia pullulans	1,4- and 1,6-α-glucan	č	
Dextran	Leuconostoc dextranium	1,3-branched 1,6-α-glucan		

^b Branching ratio (1,6-glucan/1,3-glucan) of 2/6 for SPG-OH and GRN and 3/6 for SSG.

Table 1-1



Figure 1-3

Figure 1-4

2006 年、Brown らは、βグルカン多糖類の加水分解 物を利用して、デクチン1と結合するβグルカン糖鎖 -の長さを求めている⁸⁾。その結果、9 糖までのβ(1, 3) グルコース糖鎖は全く結合せず、10糖はほんの 少し結合し、11糖以上では強く結合するという結果 が得られている(Figure 1-4)。

しかし、これらのβグルカンは天然由来であり、用 いた材料の菌株や培養条件、個体差、抽出方法の違い、 分析方法を考慮したとき、純度の問題を考えなければ ならない。さらに、βグルカンの市販品の中には、純 度の低いものがあり、測定された生物活性が夾雑物に 由来することもしばしばである。低分子有機化合物と 比較して、単一性や均一性の評価が困難であるがゆえ に、このような危険性は他の物質よりも高いことにな

	Assignment	Oligosaco		
Fraction		Obsd MNa ⁺	Theor mass ^b	Binding ^c
		Da	Da	
F7	Hex7	1175.6 (100)	1175.4	-
	Hex8	1337.6 (95)	1337.4	-
F8	Hex8	1337.7 (100)	1337.4	NT
	Hex9	1499.8 (50)	1499.5	NT
	Hex7	1175.6 (43)	1175.4	NT
F9	Hex9	1499.4 (100)	1499.5	-
	Hex8	1337.3 (92)	1337.4	-
	Hex10	1661.3 (46)	1661.5	-
F10	Hex10	1661.6 (100)	1661.5	-/+
	Hex9	1499.6 (56)	1499.5	-/+
	Hex11	1823.7 (23)	1823.6	_/ +
F11	Hex11	1823.6 (100)	1823.6	++
	Hex10	1661.4 (60)	1661.5	++
	Hex12	1985.6 (17)	1985.6	++
F12	Hex12	1985.6 (100)	1958.6	++
	Hex11	1823.6(92)	1823.6	++
	Hex13	2147.9 (38)	1823.6	++
	Hex10	1661.6 (10)	2147.7	++
F13	Hex12	1985.8 (100)	1985.6	+++
	Hex13	2147.9 (88)	2147.7	+++
	Hex14	2310.0 (17)	2309.7	+++
	Hex11	1823.7 (11)	1823.6	+++

I sodiated ions were observed (Obsd) and compared with the theoretical (Theor) masses

Relative abundances are shown in parentheses.

Monoisotopic mass was used for calculation. Semiquantitative visual scores of the range of binding signals in repe

+++, strong; ++, moderate; +, weak; -/+, very weak; -, not detected; NT, not tested

る。したがって、より正確な構造活性相関の解明のためには、構造の明らかでかつ純粋な糖鎖を用 いて研究を行なう必要がある。

1-3 精鎖の化学合成の発展

βグルカンは平均分子量数十万もの多糖である。βグルカンの機能を有する糖鎖を合成するため には、非常に大きな糖鎖(10糖以上)の合成を視野に入れなくてはならない。そこで、合成法の 検討を試みる。一般的な有機合成における骨格構築の手法として直線的合成法と収束的合成法が挙 げられる。二つの合成法の利点と難点を挙げて、βグルカンの合成法を検討していく。

1-3-1 直線的合成法と収束的合成法

· 直線的合成法

直線的合成法は、ビルディングブロックを順次カップリングすることにより骨格構築していく手法である(Figure 1-5)。

利点:反応性が高く合成容易なビルディングブロックを用いることができるため、反応性が低下している比較的大きなブロックに対する結合反応においても十分な転嫁率にて行うことができると 考えられる。

難点:合成の総合成工程が長くなることや、合成の後半においては、反応物と生成物との物性の変 化が少なくなるために、それぞれの分離精製が困難になることが予想される(Figure 1-6)。



Figure 1-6

· 収束的合成法

収束的合成法は、目的とする骨格をいくつかのブロックに分けて合成し、それぞれをカップリン グする方法である(Figure 1-7)。

利点:合成の総工程数を低減することができ、大きなブロック同士をカップリングすることにより、 一挙に大きな骨格を合成できる。また、大きなブロック同士のカップリングでは、反応物と生成物 との物性が大きく異なることが予想されるため、反応が完結しなくても容易に分離可能であること が予想できる。

難点:一般的にブロックが大きくなった場合には、それぞれのカップリング反応に対する反応性が 低下することが知られている。そのため、十分な転嫁率で目的物へと導くためには、適切な分子設 計が必要である。



以上の合成法は、標的糖鎖の構造、大きさそして種類などの様々な条件に応じて使い分ける必要 がある。しかしながら、β グルカン研究に必要とされる比較的大きなオリゴ糖を合成するためには、 様々な問題を解決して行く必要がある。次項において β グルカンの特徴とこれまでに報告された合 成法について検討する。

1-3-2 βグルカンの合成法

 $\beta グルカンの合成は \beta$ (1,3)結合および β (1,6)結合グルコースの構築が主となる。合成上の問題点として考えられるものを以下に挙げる。

<u>β(1,3)</u>結合構築の問題点

グルコースの水酸基は全てエカトリアルに張り出しているため、2,4位の保護基による3位の 立体障害が大きい(Figure 1-8 糖受容体)。そのため、糖受容体であるグルコースの3位二級水酸基 は反応性が低く、保護基の選択がグリコシル化反応において重要となる(Figure 1-8)。一般的に、 1,2位トランス選択的にグリコシル化反応を行うために、糖供与体2位の保護基としてアシル基 が用いられる(隣接基効果)。これは、反応中間体として糖供与体からアシロキソニウムカチオン が生成し、アンチ(β)側から求電子反応が進行するためである(Figure 1-8 左下)。さらなる糖 鎖伸長を行う場合(直線的合成)、先ほどの糖供与体側の3位の保護基を選択的に外し、続くグリ コシル化反応を行う。この際、2位に存在するアシル基は、その求電子性から3位水酸基のグリコ シル化の反応性をさらに下げてしまう。βグルカン多糖の機能を有する類縁体を合成するためには、 長鎖の糖供与体および糖受容体を用いるため、3位水酸基の反応性を下げない工夫が必要とされる。



Figure 1-8

β(1,6)結合導入における問題点

グルコースの6位水酸基は一級水酸基であり、他の水酸基と比較して反応性は高い。しかしなが ら、βグルカンの合成において、糖鎖の導入のタイミングを誤るといくつかの弊害が考えられる。 以下に例を挙げる。

・β(1,6)分岐鎖を有する糖鎖ブロックを糖供与体、および、糖受容体として用いる場合(収 束的合成法)

 β (1, 6)分岐鎖を有する糖鎖を用いてカップリングする際、 β (1, 6)側鎖が立体障害となり、 β (1, 3)結合のグリコシル化反応の進行を阻害してしまう可能性がある(Figure 1-9)。



・先にβ(1,3)主鎖を合成し、6位水酸基に対してβ(1,6)分岐鎖を導入する場合(直線) 的合成法)

長鎖の β (1,3)主鎖に対して複数の β (1,6)分岐鎖を導入する場合、目的とする生成物 と未反応生成物との物性の差が小さく、分離精製が困難であると考えられる(Figure 1-10)。



以上、 β (1, 6)分岐鎖を有する β グルカンを合成する際は、 β (1, 6)分岐鎖の導入タイ ミングを十分検討しなくてはならないと考えられる。

次項において、βグルカン関連糖鎖についての過去の合成例を挙げる。

1-3-3 βグルカンの過去の合成

βグルカン関連糖鎖の過去の合成は大きく二種類が挙げられる。

- 1) β(1,3) 直鎖のオリゴ糖合成
- 2) β (1, 3) 主鎖に対しβ (1, 6) 側鎖を有するオリゴ糖合成

それぞれに分けて説明する。

1) β (1, 3) 直鎖のオリゴ糖合成

筆者が知る限りで最初の β グルカン関連オリゴ糖鎖の合成は1952年にPercival らに報告された β (1,3)2糖の合成である(Figure 1-11)⁹。アセチル保護されたグルコースのブロモ糖に対 し、炭酸銀、ヨウ素を用いて活性化させ、ジアセトングルコースとグリコシル化反応を行っている。 その後脱保護し、2糖を得ている。また、天然の β グルカンである Laminarin を加水分解して得ら れた β (1,3)2糖を用いて、構造の一致を報告している。ジアセトングルコースは非常に入手 容易であり、現在においても使用される良い糖受容体である。



Kong らは、2位アシル保護されたイミデート糖供与体およびアシル保護された糖受容体を用いて β (1,3)オリゴ糖の合成を検討している¹⁰⁾。この際、驚くべきことにα体の生成物が確認され た(Figure 1-12)。先にも述べたが、2位アシル保護されたグルコース糖供与体は、隣接基効果で 非常に高い β 選択性を発現するはずである。この報告によると、水酸基がアシル保護されているも の、糖供与体および糖受容体が大きいものほどα体の選択性が大きい。α体生成の反応機構は、グ リコシル化反応において、オルソエステル体を経由し、α側から求核攻撃しているものと推測して いる(Figure 1-13)。彼らは、中間体であるオルソエステル体を単離し、TMSOTf を作用させること でα体が得られることを突き止めた^{10a)}。この結果から、 β (1,3)グルカン関連糖鎖を合成す る際、保護基の選択について十分注意しなければならないことが伺える。







Figure 1-13

Takeo らは、 β (1, 3) 2糖の糖受容体に対し、 β (1, 3) 2糖のクロロ糖を活性化させ、 グリコシル化反応を行っている¹¹⁾。グリコシル化反応後、3位のクロロアセチル基を選択的に脱保 護し、さらなるグリコシル化反応を行うことで糖鎖の伸長を行なっている(Figure 1-14)。この手 法を用いて、彼らは最大8糖の直鎖糖の合成に成功した。この際、4、6位の保護基であるベンジ リデンは、 β (1, 3) 結合構築に有用であることを報告している^{11,12)}。4、6位のベンジリデン 基は、3位遊離水酸基周辺の立体障害が比較的小さい保護基であり、高い反応性を有する3位水酸 基を持つ糖受容体の設計において重要である。



Figure 1-14

2) 分岐鎖を有するオリゴ糖合成

Takeo らは、βグルカンであるシゾフィランの構成単位である4糖の合成を報告している¹³⁾。彼 らはブロモ糖を糖供与体として用い、4、6位遊離水酸基を有するβ(1,3)3糖糖受容体との 位置選択的グリコシル化反応により、4糖骨格を得ている。この際、反応性の高い一級水酸基であ る6位のみにグリコシル化反応が進行している。その後、アリルアルコールとのグリコシル化、脱 保護を経て4糖を得ている(Figure 1-15)。



Kong らは、ワンポットグリコシル化反応¹⁴⁾を用いて分岐鎖を2ヶ所含む6糖の合成に成功して いる¹⁵⁾。イミデート糖とフェニルチオ糖を用いて独立に活性化させて反応を行っている(Figure 1-16)。ワンポットでグリコシル化反応を行うことで、グリコシル化反応の煩雑な後処理と精製を 短縮することができる。この際、糖受容体には β (1,6)分岐鎖を有する3糖を用いているが、 β (1,6)分岐鎖は反応点である非還元末端糖ではなく、離れている還元末端糖に有しているた めに、反応に大きな影響はなかったものと考えられる。



当研究室の雨夜らは、独立に脱保護できる Fmoc 基、Lev 基、AOC 基を用いて選択的に脱保護し (Orthogonal Deprotection)、その後グリコシル化を行うことで、一つの共通中間体 β (1, 3) 4 糖から 7 種類のイネのファイトアレキシンエリシター誘導体を合成することに成功している (Figure 1-17)¹⁶⁾。この報告から、主鎖4糖程度のものであれば、6 位水酸基に対して一度に β (1, 6)分岐鎖を導入する方法が有用であると考えられる。



Figure 1-17

Du らは糖受容体として2位と3位に遊離水酸基を有する2糖を用いて3糖イミデート供与体と のグリコシル化反応を行った(Figure 1-18)¹⁷⁾。この際、非常に興味深いことに反応は3位選択的 に進行し、高収率で5糖が得られたと報告している。2糖受容体の2位は1位(アノマー位)の糖 によって遮蔽されているため、3位選択的に反応が進行したものと考えられる。2,3ジオールの グルコース糖受容体を用いた3位選択的グリコシル化反応は1987年にPilotti らによって初めて 報告されている(Figure 1-19)¹⁸⁾。これらの報告をもって様々な検討の報告が Du や共同研究者の Kong などによってなされているものの¹⁹⁾、2,3ジオール糖受容体の選択性の規則については明 確になっていない²⁰⁾。



我々のグループが合成研究を行っている途中で、Williams らから合成 β グルカンの、リン酸化グ ルカンのデクチン1への結合に対する競合阻害試験が報告された(Figure 1-20, 1-21)²¹⁾。この 報告によると、直鎖の8糖はデクチン1との結合は見られず、直鎖の9、10糖、分岐の10糖(非 還元末端から3糖目にβ(1, 6)分岐鎖を有する)が競合阻害作用を有することを見出した。さ らに、直鎖の10糖では直鎖の9糖と比較して結合力が4倍ほどであるが、分岐の10糖では直鎖の9糖に対して100倍もの結合力の上昇が見られた。共同研究者である Ensley らは、 β (1, 3)2糖および β (1, 6)2糖を用いてグリコシル化反応、3位の脱保護を繰り返すことにより、 直鎖糖および分岐糖を合成している²²⁾。この際、糖供与体の2位には ADMB 基 (4-Acetoxy-2,2-dimethylbutanoate)を用いることでオルソエステル体の生成を抑えている。す なわち、中間体であるアシロキソニウムカチオンに対し、2位のエステル α 位のジメチル基による 立体障害、末端のアセチル基のカルボニルから得られるカチオンの安定化から、直接的な求核攻撃 を妨げている(Figure 1-20右下)。



以上、 β グルカンの合成例の報告から、 β グルカン関連糖鎖を合成する際、保護基の選択につい て十分注意しなければならないことがわかる。大きな糖鎖のカップリングを行うためにはジオール の糖受容体が有用であると考えた。4,6位遊離水酸基を有する糖受容体は、一級水酸基と二級水 酸基の違いによって選択的に6位に得ることが可能であった。また、2,3位遊離水酸基を有する 糖受容体は、慎重に基質の設計を行うことで3位選択的に反応可能である。ジオールとすることで 3位周辺の立体障害を減らすことができ、大きな糖鎖を合成する際にも反応性を維持できる可能性 があると考えた。

1-3-3 保護糖鎖の脱保護

通常の糖鎖合成では様々な保護基が用いられ、最終工程でそれぞれの保護基に応じた脱保護反応 が用いられる。糖鎖は一般的に水溶性であり、脱保護反応における取り扱いには注意を要する。す なわち、脱保護によって脂溶性の保護糖鎖の極性が親水性へと大きく変化するため、脱保護反応の 組み合わせによっては糖鎖の凝集化を招き、中間体が難溶性となる可能性がある。特に、多糖であ るβグルカンの機能を有する糖鎖の合成を目指す上で、最終的な脱保護体の溶解性の問題は無視で きない大きな問題である。すなわち、先に述べた通り多糖は水に難溶性であったり、不溶性であっ たりするため、合成するβグルカンの溶解性には注意が必要である。

当研究室山内らは、固相合成によってエピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)保護体ライブラリ ーを合成し、水素添加装置 H--Cube[™] (Figure 1-23)を活用した迅速な脱保護を行った結果、全 64 種脱保護体ライブラリーの構築を達成した(Figure 1-22)²³⁾。EGCG 脱保護体は不安定であり、バッ チ系では最終反応である脱保護反応において生成物の損壊が問題としてあげられる。そこで山内ら は、フロー系の水素添加装置 H-Cube[™]に着目した。H-Cube[™]は、フロー系の反応装置であるため反 応時間が極めて短く、不安定な化合物を迅速に扱うことができる。また、流通経路内で電気分解に より発生させた水素が作られるため安全であり、また、温度や圧力(~100 bar)も自由に設定で きる。フロー系なので操作が非常に簡便で、反応を追いやすいなどの利点が挙げられる。流通経路 にパラジウムをはじめとする様々な触媒を担持したカートリッジを取り付けて使用可能である。



Figure 1-22



H-Cube[™] Figure 1-23

H-Cube[™]は糖鎖の脱保護にも有利だと考えられる。高温高圧の非常に強い条件を短い反応時間で 行うことができるため、一瞬で脱保護を行うことができれば、部分的に脱保護が進行した際に起こ りえる糖鎖の凝集化を防げるはずである。

当研究室石田らはトリメリックルイスX保護体を、開発したテトラヒドロピラニルリンカー(THP リンカー)を用いて固相に担持して、簡便に脱保護することに成功している(Figure 1-24)²⁴⁾。こ の固相脱保護法は、不溶性ポリマーである Argo Pore 上に糖鎖を担持して脱保護反応を行うため、 1)高極性化合物の取り扱いが容易になる、2)基質の凝集を防ぐことができるという利点を有してい る。また、特にベンジルエーテル基の脱保護を強力に行えるバーチ還元を簡便にできる利点は大き い。糖鎖合成において、ベンジルエーテル基は非常に安定な電子供与性保護基であり広く用いられ る保護基であるが、その安定性のために、込み入った糖鎖のベンジルエーテル基の脱保護はしばし ば大きな障害となることがある。バーチ還元は小さな一電子ラジカルが活性種であると考えられて おり、込み入った糖鎖の脱ベンジル反応として期待できる。一般的に固相合成法は反応性が低いも のの、バーチ還元を用いることで脱保護に成功している。



また、当研究室舘野らは、石田らの開発した THP リンカーを改良し、トリシアル酸の脱保護に成 功している(Figure 1-25)²⁵⁾。舘野らは環状カーバネート基の脱保護条件である塩基水溶液の加熱 条件で、固相から基質の切り出しが行われてしまうことを報告している。アミド結合の加水分解の されやすさの理由として、β位に電子を求引するエーテル酸素があるからと突き止め、β位にエー テル酸素の無い THP リンカーの開発を行った。結果、固相から基質の脱落なしに脱保護を行うこと に成功している。



溶解性に問題があると考えられるβグルカンの脱保護は、液相条件で反応を行うと、反応が完全 に進行する前に凝集化する可能性が高いと考えられる。そこで、固相上で完全に脱保護反応を行う ことができれば、例え得られる糖鎖は難溶性であっても、完全に脱保護されたものが得られるので 有用な方法である。しかしながら、糖鎖の微粒子への担持と切り出しのステップが増えるため、操 作が煩雑になる。状況に応じて脱保護反応を使い分けることが必要である。

1-3-4 糖鎖のクラスター化

糖鎖は他の糖鎖やタンパク質、脂質と相互作用し、多種多様な機能を発現する。その結合様式は、 糖鎖を認識するタンパク質、すなわち、「レクチン」と総称されるものに注目すると、水酸基を介 した水素結合や金属イオンとのキレート結合²⁶⁾、糖の疎水面による疎水結合²⁷⁾、イオン結合²⁸⁾(酸 性糖鎖と塩基性アミノ酸など)を基本として複合的に働いている。しかしながら、これらの相互作 用は通常では非常に弱く、糖鎖とレクチンでは、結合解離定数*Kd*値でmMレベルであることが多 い。一般的に、薬として使用される有機化合物とその認識タンパク質では、*Kd*値でnMレベル以 下であることが多く、実に100万倍以上もの結合力の差がある。このことからわかるように、非 常に弱い一対の糖鎖—レクチン相互作用の高次構造解析やその機能について確認して評価するこ とは困難である。では、どのようにして働いているのだろうか。自然界において機能しているレク チンについて調べると、糖鎖一レクチン会合体が一組だけ存在しているというよりは、複数の会合体がクラスターを形成していることが多い。一つの糖から発生する相互作用は弱いが、これが2個、3個…10個、20個と積み重なると次第に強くなる。このように糖鎖が集積されることで強い相互作用を発揮することを多価効果、糖鎖クラスター効果などと呼ぶ²⁹⁾。

当研究室雨夜らはこの多価効果に着目し、糖鎖樹状分子(デンドリマー)の合成を報告している (Figure 1-26)³⁰⁾。固相上でデンドリマー分子を合成し、オルソゴナルに結合(プロパルギルエー テル、エステル、ニトロベンジル)を開裂させ、ガラクトース Dimer、Tetramer、Octamer 体の合 成に成功している。



Figure 1-26

以上のように、βグルカン糖鎖の構造と機能の解明のためには、相互作用の増強を目的とする多 価効果を利用した分子設計が強力なツールになると考えられる。しかしながら、大きな糖鎖を多く 束ねる手法は、立体障害から難しいと考えられ、合成手法の開発が必要である。

1-4 本論文の概要

本論文は「β グルカン受容体デクチン1 結合性オリゴ糖誘導体の合成とその生物機能評価」と題 し、免疫調整分子の創製を目的とした、β グルカン認識タンパク質であるデクチン1 を介する自然 免疫活性化作用を有する分子の合成戦略の開発、続く免疫細胞との相互作用研究への応用について 述べたものであり、以下全6章で構成されている。

第1章「序論」では多糖類の機能解明の意義および、化学合成による糖鎖供給の重要性について 述べ、研究の目的を明らかにした。

第2章「デクチン1の低分子リガンド探索を目的とする糖鎖合成」では、デクチン1に対する低 分子リガンドの発見を期待し、高度に分岐したβグルカン関連オリゴ糖鎖ライブラリーの機能評価 を行う。当研究室保有のβグルカン関連オリゴ糖鎖ライブラリーを用いてデクチン1に対するリガ ンド探索を行い、さらなる高結合糖鎖の開発について述べる。まず初めに、研究室保有の合成βグ ルカン関連オリゴ糖鎖と天然βグルカンとのデクチン1に対する競合結合阻害作用を検討する (Figure 1-27)。続いて、さらなる高結合糖鎖の開発を目指し、得られたリード化合物を基盤とし て誘導体の合成を行う。





Figure 1-27

第3章「 β (1,3) グルカン糖鎖の合成法の開発」では、効率的な直鎖 β グルカン関連糖鎖の 合成法の開発について述べる。分子量数十万もの多糖を認識するデクチン1には、大きな糖鎖認識 部位が存在すると考えられる。そこで、デクチン1と結合するためには、それ自体の大きさと同程 度以上の β (1,3) グルカン糖鎖長のものが必要であると考えた。最初に、分子力場計算により 算出した β (1,3) グルカンとX線構造解析によるデクチン1との大きさの比較を行い、目的と する糖鎖長を決定する。本研究では、 β (1,3) グルカンの直線的および収束的合成法の開発を 行い、デクチン1との結合試験を行うこととした (Figure 1-28)。



Figure 1-28

第4章「βグルカン関連オリゴ糖鎖の合成法の開発」では、多価効果を期待する糖鎖固定化微粒 子の開発を行う。この際、直鎖の糖のみならず、β(1,6)分岐鎖を有する糖鎖の合成が行える 合成法の開発について述べる。先に述べたとおり、9糖を主鎖とする合成βグルカンにおいて、分 岐鎖を有する糖鎖は直鎖の糖鎖よりもデクチン1に対して約100倍の結合力を有することが報 告されている。そこで、直鎖のみならず、分岐鎖を有する糖鎖の合成を目指した。この際、還元末 端にアミノアルキル基を有する糖鎖を設計することで、末端アミノ基を足掛かりとした分子プロー ブへの応用を志向した。

これらの糖鎖は、 β (1,3) 直鎖4糖供与体および β (1,6) 分岐糖部を導入した5糖供与体を利用するブロック合成法により合成する (Figure 1-29)。さらに、得られた糖鎖を用いてデクチン1との結合試験及び、免疫活性化試験を行う。



Figure 1-29

第5章「βグルカン糖鎖固定化微粒子の開発」では、デクチン1を介した免疫活性化の向上のため、βグルカン糖鎖を微粒子上に束ねた糖鎖固定化微粒子の開発について述べる。本研究では、様々な大きさの微粒子を用いてリガンド糖鎖の固定化を行い、デクチン1との相互作用試験を行う。この際、糖鎖の多価効果により、デクチン1に対する高い相互作用効果が期待できる(Figure 1-30)。



Figure 1-30

第6章「結論」では、本論文を総括した。

References

- 1) a) 江上不二夫編、多糖類化学、共立出版、1955.
 - b) 谷口直之、川嵜敏之、古川鋼一、木全弘二、鈴木明身編、糖鎖機能、共立出版、2003.
 - c) 永井克孝監、川嵜敏祐編、未来を拓く糖鎖科学、金芳堂、2005.
- a) Ulmer, A. J.; Rietschel, E. T.; Zahringer, U.; Hein, H. Trends Glycosci. Glycotechnol. 2002, 14, 53-68.
 - b) Alexander, C.; Zahringer, U. Trends Glycosci. Glycotechnol. 2002, 14, 69-86.
 - c) Takada, H.; Kotani, S. Crit. Rev. Microbiol. 1989, 16, 477-523.
- a) Maiti, K. K.; DeCastro, M.; Abdel-Aal El-Sayed, A. -B. M.; Foote, M. I.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, *1*, 80-91.
 - b) Fujimoto, Y.; Kimura, E.; Murata, S.; Kusumoto, S.; Fukase, K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 539-543.
 - c) Fujimoto, Y.; Adachi, Y.; Akamatsu, M.; Fukase, Y.; Kataoka, M.; Suda, Y.; Fukase, K.; Kusumoto, S. *J. Endotoxin Res.* **2005**, *11*, 341-347.
 - d) Seydel, U.; Schromm, A. B.; Brade, L.; Gronow, S.; Andra, J.; Muller, M.; Koch, M.
 H. J.; Fukase, K.; Kataoka, M.; Hashimoto, M.; Kusumoto, S.; Brandenburg, K. *FEBS J.* 2005, 272, 327-340.
- 4) a) 大野尚仁監修、βグルカンの基礎と応用、シーエムシー出版、2010.
 b) 安達禎之、大野尚仁、真菌多糖の免疫系による認識とその活性化作用、日本医真菌学会誌、2006, 47, 185-194.
 - c) 大野尚仁、βグルカンの生体防御系修飾作用、日本細菌学雑誌、2000, 55, 527-537.
 - d) Manners, D. J.; Mason A. J.; Patterson J. C.; *Biochem. J.* 1973, 135, 19-30.
 - e) DI Luzio, N. R. New York, Plenum Press 1976, 412-421.
 - f) Wooles, W. R.; DI Luzio, N. R. J. Reticuloendothelial Sec. 1964, 1, 160.
- 5) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 HP(http://www.info.pmda.go.jp/)
- 6) a) Kerrigan, A. M.; Brown, G. D. Mamm. Genome 2011, 22, 55-65.
 - b) Brown, G. D.; Herre, J.; Williams, D. L.; Willment, J. A.; Marshall, A. S.; Gordon,
 S. J. Exp. Med. 2003, 197, 1119.
 - c) Brown, G. D.; Taylor, P. R.; Reid, D. M.; Willment, J. A. *J. Exp. Med.* 2002, *196*, 407-412.
 d) Taylor, P. R.; Brown, G. D.; Reid, D. M.; Willment, J. A. *J. Immunol.* 2002, *169*, 3876-3882.
 - e) Brown, G. D.; Gordon, S. Nature 2001, 413, 36-37.
 - f) Ariizumi, K.; Shen, G. L.; Shikano, S.; Xu, S.; Ritter, R. 3rd; Kumamoto, T.; Edelbaum,
 D.; Morita, A.; Bergstresser, P. R.; Takashima, A. J. Biol. Chem. 2000, 275, 20157-20167.

- 7) Adachi, Y.; Ishii, T.; Ikeda, Y.; Hoshino, A.; Tamura, H.; Aketagawa, J.; Tanaka, S.; Ohno, N. Infection and Immunity 2004, 72, 4159-4171.
- Palma, S. A.; Feizi, T.; Zhang, Y.; Stoll, S. M.; Lawson, M. A.; Diaz-Rodriguez, E.; Campanero-Rhodes, A. M.; Costa, J.; Gordon, S.; Brown, D. G.; Chai, W. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 5771-5779.
- 9) Bächli, P.; Percival, E. G. V. J. Chem. Soc., 1952, 1243-1246.
- 10) a) Zeng, Y.; Ning, J.; Kong, F. *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 3729-3733.
 b) Wu, Z.; Ning, J.; Kong, F. *Carbohydr. Res.* 2003, 338, 2203-2212.
- 11) Takeo, K.; Maki, K.; Wada, Y.; Kitamura, S. Carbohydr. Res. 1993, 245, 81-96.
- 12) a) Fügedi, P.; Birberg, W.; Garegg P. J.; Pilotti, A. *Carbohydr. Res.* 1987, *164*, 297-312.
 b) Yang, G.; Kong, F. *Synlett* 2000, 1423-1426.
 - c) Zeng, Y.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 338, 2359-2366.
 - d) Jamois, F.; Ferrières, V.; Guégan, J.-P.; Yvin, J.-C.; Plusquellec, D.; Vetvickal,
 - V. Glycobiology 2005, 15, 393-407.
- 13) Takeo, K.; Kawaguchi, M.; Kitamura, S. J. Carbohydr. Chem. 1993, 12, 1043-1056.
- 14) For one-pot glycosylation see
 - a) Tanaka, H.; Adachi, M.; Tsukamoto, H.; Ikeda, T; Yamada, H; Takahashi, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4213-4216.
 - b) Yamada, H; Harada, T.; Takahashi, T. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7919-7920.
 - c) Yamada, H.; Kato, T.; Takahashi, T. Tetrahedron Lett. 1999, 40, 4581-4584.
 - d) Takahashi, T.; Adachi, M.; Matsuda, A.; Doi, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2599-2603.
 - e) Yamada, H.; Harada, T.; Miyazaki, H.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3979-3982.
 - f) Ley, S. V.; Priepke, H. W. M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33, 2292-2294.
 - g) Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X. S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734-753.
 - h) Yu, B.; Yu, H.; Hui, Y.; Han, X. Tetrahedron Lett. 1999, 40, 8591-8594.
 - i) Yu, B.; Xie, J.; Deng, S.; Hui, Y. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 12196-12197.
 - j) Cheung, M.-K.; Douglas, N. L.; Henzen, B.; Ley, S. V.; Pannecoucke, X. Synlett. 1997, 3, 257-260.
 - k) Green, L.; Hinzen, B.; Ince, S. J.; Langer, P.; Ley, S. V.; Warriner, S. L. *Synlett.* **1998**, *4*, 440-442.
- 15) Du, Y.; Zhang, M.; Kong, F. Org. Lett. 2000, 2, 3797-3800.
- 16) Tanaka, H.; Amaya, T.; Takahashi, T. Tetrahedron Lett. 2003, 44, 3053-3057.
- 17) He, H.; Yang, F.; Du, Y. Carbohydr. Res. 2002, 337, 1673-1678.
- 18) Fugedi, P., Birberg, W., Garegg, P. J., Pilotti, A. Carbohydr. Res. 1987, 164, 297-312.

- 19) a) Zeng, Y.; Kong, F. J. Carbohydr. Chem. 2003, 22, 881-890.
 b) Zeng, Y.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 338, 2359-2366.
 c) Ning, J.; Zhang, W.; Yi, Y.; Yang, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Kong, F. Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 2193-2203.
 d) Zeng, Y.; Zhang, W.; Ning, J.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 337, 2383-2391.
 - e) Li, A.; Kong, F. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2499-2506.

f) Jones, N. A.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. Org. Biomol. Chem., 2005, 3, 3201-3206.

- 20) Zeng, Y.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 338, 843-849.
- 21) Jones, N. A.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. Org. Biomol. Chem., 2005, 3, 3201-3206. Adams, E. L.; Rice, P. J.; Graves, B.; Ensley, H. E.; Yu, H.; Brown, G. D.; Gordon, S.; Monteiro, M. A.; Papp-Szabo, E.; Lowman, D. W.; Power, T. D.; Wempe, M. F.; Williams, D. L. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008, 325, 115-123.
- 22) a) Williams, D. L.; Ensley, H. E.; Yu, H. PCT Int. Appl. 2006, WO 2006042200.
 b) Yu, H.; Williams, D. L.; Ensley, H. E. Tetrahedron Lett. 2005, 46, 3417-3421.
- 23) Tanaka, H.; Yamanouchi, M.; Miyoshi, H.; Hirotsu, K.; Tachibana, H.; Takahashi, T. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 2231-2248.
- 24) Tanaka, H.; Ishida, T.; Matoba, N.; Tsukamoto, H.; Yamada, H.; Takahashi, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6349-6352.
- 25) Tanaka, H.; Tateno, Y.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. Org. Lett. 2008, 10, 5597-5600.
- 26) Feinberg, H.; Park-Snyder, S.; Kolatkar, A. R.; Heise, C. T.; Taylor, M. E.; Weis, W. I. J. Biol. Chem. 2000, 275, 21539-21548.
- 27) a) Feinberg, H.; Torgersen, D.; Drickamer, K.; Weis, W. I. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35176-35184.

b) Liao, D.-I.; Kapadia, G.; Ahmed, H.; Vasta, G. R.; Herzberg, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 1428-1432.

- 28) a) May, A. P.; Robinson, R. C.; Vinson, M.; Crocker, P. R.; Jones, E. Y. Mol. Cell 1998, 1, 719-728.
 - b) Roberts, D. L.; Weix, D. J.; Dahms, N. M.; Kim, J. J. Cell 1998, 93, 639-648.
 - c) Somers, W. S.; Tang J.; Shaw, G. D.; Camphausen, R. T. *Cell* **2000**, *103*, 467-479.
- 29) a) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 2754-2794.
 b) Lee, Y. C.; Lee, R. T. Acc. Chem. Res. 1995, 28, 321-327.
- 30) Amaya, T.; Tanaka, H.; Takahashi, T. Synlett. 2004, 497.

第2章

デクチン1の低分子リガンド探索を目的とする糖鎖合成

2-1 はじめに

序論において、自然免疫活性化分子の開発の意義について述べた。デクチン1を介する自然免疫 活性化分子の開発には、まず、デクチン1に結合し得る構造の明確な低分子リガンドの探索が必要 であると考えた。本章では、低分子のβグルカンオリゴ糖を合成し、低分子リガンドの探索を行う こととした。

2-2 低分子リガンド探索

天然の β グルカンには、様々な β (1, 6)分岐鎖を有する β グルカンが存在する。序論で述べたとおり、天然から得られる様々な β (1, 6)分岐鎖を持つ β グルカンでは、短い β (1, 6)分岐鎖を持つ β (1, 3)グルカンが、デクチン1と強く結合することを示唆する結果が報告されている。また、合成した β グルカン糖鎖においても、 β (1, 6)分岐単糖を有する糖鎖が、直鎖の β (1, 3)グルカンオリゴ糖よりも強くデクチン1と結合することが報告されている。以上のことから、 β (1, 6)分岐鎖の存在がデクチン1との結合性に寄与する可能性がある。一方、天然由来の β (1, 3)グルカンの加水分解物を用いた研究では、デクチン1への結合には10糖以上のグルコースユニットが必要であるといわれている。しかしながら、これらの加水分解物を用いた結果では、その中に含まれている糖鎖の構造は β (1, 3)グルカンオリゴ糖である。筆者は、より小さな、 β (1, 6)分岐鎖を有する β グルカンオリゴ糖がリガンドとなる可能性があると考えた(Figure 2-1)。



Figure 2-1

本章では、 β (1, 6)分岐鎖を含む β グルカンオリゴ糖において、デクチン1リガンドとなり 得ると考え、合成および、デクチン1と結合評価することとした (Figure 2-2)。



Figure 2-2

当研究室では以前、イネのファイトアレキシンエリシターの研究を行い、高度に分岐したβグル カン関連オリゴ糖鎖の合成を行っている(Figure 2-3)¹⁾。本化合物は、植物の免疫に関係してお り、自然免疫に関連するタンパク質デクチン1に対する低分子リガンドとなる可能性が期待できる。 まず始めに、当研究室で以前合成した4糖から6糖の分岐βグルカン関連オリゴ糖ライブラリーの 中から、デクチン1結合性のオリゴ糖の探索を検討することとした。

当研究室保有の β グルカン関連オリゴ糖鎖の、固定化 SPG(スエヒロタケ由来の天然 β グルカン。 別名:ソニフィラン)とデクチン1との結合に対する競合結合阻害試験を行った。用いた糖鎖は、 β (1,3)結合3糖を主鎖とするオリゴ糖(TTK8-01,TTK9-01)と β (1,3)結合4糖を主鎖 とするオリゴ糖(TTK10-01,TTK11-01,TTK13-01,TTK14-01,TTK15-01,TTK16-01)である。SPGは、 3糖の β (1,3)結合より構成する主鎖に対し、単糖の β (1,6)グルコシド側鎖を有する繰 り返し構造をとることがその組成から言われている(Figure 2-3)。本実験は、東京薬科大学薬学部 免疫学教室大野尚仁教授、安達禎之准教授の協力のもと行なった。



Figure 2-3

2-2-1 SPGとのデクチン1に対する競合阻害結合試験の方法

競合阻害結合試験の手順²⁾を以下に示す(Figure 2-4)。

- ・ ELISA プレートに対し、βグルカン(SPG、20 μg/mL)を4℃で一晩インキュベーションするこ とによりプレートに吸着させた後、本プレートを洗浄する。
- 別途、ビオチン標識可溶化デクチン1 (100 ng/mL)に対し、評価を行う合成βグルカンオリゴ 糖(0-500 μg/mL)で一時間前処理を行う。
- さきほどの ELISA プレートに対し、前処理を行ったデクチン1と合成βグルカンオリゴ糖の溶 液を加え、室温で一時間インキュベーションする。
- ・ ELISA プレートを洗い、余分なデクチン1や合成βグルカンオリゴ糖を取り除く。
- ・ ELISA プレートに対し、検出抗体を作用させてプレート上のデクチン1に結合させる。
- ・ 検出抗体を着色することで、ELISA プレート上のβグルカンに結合したデクチン1を測定する。



Figure 2-4
2-2-2 競合阻害作用測定

Figure 2-5 は、合成βグルカンオリゴ糖の濃度に対する ELISA プレートの吸光度を示している。 横軸は合成βグルカンオリゴ糖の濃度であり、縦軸は吸光度である。糖鎖がデクチン1に結合した 場合、観測される吸光度は低い。この試験において、より低濃度で結合阻害できるオリゴ糖が目的 とするリガンド糖鎖である。測定結果より、TTK9-01 が、デクチン1の固相化 SPG に対する結合を 強力に阻害できることが明らかとなった。また、オリゴ糖 TTK16-01、TTK14-01 が、その順で弱い ながら競合阻害作用を示した(Figure 2-6)。







以上の結果を考察する。阻害作用が確認された三種類のオリゴ糖は、すべてβ(1,3)主鎖に β(1,6)グルコースを一つ有するラクトール誘導体であった。それより、デクチン1への糖鎖 の結合に分岐の形や還元末端構造が重要であることが示唆された。しかしながら、天然の多糖分子

には還元末端の割合は低い。また、本評価に用いたサンプルは、合成後時間がたっており、化合物の分解化合物が作用を示した可能性も有する。特に、ラクトール誘導体は、アルデヒドを有するためにいろいろな化学反応を起こしやすいと考えられる。そこで、これらの化合物を再合成しその阻害作用を確認することとした(Figure 2-7)。



TTK9-01

Figure 2-7

2-3 合成計画

2-3-1 標的分子

TTK9 構造である、還元末端に β (1, 6) グルコシド結合をもつ β (1, 3) 主鎖の構造は変え ず、アノマー位を還元したもの、および、メチル基を導入した誘導体の合成を検討した (Figure 2-8)。



Figure 2-8

2-3-2 合成計画

合成計画を述べる(Figure 2-9)。目的とする4糖TTK9は、β(1,3)結合2糖の還元末端側の6位遊離水酸基および非還元末端側の3位遊離水酸基に対し、共通糖供与体であるチオ糖を用いて同時にグリコシル化反応することで合成する。その際、3位水酸基の反応性の低下を抑えるため 非還元末端のグルコースの4、6位の保護基はベンジリデンアセタールとした³⁾。2糖は、6位を クロロアセチル基およびレブリノイル基で保護した3位遊離水酸基を有する単糖受容体に対して 3位にシリル基を有するチオ糖とグリコシル化することによって合成する。得られた2糖は、シリ ル基およびクロロアセチル基(またはレブリノイル基)を選択的に脱保護することにより糖受容体 に変換する。その際、還元末端は、脱保護可能なベンジルグリコシド体と、メチルグリコシド体を 用いる。



Figure 2-9

2-4 メチルグリコシド体および TTK9 とその還元体の合成

まず始めに、アノマー位の立体が固定されたメチルグリコシド体の合成を検討した。

2-4-1 メチルグリコシド体の合成

2糖2-7の合成について述べる(Scheme 2-1)。糖供与体である3位水酸基にTBS 基を有するチオ 糖2-4⁵⁾(2.0当量)と6位水酸基にクロロアセチル基を有する糖受容体2-5(1.0当量)をジクロロメ タン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(2.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-40 ℃ で、*ト*ヨードコハク酸イミド(以下NIS、2.4当量)、トリフルオロメタンスルホン酸(以下TfOH、 0.1当量)によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、2糖2-6を 収率72%で得た。このとき、アノマー位の水素の結合定数により、生成物がβグリコシドであるこ とを確認した⁵⁾(Table 2-1:還元末端糖をA、非還元末端糖をBとおく)。続いて、2糖2-6をDMF 溶媒中、チオウレアを加え70℃に加熱することでクロロアセチル基を選択的に脱保護した。さら に、ピリジン溶媒中フッ化水素酸/ピリジンを加え60℃に加熱することでTBS 基を選択的に脱保 護し、2糖2-7を2段階収率81%で得た。



	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)		
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2)}	
2-6	4.25 (3.4)	5.27 (8.2)	

Table 2-1

4 糖 2-8 の合成を検討した (Scheme 2-2)。先に合成した二つの水酸基を有する 2 糖受容体 2-7 (1.0 当量) とチオ糖 2-4 (3.0 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (2.0 g/mmol) 存在 下混在させ脱水を行った。その後、NIS (3.6 当量)、TfOH (0.1 当量) によりフェニルチオ基を活性化 させグリコシル化反応を行った。-40 ℃にて反応を開始し、反応を完結させるため 0 ℃まで昇温し た。その結果、4 糖 2-8 を収率 74%で得た。生成物の構造決定を ¹H-NMR を用いて行なった結果、 アノマー位の結合定数が、7.7~8.2 Hz(β)、3.4 Hz(α)であったことにより、目的とする 4 糖が 得られていることを確認した (Table 2-2 : 還元末端糖を A とし、他の糖を B、C、D とおいた。B、C、 D は順不同)。



Table	2-2	2
-------	-----	---

次に、保護糖 2-8 の脱保護を行った (Scheme 2-3)。TBS 基、ベンゾイル基の脱保護を THF 溶媒下、 テトラブチルアンモニウムフルオライド (TBAF)を加えて 50 ℃に加熱して処理した後に、そのまま 系中に過剰量のナトリウムメトキサイド、メタノールを加えエステル基を除去し、3つのベンジリ デン基と 2 つのベンジル基を有する 4 糖を得た。さらに、水酸化パラジウム(20wt%炭素担持体) を用いた水素添加によりベンジル基およびベンジリデン基の脱保護を行い、望む α メチルグリコシ ド体 2-3 (TTK18-01)を 2 段階収率 49%で得た。¹H-NMR (Table 2-3:還元末端糖を A とし、他の糖を B、C、D とおいた。B、C、D は順不同)、COSY、¹³C-NMR (Table 2-4:還元末端糖を A とし、他の糖を B、C、D とおいた。B、C、D は順不同)、MASS、IR、比旋光度にて構造を確認した。



2-4-2 TTK9 と還元体の合成

4糖還元体の合成を検討した。2糖 2-10 の合成について述べる(Scheme 2-4)。6位水酸基にレ ブリノイル基を有する糖受容体 2-9(1.0当量)とチオ糖 2-4(2.0当量)をジクロロメタン溶媒中、モ レキュラーシーブス 4A(2.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、NIS(2.4当量)、TfOH(0.7 当量)によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。-40 ℃にて反応を開始し、 反応を完結させるため0 ℃まで昇温した。後処理後、ピリジン溶媒中フッ化水素酸/ピリジンを加 え 60 ℃に加熱することで TBS 基を選択的に脱保護した。続いて、THF 溶媒中ヒドラジン/酢酸を 加えることでレブリノイル基を選択的に脱保護し、2糖2-10を3段階収率85%でβ選択的に得た。 生成物の立体化学は、アノマー位の結合定数より決定した(Table 2-5:還元末端糖をA、非還元末 端糖をBとおく)。



	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)		
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	
2-10	4.50 (7.7)	4.93 (7.7)	

Table 2-5

4 糖 2-11 の合成を検討した (Scheme 2-5)。先に合成した二つの水酸基を持つ 2 糖受容体 2-10(1.0 当量) とチオ糖 2-4(2.4 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在 下混在させ脱水を行った。その後、NIS(2.88 当量)、TfOH(0.5 当量)によりフェニルチオ基を活性 化させグリコシル化反応を行った。-40 °Cにて反応を開始し、反応を完結させるため-20 °Cまで昇 温した。後処理、精製を行い、TTK9 保護体 2-11 を収率 68%で β 選択的に得た。生成物の立体化学 は、アノマー位の結合定数をもとに決定した (Table 2-6:還元末端糖を A とし、他の糖を B、C、D とおいた。B、C、D は順不同)。



Scheme 2-5

	δ (ppm) (<i>J</i> , F	łz)		
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	H-D1 (J _{1,2})
2-11	4.67 (8.2)	ND (7.2)	ND (7.7)	ND (8.2)

ND: not determined

Table 2-6

次に、保護糖 2-11 の脱保護を行った (Scheme 2-6)。TBS 基、ベンゾイル基の脱保護を THF 溶媒下、 TBAF を加えて 50 ℃に加熱して処理した後に、そのまま系中に過剰量のナトリウムメトキサイド、 メタノールを加えて行った。さらに、水素添加によりベンジル基およびベンジリデン基の脱保護を 行い、望む TTK9 の再合成体 2-1 (TTK9-02)を 2 段階収率 88%で得た。¹H-NMR、MASS、IR、比旋光度 にて構造を確認した (Table 2-7:還元末端糖を A とし、他の糖を B、C、D とおいた。B、C、D は順 不同)。さらに、雨夜の合成した TTK9-01 と ¹H-NMR が一致した (Figure 2-10)。



Scheme 2-6

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)			
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	H-D1 (J _{1,2})
2-1 α 2-1 β	5.23 (3.9) 4.67 (7.7)	4.73 (7.7) 4.73 (7.7)	4.75 (8.2) 4.75 (8.2)	4.76 (7.7) 4.76 (7.7)

Table 2-7



¹H-NMR (D₂0 70 ℃) Figure 2-10

4 糖の還元末端の還元を検討した。4 糖 **2-1**(TTK9-02)に対し、水溶媒中、NaBH₄を室温下作用させた。その結果、トリグルコシルグルシトール **2-2**(TTK19-01)を収率 88%で得た(Scheme 2-7)。 ¹H-NMR(Table 2-8:糖A、B、Cは順不同)、¹³C-NMR、MASS、IR、比旋光度にて構造を確認した。



Scheme 2-7

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)			
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	
2-2	4.49 (8.2)	4.67 (8.2)	4.72 (7.7)	

Table 2-8

2-4-3 競合結合阻害試験

得られたαメチルグリコシド体 2-3(TTK18-01)と TTK9 の再合成体 2-1(TTK9-02)、その還元体 2-2(TTK19-01)の、固定化 SPG とデクチン1との結合に対する競合結合阻害試験を行った。測定結 果を Figure 2-11に示す。



測定結果より、αメチルグリコシド体 2-3(TTK18-01)と還元体 2-2(TTK19-01)、および、TTK9の 再合成体 2-1(TTK9-02)のすべてのサンプルにおいて、結合阻害作用が観測されなかった。再合成体 が活性を示さなかった可能性について考察した。その結果、以下の可能性が考えられた。 1)今回合成した 2-1(TTK9-02)の合成方法に問題があり、副生成物が活性本体となっている可能性。 2) TTK9-01 の合成方法に問題があり、副生成物が活性本体となっている可能性。

3) TTK9-01 の経年変化により混入した夾雑物、ならびに分解された物質が活性本体となっている可能性。

1)の可能性は、2-1(TTK9-02)ならびにその還元体 2-2(TTK19-01)の構造決定もしており、可能性 としてはあまり高くないと考えられる。そこで、2)、3)の可能性を考え、以前当研究室で合成され た方法でTTK9の合成を検討することとした。

2-5 従来法による TTK9 合成とその競合結合阻害試験

2-5-1 従来法による TTK9 合成

当研究室雨夜による TTK9 の合成方法 ¹⁾により、TTK9 の再合成を行った。当量および操作は全て これに準じて行った。まず、2糖チオ糖供与体 2-14 の合成を行った(Scheme 2-8)。3位に遊離水 酸基を持つチオ単糖 2-13(1.0 当量)とブロモ単糖 2-12(1.3 当量)をジクロロメタン、トルエン混合 溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-40 ℃で、 銀トリフラート(2.6 当量)を用いてブロモ基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、 速やかにグリコシル化反応は進行し、2 糖チオ糖供与体 2-14 が収率 53%で得られた。生成物の立 体化学は、アノマー位の結合定数にて決定した(Table 2-9:還元末端糖を A、非還元末端糖を B とお く)。



Table 2-9

β (1, 6) 結合 2 糖受容体 2-16 の合成を行った (Scheme 2-9)。 2 糖チオ糖 2-15(1.0 当量) と ベンジルアルコール(10 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存 在下混在させ脱水を行った。その後、NIS(1.5 当量)、TfOH(0.6 当量)によりフェニルチオ基を活性 化させ、ベンジルアルコールの導入を行い、収率 88%で糖受容体 2-16 を得た。このグリコシル化 反応の際、還元末端糖の 2 位のベンゾイル基が 3 位水酸基へ転位した副生成物 2-17 の生成が見ら れた。この際の 2-16、2-17 の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行なった (Table 2-10:還元末端 糖を A、非還元末端糖を B とおく)。還元末端糖の 2,3 位の化学シフトに注目すると、2-15 に対 し 2-16 はほとんど化学シフトに変化が無いが、2-17 は 2 位の化学シフトが 1.38 ppm 高磁場シフト し、3 位の化学シフトが 1.42 ppm 低磁場シフトした。また、¹H-¹H COSY より、2-16 は水酸基のプ ロトンと3位のプロトンの相関が見られ、2-17 は水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られた。これらより、副生成物 2-17 は2位のベンゾイル基が3位水酸基へ転位が起こった化合物であると考えられる

。一般的に、トランス体の転位は非常に起こりにくく、この結果は驚くべきものである。一方、 生成物の立体化学は、アノマー位の結合定数にて決定した(Table 2-10)。この副生成物 2-17 由来 による化合物に結合阻害活性があった可能性があるため、混合物のまま続く反応を行った。



Scheme 2-9

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)			
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-A3	H-B1 (J _{1,2})
2-15 2-16 2-17	ND 4.44 (7.7) 4.37 (7.7)	4.99 4.99 3.61	3.90 3.78 5.32	ND 4.61 (8.2) 4.63 (8.2)

ND: not determined

Table 2-10

続いて、TTK9の骨格構築を行った(Scheme 2-10)。先に合成した2糖受容体2-16、2-17 混合物と 2糖供与体2-14をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ 脱水を行った。その後、-40 ℃にてNIS(7.0 当量)、TfOH(0.9 当量)によりフェニルチオ基を活性化 させグリコシル化反応を行った。-30 ℃に昇温し、1.3 時間後に糖供与体の消失を確認した。反応 の後処理精製を行なった結果、TTK9 保護体2-18 が得られた。生成物はほぼ単一であり、副生成物 2-17 と2糖供与体2-14 とのカップリング体2-19 の生成は見られなかった。生成物の構造決定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行った。生成物の立体化学は、アノマー位の結合定数にて決定した(Table 2-11:還元末端糖をAとし、他の糖をB、C、Dとおいた。B、C、Dは順不同)。また、生成物の2位 は2-17 の2位と比較して低磁場に存在し(Table 2-11)、2-17 が反応したカップリング体2-19 では ないと判断した。



Scheme 2-10

	δ (ppm) (<i>J</i> , Η	Hz)						
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-B1 (J _{1,2})	H-B2	H-C1 (J _{1,2})	H-C2	H-D1 (J _{1,2})	H-D2
2-18	4.13 (8.2)	4.90	4.58 (7.7)	5.09	4.63 (8.2)	5.29	4.65 (7.7)	4.96

Table :	2 - 11
---------	--------

最後に、得られた TTK9 保護体 2-18 の脱保護を行った(Scheme 2-11)。まず、アセトニトリル溶 媒中フッ化水素酸を加えて TBS 基を選択的に脱保護し、メタノール溶媒中ナトリウムメトキサイド を加えてベンゾイル基とトリル基の脱保護を行った。簡易カラム精製後、水酸化パラジウム(20wt% 炭素担持体)を用いた水素添加によりベンジル基の脱保護を行った。雨夜の合成では、最後の水素 添加反応の後、残った水酸化パラジウム(20wt%炭素担持体)をセライトにてろ過している。今回 セライトにてろ過を行ったサンプルを TTK9-03 とし、さらに逆相カラム(Bond Elut-C18)にて精製 を行ったものを TTK9-04 として競合結合阻害試験を行った。



Scheme 2-11

2-5-2 競合阻害活性試験

得られた TTK9-03 (セライトろ過のみ)と TTK9-04 (逆相精製体)の、固定化 SPG とデクチン1 との結合に対する競合結合阻害試験を行った。測定結果を Figure 2-12 に示す。測定結果より、 TTK9-03 (セライトろ過のみ)は TTK9-01 よりも結合力は弱いものの結合阻害活性を示し、TTK9-04 (逆相精製体)は全く活性を示さなかった。この結果より、TTK9 が水素添加反応後におけるパラジ ウム炭素やセライトなどを介してデクチン1との結合を介している可能性や、逆相カラムにて得ら れない非水溶性の化合物(糖以外)が活性体である可能性などが考えられる。



Figure 2-12

2-6 まとめ

本章では、マクロファージなどの細胞表層上に存在し、βグルカンを特異的に認識するレセプタ ーであるデクチン1の低分子リガンド探索を行った。まず始めに、以前当研究室で合成したβグル カン関連オリゴ糖鎖を用いる SPG のデクチン1への結合に対する競合結合阻害試験を行い、オリゴ 糖鎖 TTK9 が強い結合阻害活性を示すことを発見した。この結果を受けて、TTK9 を含む類縁体の合 成を行った。しかしながら、再合成体は結合阻害活性を全く示さなかった。再び以前の合成方法で TTK9 を合成し、競合結合阻害試験を行ったところ、最終段階の反応後ろ過のみのサンプルは活性を 示したが、逆相精製体は活性を示さなかった。このことから、TTK9 は活性体ではなく、ごく微量に 含まれているパラジウムなどの無機物や糖以外の非水溶性化合物が活性に影響を与えているもの だと結論付けた。

2-7 基質の合成

糖受容体 2-5 の合成について述べる (Scheme 2-12)。6 位に水酸基を持つメチルグリコシド 2-20⁶⁾ に対し、ジクロロメタン溶媒中、クロロアセチルクロライドとピリジンを加えてクロロアセチル基 の導入を行い、クロロアセチル体 2-21 を収率 92%で得た。続いて、アセトニトリル溶媒中フッ化 水素酸を加えて TBS 基を選択的に脱保護し、3 位に水酸基を持つ糖受容体 2-5 を収率 84%で得た。



糖受容体 2-9 の合成について述べる (Scheme 2-13)。チオ糖 2-22¹⁾ (1.0 当量) とベンジルアルコー ル (10 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (1.5 g/mmol) 存在下混在させ脱水 を行った。その後、NIS (2.0 当量)、TfOH (0.7 当量) によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル 化した後、ピリジン溶媒中フッ化水素酸・ピリジンを加え 60 ℃に加熱することで TBS 基を選択的 に脱保護し、2 段階収率 50%で3位に水酸基を持つ糖受容体 2-9 を得た。



Scheme 2-13

References

- a) 雨夜徹、博士論文、東京工業大学、2002.
 b) Amaya, T.; Tanaka, H.; Yamaguchi, T.; Shibuya, N.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett*.
 2001, 42, 9191-9194.
 - c) Takahashi, T.; Okano, A.; Amaya, T.; Tanaka, H.; Doi, T. Synlett 2002, 911-914.
 - d) Tanaka, H.; Amaya, T.; Takahashi, T. Tetrahedron Lett. 2003, 44, 3053-3057.
- Procedure for Dectin-1 binding assay see Tada, R.; Adachi, Y.; Ishibashi, K.; Tsubaki, K.; Ohno, N. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 1442-1450.
- 3) a) Takeo, K.; Maki, K.; Wada, Y.; Kitamura, S. *Carbohydr. Res.* 1993, 245, 81-96.
 b) Fügedi, P.; Birberg, W.; Garegg P. J.; Pilotti, A. *Carbohydr. Res.* 1987, 164, 297-312.
 c) Yang, G.; Kong, F. *Synlett* 2000, 1423-1426.
 d) Zeng, Y.; Kong, F. *Carbohydr. Res.* 2003, 338, 2359-2366.
 - e) Jamois, F.; Ferrières, V.; Guégan, J.-P.; Yvin, J.-C.; Plusquellec, D.; Vetvickal,
 V. *Glycobiology* 2005, 15, 393-407.
- 4) Nicolaou, K.C.; Winssinger, N.; Pastor, J.; DeRoose, F. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, *119*, 449-450.
- 5) Manfred, H.; Herbert, M.; Bernd, Z.; 野村正勝 監修、馬場章夫、三浦雅博他 訳、有機化 学のためのスペクトル解析法、化学同人、2002.
- 6) 井上仁史、博士論文、東京工業大学、2002.

NMR spectra were recorded on a JEOL Model EX-270 (270 MHz for ¹H, 67.8 MHz for ¹³C) or a JEOL Model ECP-400 (400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C) in the indicated solvent. Chemical shifts were reported in part per million (ppm) relative to the signal (0.00 ppm) for internal tetramethylsilane solutions in CDCl₃. ¹H NMR spectral data are reported as follows: CDCl₃ (7.26 ppm), CD₃OD (3.30 ppm) or D₂O (HOD (4.7015 ppm at 303 K, 4.5977 ppm at 313 K, 4.5541 ppm at 318 K, 4.5025 ppm at 323 K, 4.3168 ppm at 343 K)). ¹³C NMR spectral data are reported as follows: CDCl₃ (77.1 ppm), CD₃OD (49.8 ppm) or D₂O (acetone-*d*₆ (30.3 ppm) as internal standard). NMR multiplicities are reported using the following abbreviations.

(s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet, br: broad, J: coupling constants in Hertz.)

Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 1. Only the strongest and/or structurally important absorbances are reported as the IR data given in cm⁻¹.

Optical rotations were measured on a JASCO model P-1020 polarimeter.

The reactions were monitored by thin layer chromatography carried out on Merck precoated TLC plates (60F-254) using UV light and *p*-anisaldehyde H_2SO_4 ethanol solution or 10% ethanolic phosphomolybdic acid.

Column chromatography separations were performed using silica gel (Merck, silica gel). Flash column chromatography separations were performed using silica gel (KANTO, silica gel 60 N, spherical, neutral, 40-100 um).

High performance liquid chromatography (HPLC) for qualitative and quantitative anlysis were performed on a Gilson 506C system using a SHODEX ODS column (4.6×250 mm).

Gel permeation chromatography (GPC) for qualitative analysis were performed on Japan Analytical Industry Model LC908 (recycling preparative HPLC) using a polystylene gel column (JAIGEL-1H, 20 mm \times 600 mm). Detection of products was made by UV detector (Japan Analytical Industry Model 310) and refractive index detector (Japan Analytical Industry Model RI-5).

ESI-TOF Mass spectra were measured with AppliedBioSystems Mariner TK-3500 Biospectrometry Workstation mass spectrometers and Waters LCT PremierTM XE. HRMS(ESI-TOF) were calibrated with angiotensin I (SIGMA), bradykinin (SIGMA), and neurotensin (SIGMA) as an internal standard.

Experimental Section

Dry THF, dry hexane, dry toluene and dry Et_2O were distilled from sodium wire contained with a catalytic amount of benzophenone. Dry dichloromethane was distilled from P_2O_5 . Dry DMF, dry triethylamine and dry EDA were distilled from CaH₂. Dry methanol and dry ethanol were distilled from magnesium contained with a catalytic amount of iodine. *N*-iodosuccinimide was recrystallized from CCl₄-1,4 dioxane. Pulverized MS4A was activated by heating at 350 °C for 8 h.

H-Cube[™] (THALES Nanotechnology) for hydrogenation was performed using a CatCart[®] holder (THALES Nanotechnology, 10% Pd/C, THS01111).

Scanning electron microscopy (SEM) was performed on a SHIMAZU SS-550.

Experimental Section

Methyl 2,4-di-O-benzyl-3-O-tert-butyldimethylsilyl-6-O-chloroacetyl-a-D-glucopyranoside (2-21)

To a stirred solution of methyl 2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- α -D-glucopyranoside (**2-20**) (115 mg, 0.235 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (2.30 mL) was added chloroacetyl chloride (22.5 µL, 0.282 mmol, 1.20 eq.) and pyridine (28.6 µL, 0.353 mmol, 1.50 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 13 h, the reaction mixture was poured into water. The aqueous layer was extracted with two portions of Et₂O. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 90 : 10 to give methyl 2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-6-*O*-chloroacetyl- α -D-glucopyranoside (**2-21**) (123 mg, 0.217 mmol, 92%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.30-7.39 (m, 10H, aromatic), 4.91 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.78 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.53 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.51 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.42 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 3.4$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.18 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.06 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 4.00 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 15.0$ Hz), 3.95 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 15.0$ Hz), 3.78 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz), 3.32 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz), 3.31 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 3.28 (s, 3H, OMe), 0.98 (s, 9H, a), 0.16 (s, 3H, b), 0.11 (s, 3H, b').



Methyl 2,4-di-O-benzyl-6-O-chloroacetyl-a-D-glucopyranoside (2-5)

To a stirred solution of methyl 2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-6-*O*-chloroacetyl- α -D-glucopyranoside (**2-21**) (35.8 mg, 63.3 µmol, 1.00 eq.) in acetonitrile (0.600 mL) was added 40% aq. hydrogen fluoride (10.0 µL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 80 : 20 to give methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-chloroacetyl- α -D-glucopyranoside (**2-5**) (24.1 mg, 53.4 µmol, 84%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.37 (m, 10H, aromatic), 4.91 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.70 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.67 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.66 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.59 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 3.4$ Hz), 4.36 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.32 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.10 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 4.00 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 15.0$ Hz), 3.93 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 15.0$ Hz), 3.80 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz), 3.40 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), $J_{4,5} = 10.1$ Hz), 3.35 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 3.32 (s, 3H, OMe), 2.56 (br-s, 1H, a).



Methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-chloroacetyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethyl silyl-β-D-glucopyranosyl)-α-D-glucopyranoside (2-6)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (**2-4**) (69.6 mg, 0.120 mmol, 2.00 eq.), methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-chloroacetyl- α -D-glucopyranoside (**2-5**) (27.0 mg, 60.1 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (120 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.00 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (32.5 mg, 0.144 mmol, 2.40 eq.) and TfOH (0.500 µL, 6.00 µmol, 0.100 eq.) at -40 °C. After being stirred at the same temperature for 2 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 80 : 20 to give methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-chloroacetyl-3-*O*-(2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyl dimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**2-6**) (40.0 mg, 43.5 µmol, 72%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (d, 2H, c, J = 7.2 Hz), 7.11-7.57 (m, 18H, aromatic), 5.52 (s, 1H, d), 5.34 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 8.2$ Hz, $J_{B2,B3} = 8.7$ Hz), 5.27 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 8.2$ Hz), 5.03 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.63 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.60 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.33 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz, $J_{A3,A4} = 8.7$ Hz), 4.25 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz), 4.22-4.30 (m, 2H, H-A6a, H-A6b), 4.18 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.06 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = 8.7$ Hz, $J_{B3,B4} = 9.2$ Hz), 3.95 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 15.0$ Hz), 3.88 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.73 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = 10.1$ Hz, $J_{A5,A6a} = 2.4$ Hz, $J_{A5,A6b} = 4.3$ Hz), 3.67 (dd, 1H, H-B6a, $J_{B5,B6a} = 10.1$

Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.62 (dd, 1H, H-B4, $J_{B3,B4} = 9.2$ Hz, $J_{B4,B5} = 9.7$ Hz), 3.48 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = 9.7$ Hz, $J_{B5,B6a} = 10.1$ Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.35 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 8.7$ Hz, $J_{A4,A5} = 10.1$ Hz), 3.24 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz), 3.23 (s, 3H, OMe), 0.69 (s, 9H, a), -0.02 (s, 3H, b), -0.11 (s, 3H, b).



$Methyl \ 2,4-di-\textit{O}-benzyl-3-\textit{O}-(2-\textit{O}-benzoyl-4,6-\textit{O}-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranoside (2-7)$

To a stirred solution of methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-chloroacetyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**2-6**) (40.0 mg, 43.5 µmol, 1.00 eq.) in dry DMF (1.00 mL) was added thiourea (16.6 mg, 0.218 mmol, 5.00 eq.) and 2,6-lutidine (25.0 µL, 0.218 mmol, 5.00 eq.) at room temperature. After being stirred at 70 °C for 28 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with water, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in pyridine (0.440 mL) was added HF \cdot pyridine (43.5 μ L) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃ at 0 °C. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 50 : 50 to give methyl 2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-(2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2-7) (25.7 mg, 35.3 μ mol, 2 steps 81%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (d, 2H, b, J = 7.2 Hz), 7.11-7.58 (m, 18H, aromatic), 5.54 (s, 1H, a), 5.28-5.33 (m, 2H, H-B1, H-B2), 5.04 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.65 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.62 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz, $J_{A3,A4} = 8.7$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.28 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz), 4.23 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.09 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = 8.7$ Hz, $J_{B3,B4} = 9.2$ Hz), 3.62-3.73 (m, 4H, H-B4, H-A6a, H-A6b, H-B6a), 3.58 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz, $J_{A5,A6a} = 2.9$ Hz, $J_{A5,A6b} = 3.4$ Hz), 3.50 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = 9.7$ Hz, $J_{B5,B6a} = 9.7$

第2章

Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.44 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 8.7$ Hz, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz), 3.28 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz), 3.24 (s, 3H, OMe).



Methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2-8)

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-tert-butyldimethylsilyl-β-Dglucopyranoside (2-4) (59.1 mg, 0.102 mmol, 3.00 eq.), methyl 2,4-di-O-benzyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2-7) (24.8 mg, 34.0 μ mol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (68.0 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.00 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (27.6 mg, 0.123 mmol, 3.60 eq.) and TfOH (0.300 µL, 3.40 µmol, 0.100 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 75 : 25 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give methyl 2,4-di-O-benzyl-6-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-tert-butyl dimethylsilyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylid ene-3-O-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2-8) (39.7) mg, 23.8 µmol, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (d, 2H, c or c' or c", J = 7.2 Hz), 7.85 (d, 2H, c or c' or c", J = 7.2 Hz), 7.71 (d, 2H, c or c' or c", J = 7.2 Hz), 6.94-7.56 (m, 34H, aromatic), 5.51 (s, 1H, d or d' or d"), 5.42 (s, 1H, d or d' or d"), 5.31 (s, 1H, d or d' or d"), 5.23 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.20 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.20 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.2$ Hz), 5.11 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.88 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or

H-D1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.58 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.55 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.31 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.31 (dd, 1H, H-B6b or H-C6b or H-D6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.25 (dd, 1H, H-B6b or H-C6b or H-D6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.25 (dd, 1H, H-B6b or H-C6b or H-D6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.17 (dd, 1H, H-B6b or H-C6b or H-D6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.17 (dd, 1H, H-B6b or H-C6b or H-D6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.13 (dd, 1H, H-B3 or H-C3 or H-D3, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 4.08 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 9.7$ Hz, $J_{A3,A4} = 9.2$ Hz), 4.04 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz), 4.03 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 11.1$ Hz), 3.97-4.03 (m, 2H, H-B3 or H-C3 or H-D3, H-A6b), 3.90 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 3.86 (dd, 1H, H-B3 or H-C3 or H-D3, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.78 (dd, 1H, H-B6a or H-C6a or H-D6a, $J_{5,6a} = 10.1$ Hz), $J_{eem} = 10.1$ Hz), 3.73 (dd, 1H, H-B6a or H-C6a or H-D6a, $J_{5,6a} = 9.7$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.69 (dd, 1H, H-B4 or H-C4 or H-D4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.60 (dd, 1H, H-B4 or H-C4 or H-D4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.59 (dd, 1H, H-B4 or H-C4 or H-D4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.59 (dd, 1H, H-B5, H-C5, H-D5, H-B6a or H-C6a or H-D6a), 3.08 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 9.2$ Hz, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz), 3.01 (s, 3H, OMe), 2.96 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 3.4$ Hz, $J_{A2,A3} = 9.7$ Hz), 0.69 (s, 9H, a or a'), -0.05 (s, 3H, b or b'), -0.12 (s, 3H, b or b'), -0.15 (s, 3H, b or b'), -0.29 (s, 3H, b or b').



Methyl 6-O- β -D-glucopyranosyl-3-O-(3-O- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (2-3)

To a stirred solution of methyl 2,4-di-*O*-benzyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tertbutyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**2-8**) (26.9 mg, 16.1 µmol, 1.00 eq.) in THF (0.800 mL) was added 1 M THF solution of tetrabutylammonium fluoride (0.100 mL) at room temperature. After being stirred at 50 °C for 12 h, the reaction mixture was cooled to room temperature. Then, methanol (0.800 mL) and sodium methoxide (10.0 mg) were added to the reaction mixture. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with chloroform : methanol 97 : 3. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in methanol (1.20 mL), water (0.200 mL) and ethyl acetate (0.600 mL) was added Pd(OH)₂ (35.0 mg). The reaction mixture was hydrogenolyzed for 12 h under H₂ gas atmosphere at room temperature. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with methanol : water 10 : 90 to give methyl 6-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-*O*-(3-*O*- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**2-3**) (5.40 mg, 7.93 µmol, 2 steps 49%).

[α]_D²⁸ +25.3 ° (*c* 0.260, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 40 °C): δ 4.79 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2}$ = 3.4 Hz), 4.72 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.71 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.47 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.14 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b}$ = 1.9 Hz, J_{gem} = 11.6 Hz), 3.88-3.91 (m, 4H, H-A6a, H-B6b, H-C6b, H-D6b), 3.87 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3}$ = 9.7 Hz, $J_{A3,A4}$ = 9.2 Hz), 3.67-3.83 (m, 6H, H-A2, H-B3 or H-C3 or H-D3, H-A5, H-B6a, H-C6a, H-D6a), 3.59 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4}$ = 9.2 Hz, $J_{A4,A5}$ = 8.7 Hz), 3.36-3.55 (m, 11H, H-B2 or H-C2 or H-D2, H-B3 or H-C3 or H-D3, H-B4, H-C4, H-D4, H-B5, H-C5, H-D5, OMe), 3.33 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 30 °C): δ (103.6x2, 103.4, 100.1 (anomeric)), 85.2, 83.0, 76.8, 76.7, 76.5, 76.4x2, 74.3, 74.0, 73.9, 71.6, 71.3, 70.5, 70.4, 69.3, 68.9, 68.6, 61.6, 61.5x2, 56.1; IR (solid): 3722, 2877, 1577, 1461, 1040, 914, 762, 581 cm⁻¹; LRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₅H₄₄O₂₁ [M+H]⁺ m/z = 681.25, found: 681.28.



Benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (2-10)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-6-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**2-22**) (236 mg, 0.347 mmol, 1.00 eq.), benzylalcohol (0.360 mL, 3.47 mmol, 10.0 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (521 mg) in dry CH₂Cl₂ (3.50 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (156 mg, 0.694 mmol, 2.00 eq.) and TfOH (21.5 μ L, 0.243 mmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 3 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene : ethyl acetate 93 : 7. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of part of the residue (0.272 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (1.00 mL) was added HF \cdot pyridine (0.100 mL) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 60 : 40 to give benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**2-9**) (76.2 mg, 0.135 mmol, 2 steps 50%).

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (**2-4**) (156 mg, 0.270 mmol, 2.00 eq.), benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**2-9**) (76.2 mg, 0.135 mmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (270 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.70 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (72.9 mg, 0.324 mmol, 2.40 eq.) and TfOH (8.36 µL, 94.5 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 2 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in pyridine (1.00 mL) was added HF \cdot pyridine (0.100 mL) at room temperature. After being stirred at 60 °C for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in*

vacuo. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in dry THF (2.00 mL) was added hydrazine monohydrate (0.200 mL) and acetic acid (0.500 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane : ethyl acetate 60 : 40 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**2-10**) (94.4 mg, 0.115 mmol, 3 steps 85%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, 2H, b or b', J = 6.8 Hz), 7.87 (d, 2H, b or b', J = 7.2 Hz), 7.04-7.68 (m, 21H, aromatic), 5.50 (s, 1H, a), 5.22 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz), 5.14 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 7.7$ Hz, $J_{B2,B3} = 9.2$ Hz), 5.01 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.93 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 7.7$ Hz), 4.73 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.63 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.52 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.50 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.33 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.27 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 9.2$ Hz), 3.86 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 2.9$ Hz, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 3.81 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = J_{B3,B4} = 9.2$ Hz), 3.70 (dd, 1H, H-A6a, $J_{A5,A6a} = 4.3$ Hz, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 3.66 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 8.7$ Hz, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz), 3.61 (dd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz, $J_{A5,A6b} = 4.3$ Hz), 3.37 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = 9.7$ Hz), 3.42 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = 9.7$ Hz, $J_{A5,A6b} = 4.3$ Hz).



Benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (2-11)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (**2-4**) (160 mg, 0.276 mmol, 2.40 eq.), benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**2-10**) (94.4 mg, 0.115 mmol, 1.00 eq.)

(azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (230 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.30 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (74.5 mg, 0.331 mmol, 2.88 eq.) and TfOH (5.00 μ L, 57.5 μ mol, 0.500 eq.) at -40 °C. After being stirred at -30 °C for 40 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene : ethyl acetate 95 : 5 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (**2-11**) (133 mg, 75.5 μ mol, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.99 (d, 2H, c or c' or c'' or c''', J = 7.2 Hz), 7.77 (d, 2H, c or c' or c'' or c''', J = 7.2 Hz), 7.71 (d, 2H, c or c' or c'' or c''', J = 7.2 Hz), 7.64 (d, 2H, c or c' or c'' or c''', J = 7.2 Hz), 6.90-7.57 (m, 37H, aromatic), 5.53 (s, 1H, d or d' or d''), 5.39 (s, 1H, d or d' or d''), 5.25 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.16 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.2$ Hz), 5.11 (s, 1H, d or d' or d''), 5.07 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 6.8$ Hz), 4.84 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 6.8$ Hz), 4.84 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 6.8$ Hz), 4.84 (dd, 1H, H-A2 or H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.2$ Hz), 4.76-4.80 (m, 3H, H-A1 or H-B1 or H-C1 or H-D1x3), 4.67 (d, 1H, H-A1 or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.33-4.37 (m, 2H, H-A6b or H-B6b or H-C6b or H-D6b, Bn), 4.30 (d, 1H, Bn, $J_{gem} = 13.0$ Hz), 4.11-4.22 (m, 5H, H-A6b or H-B6b or H-C6b or H-D6b, Bn), 3.93-4.07 (m, 4H, H-A3, H-B3, H-C3, H-D3), 3.28-3.83 (m, 12H, H-A4, H-B4, H-C4, H-D4, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a), 0.69 (s, 9H, a or a'), 0.59 (s, 9H, a or a'), -0.06 (s, 3H, b or b'), -0.15 (s, 3H, b or b'), -0.17 (s, 3H, b or b'), -0.30 (s, 3H, b or b'); LRMS (ESI-TOF) calcd for C₉₉H₁₁₀O₂₅Si₂ [M+NH₄]⁺ m/z = 1773.73, found: 1773.64.



$6-O-\beta$ -D-Glucopyranosyl- $3-O-(3-O-\beta$ -D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl- α - and -β-D-glucopyranose (2-1)

To a stirred solution of benzyl 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**2-11**) (43.7 mg, 24.9 µmol, 1.00 eq.) in THF (2.00 mL) was added 1 M THF solution of tetrabutylammonium fluoride (0.200 mL) at room temperature. After being stirred at 50 °C for 12 h, the reaction mixture was cooled to room temperature. Then, methanol (2.00 mL) and sodium methoxide (20.0 mg) were added to the reaction mixture. After being stirred at room temperature for 1.5 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with chloroform : methanol 98 : 2. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in methanol (3.00 mL), water (0.500 mL) and ethyl acetate (1.50 mL) was added Pd(OH)₂ (32.8 mg). The reaction mixture was hydrogenolyzed for 12 h under H₂ gas atmosphere. The reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with water to give 6-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-*O*-(3-*O*- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl- α - and - β -D-glucopyranose (**2-1**) (14.5 mg, 21.8 µmol, 2 steps 88%).

 $[\alpha]_{D}^{28}$ +3.60 ° (*c* 0.295, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 70 °C): δ 5.23 (d, 1H, H-A1 α , $J_{A1,A2}$ = 3.9 Hz), 4.76 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.75 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 8.2 Hz), 4.73 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.67 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.67 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.67 (d, 1H, H-A1 β or H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 3.29-4.52 (m); IR (solid): 3434, 3612, 2878, 1596, 1459, 1040, 897, 773, 620 cm⁻¹; LRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₄H₄₂O₂₁ [M+H]⁺ m/z = 667.23, found: 667.26.



6-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-(3-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl-D-glucitol (2-2)

To a stirred solution of 6-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-(3-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-

glucopyranosyl- α - and - β -D-glucopyranose (**2-1**) (6.60 mg, 9.90 µmol, 1.00 eq.) in water (1.00 mL) was added a solution of sodiumborohydride (10.0 mg) in water (1.00 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1.5 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with water to give 6-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-*O*-(3-*O*- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl-D-glucitol (**2-2**) (5.80 mg, 8.67 µmol, 88%).

 $[\alpha]_{D}^{28}$ -16.5 ° (*c* 0.205, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 70 °C): δ 4.72 (d, 1H, H-A1 or H-B1 or H-C1, $J_{1,2} =$ 7.7 Hz), 4.67 (d, 1H, H-A1 or H-B1 or H-C1, $J_{1,2} =$ 8.2 Hz), 4.49 (d, 1H, H-A1 or H-B1 or H-C1, $J_{1,2} =$ 8.2 Hz), 3.30-4.16 (m, 26H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O, 24.3 °C): δ (102.9x2, 102.8 (anomeric)), 84.2, 78.4, 76.0, 75.9, 75.6x2, 75.3, 73.5, 73.2x2, 72.7, 71.1, 69.7x2, 69.6x2, 68.3, 62.0, 60.8x3; IR (solid): 3590, 2889, 2084, 1667, 1596, 1444, 1026, 901, 701, 545 cm⁻¹; LRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₄H₄₄O₂₁ [M+H]⁺ *m/z* = 669.25, found: 669.28.



第3章

β(1,3)グルカン糖鎖の合成法の開発

3-1 はじめに

2章では、本研究室保有の4から6糖からなる分岐βグルカン関連オリゴ糖鎖中より、デクチン 1結合リガンドの探索を行った。しかしながら、目的とするリガンドの発見には至らなかった。序 論において述べたように、天然のβ(1,3)グルカンの加水分解物の結果では、β(1,3)1 0糖の糖鎖長以上がデクチン1との結合に必要であることが示唆されている。これらの結果を受け て、デクチン1との結合のためには前章よりも長い糖鎖長の糖鎖が必要であると考え、標的分子の 検討を行うこととした。

3-2 標的分子の設定

天然 β グルカン多糖がリガンドとしてデクチン1に結合するならば、結合に必要な糖鎖の大きさ はデクチン1よりも小さいはずである。そこで、合成標的糖鎖を設計するにあたり、デクチン1の 糖結合ユニットの分子サイズと β (1,3)オリゴ糖の分子サイズを比較することとした。膜タン パク質であるデクチン1の構造は、X線構造解析 (Protein Data Bank: 2CL8)の結果をもとにした。 また、 β (1、3)グルカンオリゴ糖の構造は、分子力場計算 (MacroModel Ver. 9.8力場 OPLS-2005) 用いて算出した安定立体配座をもとにした。デクチン1の最大幅は、約5.9 nm であった (Figure 3-1)。 一方、 β グルカンは、約6グルコースユニットで一巻きの緩やかならせん構造を示した。この結果 は、天然 β (1,3)グルカンを用いた X線構造解析による報告と良い一致を表している¹⁾。長さ の単純比較では、約16グルコースユニット結合した直鎖 β グルカンが、デクチン1と同等以上の 長さを有することが明らかになった。そこで、本研究は、まず16糖以下の β (1,3)グルカン を合成標的分子とした。



Figure 3-1

3-3 βグルカン直鎖16糖の合成

このような大きな糖鎖の合成戦略としては、直線的および収束的合成法が考えられる。序論で述 べたようにどちらの手法においても問題点を含んでいる。そこで、本研究では、それぞれの合成戦 略に基づく合成法を検討することにした。

3-4 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の直線的合成法の開発

3-4-1 直線的合成戦略に基づく合成計画

標的糖鎖は、Vetvickal ら²⁾の報告を参考にして、3位に化学選択的に脱保護可能な保護基を有 する単糖糖供与体を用いて、グリコシル化ー脱保護を繰り返すことによるβ(1,3)グルカン直 鎖オリゴ糖を合成する(Figure 3-2)。4、6位の保護基であるベンジリデンは、3位遊離水酸基 周辺の立体障害が比較的小さい保護基であるため、3位水酸基の糖受容体としての反応性の低下を 抑えるために有効である。また、2位のベンゾイル保護基は、隣接基効果を利用したβ選択的グリ コシル化に適している。本手法がどこまで大きな糖鎖を合成可能であるかを検証した。



3-4-2 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の直線的合成

単糖糖受容体 3-2 の合成を行った (Scheme 3-1)。3位水酸基に TBS 基を有するチオ糖 3-1³⁾ (1.0 当量)とオクタノール (2.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (1.0 g/mmol) 存在下混在させ脱水を行った。その後、-40 ℃にて ルヨードコハク酸イミド (以下 NIS、1.2 当量)、 トリフルオロメタンスルホン酸(以下 TfOH、0.30 当量)によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。-30 ℃において反応は速やかに進行し、後処理を行った。続いて、ピリジン溶媒中フッ化水素酸/ピリジンを加え70 ℃に加熱することで TBS 基を選択的に脱保護し、後処理、精製を行い、望む3位に水酸基を持つ単糖 3-2 を2段階収率 66%で得た。生成物のアノマー位の立体化学は、アノマー位の水素の結合定数が7.7 Hz であったことより、β体であると決定した⁴⁾。



2 糖 3-3 の合成を検討した (Scheme 3-2)。糖受容体 3-2(1.0 当量) と 3 位水酸基に TBS 基を有す るチオ糖 3-1(1.2 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混 在させ脱水を行った。その後、NIS(1.44 当量)、TfOH(0.30 当量)によりフェニルチオ基を活性化さ せグリコシル化反応を行った。-40 °Cにて反応を開始し、反応を完結させるため 0 °Cまで昇温した。 しかし、原料が消失する前に反応がほぼ停止したため、さらに TfOH(0.40 当量)を加えた。少しず つ反応は進行し、開始 14 時間後、TLC上で糖供与体 3-1 の消失を確認した。後処理、精製を行い、 収率 46%で望む β グリコシド 2 糖 3-3 を得た。 β 選択性は二つのアノマー位の水素の結合定数が 7.2 Hz であることより決定した (Table 3-2:還元末端糖を A、非還元末端糖を B とおく)。



3位に対するグリコシル化反応では、一級アルコールに対するグリコシル化反応よりも収率が低下した。そこで、次に、糖供与体の3位の保護基を変えてグルコシドの3位に対するグリコシル化反応の検討を行った。

糖供与体の3位の保護基として、化学選択的に脱保護できる2-ナフチルメチル基(以下 NAP)と
レブリノイル基(以下Lev)、クロロアセチル基(以下CAc)、アリルオキシカルボニル基(以下AOC) を用いてグリコシル化反応を行った(Scheme 3-3)。反応条件は温度、反応時間以外は先の2糖合 成と同じ条件にて行った。糖受容体3-2(1.0当量)とチオ糖を(3-4(X=NAP)、3-5(X=Lev)、3-6(X=CAc)、 3-7(X=AOC))(1.2 当量)をジクロロメタン溶媒中(20 ml/mmol)、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-40 °CにてNIS(1.44 当量)、TfOH(0.70 当量)によ りフェニルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。昇温して反応後、いずれも糖供与体の 消失を確認した。後処理、精製を行い、2糖(3-8(X=NAP)、3-9(X=Lev)、3-10(X=CAc)、3-11(X=AOC)) を β 選択的に得た(Table 3-3: 括弧内は X=TBS 体 3-1)。生成物の立体化学は、アノマー位の水素の 結合定数より確認した(Table 3-4)。結果を以下に示す。AOC 体は反応性ならびに収率も低く、高極 性の分解物が主に生成した。この収率の低下は、反応にNIS を用いているため、AOC 基がヨウ素化 されて分解した可能性が考えた。NAP 基を持つ糖供与体の活性化に対する反応性は、残りのエステ ル型糖供与体と比較して高かった。これは、NAP 基の電子供与性の影響であると考えた。しかしな がら、収率そのものは、他の保護体と比較して変わらなかった。



Scheme 3-3

					δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)	
donor	temp. (°C)	time (h)	yield (%)	compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})
3-4 3-5 3-6 3-7	0 0 -10	5 14 14 21	41 47 43 10	3-8 3-9 3-10	4.53 (7.2) 4.53 (7.7) 4.54 (7.7)	4.88 (6.8) 4.93 (7.2) 4.95 (6.8)
(3-1)	(0)	(14)	(46)	3-11	4.54 (7.7)	4.95 (7.7)

次に、収率の低かったAOC体**3-11**を除く、2糖の3位の脱保護を検討した(Scheme 3-4, Table 3-5)。 • TBS 基の脱保護はピリジン溶媒中、フッ化水素酸/ピリジンを加え70℃に加熱することで行っ た。その結果、脱保護体 3-12 が、収率 67%で得られた。その際、わずかに、フッ化水素酸に よりベンジリデンが外れたものと思われる化合物の生成が見られた。

- NAP 基の脱保護は0 ℃でジクロロメタン溶媒中、DDQ と MeOH を加え、反応温度を室温まで昇温 することによって行った。その結果、脱保護体 3-12 の収率は、9%であった。TLC を用いる分 析では、目的物よりも高極性化合物の生成が確認された。これは、反応後に DDQ が還元されて 得られたヒドロキノンが酸触媒と働いたベンジリデンの加水分解反応や DDQ そのものによるベ ンジリデン基の酸化反応によるものと考えている。
- ・ Lev 基の脱保護は THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えて行った。脱保護反応は室温で速やか に進行し、脱保護体 3-12 を 90%で得た。
- CAc 基の脱保護は DMF 溶媒中、チオウレア、ルチジンを加え 70 ℃で2時間加熱することで行った。その結果、脱保護体 3-12 を 89%で得た。この結果より、比較的穏やかな条件かつ、速やかに脱保護の行える Lev 基を3位の保護基として採用することにした。



Scheme 3-4

compound	reagent	temp. (°C)	time	yield (%)
3-3 (TBS)	HF · Py.	70	2 h	67
3-8 (Nap)	DDQ, MeOH	r.t.	1 day	9
3-9 (Lev)	H ₂ NNH ₂ , AcOH	r.t.	15 min	90
3-10 (CAc)	H ₂ NCSNH ₂ , 2,6-lutidine	70	2 h	89

Table 3-5

直鎖3糖の合成を検討した(Scheme 3-5)。2糖受容体 3-12(1.0 当量)と3位に Lev 基を有する チオ糖 3-5(1.5 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(2.0 g/mmol)存在下混在 させ脱水を行った。その後、-40 ℃にてNIS(1.8 当量)、TfOH(0.30 当量)によりフェニルチオ基を 活性化させグリコシル化反応を行った。-20 ℃に昇温したところ、2糖合成の時とは異なり、非常 に速やかに反応が進行した。反応開始15分後、TLC上で糖受容体 3-12 の消失を確認した。後処理 後、シリカゲル精製を用いて高極性成分を除いた。一般的に、長鎖のアルキル基を有する糖受容体 は、その反応性が低いことが経験的に知られている。また、単純な脂肪鎖の一級アルコールに対す るグリコリル化反応は低収率に留まることが多い。その理由は現在のところ明らかされていないが、 筆者は、分子間での(糖)受容体同士の脂肪鎖による相互作用が原因であると考えている。続いて、 THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。その結果、目的物とする3糖 3-13 が、2段階収率74%で得られた。

生成したアノマー位の立体化学を決定する目的で、3糖の NMR 解析を行った結果(Table 3-6: 還元末端糖から A、B、C とおく)、新しく結合した C の糖の1位と2位の水素の結合定数は一般的 なβ結合の値(7~12 Hz)であるが、間の糖である B の1位と2位のプロトンの結合定数が比較的小 さくなっていることが明らかとなった(4.3 Hz)。また、B の糖のピラン部の水素の結合定数を調べ た結果、2位と3位の結合定数も 3.9 Hz と小さい値であった(Table 3-7)。これは、1から3位 に立体的嵩高い糖および、ベンゾイル基が結合したため、ピラン環がねじれ舟形配置をとるために、 1位と2位のプロトンの結合定数が低下したためと考えている(Figure 3-3)*。ここでは、結合定数 によるアノマー位の構造決定は暫定的なものとし、最終的には脱保護後に決定することとした。



	δ (ppm) (J, H	Hz)		<i>J</i> (Hz)				
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	compound	B1,B2	B2,B3	B3,B4	B4,B5
3-13	4.45 (7.7)	4.94 (4.3)	5.11 (7.2)	3-13	4.3	3.9	8.2	9.2

Table 3-6

Table 3-7



*) Vetvickal らは、4、6位にベンジリデン保護された β (1,3) 結合糖鎖において、糖に挟ま れた内部の糖の1位と2位のプロトンの結合定数が、末端糖と比べて低下することを報告している ¹⁾。また、Ensley らは、4、6位にベンジリデン保護された β (1,3) 結合6糖のX線構造解析 に成功し、いくつかの内部糖ユニットがねじれ舟形配置をとることを確認している⁵⁾。彼らはベン ジリデン保護基のプロトン (アセタールのプロトン)と隣接する糖のベンジリデン保護基の芳香環 が非常に接近していることを報告している (Figure 3-3、約3Å)。 直鎖4糖の合成を検討した(Scheme 3-6)。3糖受容体 3-13(1.0 当量)と3位にLev 基を有するチ オ糖 3-5(2.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在さ せ脱水を行った。その後、-40 ℃にて NIS(2.4 当量)、TfOH(0.30 当量)によりフェニルチオ基を活 性化させグリコシル化反応を行った。反応を完結させるため-20 ℃まで昇温した。1 時間後、TLC 上で糖受容体 3-13 の消失を確認し、後処理を行った。粗生成物の TLC 分析によると、糖受容体 3-13 由来と思われる副生成物の生成が確認できたので、シリカゲルを用いて除去した。非常に微量であ るため、単離構造決定までは至らなかった。2章でβ(1,6)2糖とベンジルアルコールとのグ リコシル化反応において、2位のベンゾイル基が3位に転位した化合物が見られていたため、今回 の反応においても転位が起こった化合物が得られた可能性がある。続いて、THF 溶媒中、ヒドラジ ン/酢酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。脱保護反応は、室温下速やかに進行し、4糖 3-14 を 2段階収率 62%で得た。アノマー位の水素の結合定数により構造決定を試みたが、スペクトルの分 離が十分でないため、3 つのアノマー位しか結合定数を明らかにすることが出来なかった(Table 3-8:還元末端糖からA、B、C、Dとおく。BとC(内部の糖)は順不同)。また、その際、内部と思 われる糖のアノマー位の結合定数は、3糖と同様に小さくなっていることが明らかとなった。アノ マー位の構造決定は、脱保護後行うこととした。



Scheme 3	-6
----------	----

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)						
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	H-D1 (J _{1,2})			
3-14	4.46 (8.2)	ND	4.97 (4.8)	5.06 (7.2)			

ND: not determined

Table 3-8

次に、5糖の合成を行った(Scheme 3-7)。4糖受容体 3-14(1.0 当量)と3位に Lev 基を有するチ オ糖 3-5(2.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在さ せ脱水を行った。その後、-40 ℃にて NIS(2.4 当量)、TfOH(0.30 当量)によりフェニルチオ基を活 性化させグリコシル化反応を行った。反応を完結させるため-10 ℃まで昇温した。1 時間後、TLC 上で糖受容体 3-14 の消失を確認し、後処理を行った。このとき、糖受容体 3-14 の2 位のベンゾイ ル基が3 位に転位したと思われる化合物が微量見られ、シリカゲル精製にて分離した。続いて、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。脱保護反応は、室温下速やかに進行 し、5 糖 3-15 を 2 段階収率 61%で得た。アノマー位の水素の結合定数により構造決定を試みたが、 スペクトルの分離が十分でないため、3 つのアノマー位しか結合定数を明らかにすることが出来な かった。また、その際、内部と思われる糖のアノマー位の結合定数は、3 糖と同様に小さくなって いることが明らかとなった(Table 3-9:還元末端糖から A、B、C、D、E とおく。B と C、D (内部の 糖) は順不同)。アノマー位の構造決定は、脱保護後行うこととした。



Table 3-9

次に、6糖の合成を検討した(Scheme 3-8)。5糖受容体 3-15(1.0 当量)と3位に Lev 基を有する チオ糖 3-5(2.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在 させ脱水を行った。その後、-40 ℃にて NIS(2.4 当量)、TfOH(0.30 当量)によりフェニルチオ基を 活性化させグリコシル化反応を行った。反応を完結させるため0 ℃まで昇温した。2 時間後、TLC 上で糖受容体 3-15 の消失を確認し、後処理を行った。このとき、糖受容体 3-15 の2位のベンゾイ ル基が3位に転位したと思われる副生成物が見られ、シリカゲル精製にて分離を試みたが、主生成 物と極性が非常に近く分離困難だった。脱保護後に生成を試みることとした。



3-4-3 まとめ

単糖糖供与体を用いるβ(1,3)グルカン糖鎖の合成を検討した。糖受容体の大きさが大きく なるほど収率は低下するものの、適切な保護基を有する単糖糖供与体を用いた結果、十分な転嫁率 でグリコシル化反応が進行することを明らかにした。しかしながら、6糖合成では、5糖糖受容体 由来の副生成物と6糖生成物との分離精製が困難となってしまった。これらの結果より、直線的合 成戦略に基づく糖鎖合成は断念し、収束的合成法の開発を検討することとした。

3-5 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の収束的合成法の開発

3-5-1 収束的合成戦略に基づく合成計画

16糖メチルグリコシド体 3-17を標的とし、8糖糖供与体 3-18、および、3位に遊離水酸基を 有する8糖糖受容体 3-19 のグリコシル化反応、続く脱保護反応を行うことで合成する(Figure 3-4)。8糖 3-18、3-19 は4糖供与体 3-20 と3位に遊離水酸基を有する4糖受容体 3-21 とのグリ コシル化反応、続く官能基変換で合成できると考えた。同様に、4糖 3-20、3-21 は2糖供与体 3-22 と2糖受容体 3-23 から、2糖 3-22、3-23 は単糖供与体 3-24 と単糖受容体 3-25 からそれぞれ得ら れると考えた。比較的大きなユニットの結合による糖鎖合成では、ゲルろ過カラムを用いることに より比較的容易に生成物と原料との分離が可能であると考えた。しかしながら、大きな糖鎖ブロッ クを二級水酸基に対するグリコシル化によって伸長していく本手法には、糖受容体および糖供与体 の反応性の低下による問題が予想される。そこで、より3位水酸基の反応性の高い糖受容体の設計 を行なうこととした。



位置選択的グリコシル化反応を利用するβグルカン合成用糖鎖受容体の設計

複数の水酸基を有する基質 3-26 において、目的の水酸基にのみ糖鎖を有する生成物 3-27 を導入 することは、糖鎖合成における重要なプロセスである (Figure 3-5)。特に、6位の一級水酸基を除 く3つの2級水酸基の区別することは重要なことである。そのため、目的としない水酸基を閉塞す るために保護基を導入した基質 3-30 が用いられる。しかしながら、保護基の導入は、立体的およ び電子的の効果により周りの遊離水酸基の反応性にも大きく影響し、多くの場合は、目的とする水 酸基自身の反応性も低下させてしまう。一方、化学結合により水酸基を閉塞するのではなく、水酸 基の周りの立体的および電子的環境により水酸基の反応性を低下させた基質 3-29 を設計すること ができれば、保護基の導入を最低限に抑えることにより、目的とする水酸基の反応性の低下を最低 限に抑えることができる。すなわち、位置選択的グリコシル化反応により β(1、3)結合を形成す る糖受容体を設計することにより、効率的に β グルカンオリゴ糖が合成できると考えた。



Figure 3-5

糖受容体の設計

β(1、3)グルカン合成用の複数の水酸基を有する糖受容体の設計を行った(Figure 3-6)。 グルコースそのものの水酸基の反応性は、その立体的に混み具合から、6位>2位また3位>4位で あると考えられる。そこで、一番反応性の高い一級水酸基である6位水酸基は、保護(ベンジル保 護およびベンジリデン保護)することが適当であると考えた。2位水酸基については、2糖以上の 糖受容体(3-19、3-21、3-23)では、2位水酸基の隣にあたる1位(アノマー位)のグリコシド結 合を介して大きな糖鎖ユニットが結合しているため、その影響を受け糖受容体としての2位水酸基の反応性が低下していると考えられる。そのことを考慮し、糖受容体の候補として、2,3,4位 トリオール、2、3ジオールと3、4ジオールの3種を挙げた。

2, 3, 4位トリオール型糖受容体

2,3,4位トリオール体では、3位水酸基への位置選択的なグリコシル化が可能であると考えられる。しかしながら、トリオールは非常に高極性あるために、低温反応(-78~0 ℃)における化合物の溶解性に問題が生じる可能性が高い。また、分子の取り扱いや乾燥作業に問題が生じる可能性がある。



Figure 3-6

3,4位ジオール型糖受容体

3,4位ジオール型糖受容体では、2位の保護基の選択が重要である。2位水酸基はのちに糖供 与体に変換することを考え、β選択的グリコシル化反応が可能なベンゾイル基とした。また、6位 水酸基をベンジル基とした(Figure 3-7 右)。2位のアシル基による、3位遊離水酸基の反応性の低 下(電子的要因)や、先に見られた3位への転位の問題が考えられるが、3,4ジオール糖受容体 は嵩高いグリコシド結合を有する1位(アノマー位)から反応点が離れており(4位が空いている)、 大きな糖鎖のグリコシル化においても反応性低下の抑制が期待できる。



2, 3位ジオール型糖受容体

2,3位ジオール型糖受容体では、4位の水酸基の保護基が重要となる。ここでは、4位の水酸

基の保護基は、6位の保護基組み合わせた4、6ベンジリデンアセタールを用いることとした。 (Figure 3-8 右)。この糖受容体は、3位の両隣に電子求引性かつ転位する可能性があるアシル基を 持たないため、反応性の向上かつ副生成物の低減が期待できる。1位(アノマー位)のグリコシド 結合による立体障害を利用して2位の反応性を下げるため、2糖以上で反応の検討を行う必要があ る。



3,4位水酸基遊離な糖受容体、および、2,3位水酸基遊離な糖受容体それぞれについて、グ リコシル化反応における位置選択性の検討を行う。

3-5-2 糖受容体の検討

3-5-2-1 3,4位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化

単糖供与体 3-32、および3,4ジオール単糖受容体 3-33 を用いて位置選択的グリコシル化反応 の検討を行った(Scheme 3-9)。フェニルチオ糖3,4ジオール体 3-33(1.0 当量)と2,3位水酸基 に Lev 基を有するイミデート糖 3-32(1.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmo1)存在下混在させ脱水を行った。その後、-10 ℃で、トリメチルシリルトリフラート (TMSOTf、0.1 当量)を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、 速やかにグリコシル化反応は進行し、TLC上で 3-32 の消失を確認すると同時に三種類の生成物が見 られた。後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、4位結合2糖3-35 が 68%、3,4位結合3 糖 3-36 が 24% で得られ、目的とする3位結合2糖3-34 は痕跡量しか得られなかった。この結果か ら、反応性は非常に良かったものの、4位選択的に反応が進行し、さらに残りの3位遊離水酸基に も反応が進行したものと考えられる。4位選択性が発現した理由としては、4位水酸基は立体的に 込み合っているが、糖受容体 3-33 の2位のベンゾイル基が3位遊離水酸基の反応性の低下(電子 的要因)の効果がそれよりも大きかったためと考えている。この際の 3-35 の同定はアセチル化を 行い ¹H-NMR、¹H-¹H COSY で位置選択性の決定(アセチル化前後で3位のプロトンが 3.86 ppm から 5.34 ppm へと大幅に低磁場シフトした。β体($J_{1,2}$ = 7.7 Hz))を、3-36 の同定は ¹H-NMR を用いて 行った(β体($J_{1,2}$ = 7.7 Hz x 2))。



Scheme 3-9

この結果より、用いた3,4位水酸基遊離な糖受容体では3位選択的グリコシル化反応を行うこ とが困難であることが分かった。2位の保護基を電子供与性の保護基にして3位水酸基の反応性を 上げることや、6位の保護基をさらに嵩高くして4位へのグリコシル化反応を阻害するなどの検討 が必要である。

続いて、2,3位水酸基遊離な糖受容体を用いて検討を行った。

3-5-2-2 2, 3位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化反応

2,3位水酸基遊離な糖受容体の3位選択的グリコシル化反応では、1位(アノマー位)のグリ コシド結合による立体障害を利用して2位の反応性を下げて3位選択性を上げることを目的とし ているため、2糖糖受容体を用いて検討を行った。この際、非還元末端の2,3位に遊離水酸基を 有する2糖チオ糖3-38と2,3位にLev基を有する2糖ブロモ糖3-37を用いた(Scheme 3-10)。 ブロモ糖は反応性が高く、銀塩を用いることで高い基質選択性を持って活性化できること、チオ糖 から1段階で容易に調製することができることから用いることとした。2,3位の保護基は、他の エステル基と選択的に脱保護可能な、Lev 基を用いることとした。2,3ジオール糖受容体 3-38(1.0 当量)とブロモ糖糖供与体 3-37(1.2 当量)をジクロロメタン、トルエン混合溶媒中、モレキュラー シーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-10 ℃で、銀トリフラート(以下 AgOTf、1.44 当量)を用いてブロモ基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速やか にグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、目的とする3位結合 4糖3-39が収率76%、単一異性体で得られた。2位結合4糖や2,3結合6糖の生成は認められ なかった。続いて、4糖3-39をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAPを加えることで2位に アセチル基の導入を行った。速やかに反応は進行し、4 糖 3-40 を収率 87%で得た。この際の 3-39 と 3-40 の同定は¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行った(Table 3-10:還元末端糖から A、B、C、D と おく。3-40の糖ユニットBとC(内部の糖)は順不同)。3-39の糖ユニットBの2位の化学シフト

に注目すると、化学シフトが 3.39 ppm であるのに対し、アセチル化後の **3-40** は全ての 2 位の化学 シフトが低磁場に存在することが確認できた(4.81~5.21 ppm)。また、¹H-¹H COSY より、**3-39** は遊 離水酸基のプロトンと 2 位のプロトンの相関が見られた。これらより、グリコシル化反応は 3 位選 択的に進行したものと決定した。一方、新たに結合が生成する **3-39** の糖ユニット C のアノマー位 の結合定数は、小さくなっていることが明らかとなった ($J_{1,2} = 4.8$ Hz)。アノマー位の正確な構 造決定は、脱保護後行うこととした。



Scheme 3-10

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)									
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-B1 (J _{1,2})	H-B2	H-C1 (J _{1,2})	H-C2	H-D1 (J _{1,2})	H-D2		
3-39 3-40	4.87 (7.7) 4.75 (9.7)	5.21 4.89	4.37 (7.7) 4.91 (6.8)	3.39 5.21	5.01 (4.8) 4.64 (4.8)	5.10 4.81	4.87 (7.7) 4.70 (7.7)	5.06 4.99		

Table 3-10

この結果より、2,3位水酸基遊離な糖受容体を用いた場合、3位選択的にグリコシル化反応が 進行し、満足のいく収率で目的の糖鎖を与えることが分かった。

これらより、 β (1,3) 16糖合成において、2,3位水酸基遊離な糖受容体を用いた収束的 合成法の開発を行うこととした。

3-5-3 β(1,3)グルカン直鎖オリゴ糖の収束的合成

合成戦略

2、3ジオール型糖受容体を利用する合成戦略を以下に示す(Figure 3-9)。標的化合物にαメチ

ルグリコシドを有する16糖3-17を設定した。16糖は、8糖糖供与体3-41と8糖糖受容体3-42 の位置選択的グリコシル化反応によって合成する。まず、8糖糖供与体3-41は4糖ブロモ糖3-43 と4糖チオ糖3-40との位置及び化学選択的グリコシル化によって合成する。4糖のブロモ糖3-43 および4糖チオ糖3-40は、2糖ブロモ糖3-37と2糖チオ糖3-46との位置及び化学選択的グリコ シル化反応によって導いた4糖チオ糖を用いて合成する。2糖ブロモ糖3-37と2糖チオ糖3-46は、 ブロモ糖とチオ糖の位置及び化学選択的グリコシル化によって合成する。アノマー位のスルフィニ ル基は、2位の水酸基の反応性を低下することが知られている^{8a)}。一方、8糖糖受容体は、4糖供 与体と4糖メチルグリコシドの位置および立体選択的グリコシル化によってそれぞれ合成する。4 糖メチルグリコシドは、2糖糖供与体と2糖メチルグリコシドとの位置及び化学選択的グリコシル 化によって合成する。2糖メチルグリコシドは、3位遊離のメチルグリコシドを糖受容体とするグ リコシル化によって合成する。



合成

2糖ブロモ糖 3-37 と2,3ジオール2糖 3-38 の合成について述べる。

まず、共通中間体である2,3位にLev 基を有するチオ糖 3-48 を単糖ブロモ糖 3-49 と2,3ジ オール単糖チオ糖 3-52 をグリコシル化することで合成する。単糖ブロモ糖 3-49 の合成について述 べる (Scheme 3-11)。2,3位に遊離水酸基を有するチオ糖 3-52⁹⁾をジクロロメタン溶媒中レブリ ン酸 (2.4 当量)と縮合剤 EDCI (2.4 当量)、触媒量の DMAP を加えて、2,3位にLev 基の導入を行い、 収率 94%でLev 体 3-48 を得た。続いて、チオ糖 3-48 をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシー ブス 4A (0.50 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、0℃で、一臭化ヨウ素(1.0 M CH₂Cl₂ 溶液)を加えることで、ブロモ基の導入を行った。得られたブロモ糖 3-49 は不安定であったため、 後処理後、簡易的に精製を行い、直ちにこのブロモ糖をグリコシル化反応に用いることとした。





共通中間体である2糖3-46の合成を行った。2糖チオ糖3-46は、3位選択的グリコシル化が報 告されている2,3位遊離な単糖チオ糖糖受容体を用いて合成する⁷。3-46の合成を示す(Scheme 3-12)。2,3位に遊離水酸基を持つチオ糖 3-52⁸⁾(1.05 当量)と2,3位水酸基にLev 基を有する ブロモ糖 3-49(1.0 当量)をジクロロメタン、トルエン混合溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(1.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-10 ℃で、AgOTf (1.2 当量)を用いてブロモ基を活 性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、 ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2糖 3-53 が収率 41%、単一異性体で得られた。収率が中程度 となった理由として、糖受容体3-52による非常に高い結晶性のために反応温度を低く設定できず、 生成した当量のTfOHによってベンジリデンアセタールが外れたためであると考えられる。続いて、 2糖 3-53(1.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、ベンゾイルクロライド(3.0 当量)と N, N, N', N'-テ トラメチルエチレンジアミン(6.0当量)、触媒量のDMAP(0.1当量)を加えることで2位にベンゾ イル基の導入を行った。少しずつ反応は進行し、開始12時間後、TLC上で3-53の消失を確認した。 後処理、精製を行い、収率81%で2糖3-46を得た。この際の3-53と3-46の同定は¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行った(Table 3-11:還元末端糖を A、非還元末端糖を B とおく)。還元末端糖の2, 3位の化学シフトに注目すると、ベンゾイル化前後において3位の化学シフトにはあまり変化が見 られないが、2位の化学シフトが 1.71 ppm 低磁場シフトした。また、¹H-¹H COSY より、**3-53** は遊 離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られた。これらより、グリコシル化反応は3位選 択的に進行したものと決定した。一方、生成物のアノマー位の立体化学は、アノマー位のプロトン の結合定数にて、β体であると決定した。



Scheme 3-12

	δ (ppm) (<i>J</i> , F	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)							
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-A3	H-B1 (J _{1,2})					
3-53 3-46	4.67 (9.7) 4.85 (10.1)	3.59 5.30	3.79 4.18	4.84 (7.7) 4.70 (7.7)					

Tab	1e	3-	11
ruv	т U		**

続いて、2,3位にLev 基を有するチオ糖 3-46 から2糖ブロモ糖 3-37 と2,3ジオール2糖 3-38 への変換を行った(Scheme 3-13)。チオ糖 3-46 をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A 存在下混在させ脱水を行った。その後、0℃で、一臭化ヨウ素(1.0 M CH₂Cl₂溶液)を加えるこ とで、ブロモ基の導入を行った。得られたブロモ糖 3-37 は不安定であり、通常のカラムクロマト グラフィー精製により一部分解が見られた。そこで、後処理後、簡易的に精製を行い、直ちにこの ブロモ糖をグリコシル化反応に用いることとした。一方、非還元末端の2,3位にLev 基を有する 3-46 に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えてLev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進 行し、後処理、再結晶を行うことで、目的とするジオール 3-38 が収率 87%で得られた。



Scheme 3-13

3-5-3-1 2, 3位ジオール型糖受容体の位置選択的グリコシル化反応

4 糖チオ糖の合成は先に述べた方法によって行った(Scheme 3-14)。



Scheme 3-14

3-5-3-2 8糖糖供与体の合成

先の検討から得られた2,3位にLev 基を有する4糖チオ糖3-40から4糖ブロモ糖3-43と2, 3ジオール4糖3-44への変換を行った(Scheme 3-15)。チオ糖3-40をジクロロメタン溶媒中、モ レキュラーシーブス4A存在下混在させ脱水を行った。その後、0℃で、一臭化ヨウ素(1.0 M CH₂Cl₂ 溶液)を加えることで、ブロモ基の導入を行った。得られたブロモ糖3-43は不安定であったため、 後処理後、簡易的に精製を行い、直ちにこのブロモ糖をグリコシル化反応に用いることとした。一 方、非還元末端の2,3位にLev 基を有する3-40に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、後処理、カラム精製を行うことで、目的とする ジオール3-44 が定量的に得られた。



Scheme 3-15

8 糖糖供与体 **3-41** の合成を行った (Scheme 3-16)。非還元末端の2, 3位に遊離水酸基を持つ 4 糖チオ糖 **3-44**(1.0 当量)と2, 3位に Lev 基を有する4 糖ブロモ糖 **3-43**(1.17 当量)をジクロロ メタン、トルエン混合溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmo1)存在下混在させ脱水を行った。 その後、-10 ℃で、 AgOTf (1.44 当量)を用いてブロモ基を活性化させ、グリコシル化反応を行っ た。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、 8糖3-54が収率42%、単一異性体で得られた。収率が中程度となった理由として、不安定な4糖 ブロモ糖の取り扱いが難しいためであると考えられる。TLC上において、ブロモ糖が損壊したとみ られる生成物が高極性側に見られたが、複雑化していたため同定には至らなかった。続いて、8糖 3-54をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAPを加えることで2位にアセチル基の導入を行っ た。速やかに反応は進行し、8糖3-41を収率92%で得た。この際の3-54と3-41の同定は¹H-NMR、 ¹H-¹H COSYを用いて行った。3-54と3-41の全ての2位の化学シフトを同定することにより構造決 定を試みたが、スペクトルの分離が十分でないため、一部の化学シフトは明らかにすることが出来 なかった。しかし、¹H-¹H COSY より、3-54は遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見ら れたため、グリコシル化反応は3位選択的に進行したものと考えられる。



3-5-3-3 8糖糖受容体の合成

2糖メチルグリコシド体 3-47 の合成を示す (Scheme 3-17)。3位に遊離水酸基を持つ単糖メチル グリコシド体 3-51⁹⁾ (1.0 当量) と2,3 位水酸基に Lev 基を有するチオ糖 3-48 (1.1 当量) をジクロ ロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (0.5 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、 -30 ℃にて NIS (1.32 当量)、TfOH (0.10 当量) によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル化反応 を行った。その結果、反応は速やかに進行し、後処理を行った。続いて、THF/MeOH 混合溶媒中、触 媒量のナトリウムメトキサイドを加えて Lev 基の脱保護を行った。1 時間後、TLC 上で反応の収束 を確認し、後処理、精製を行い、2糖 3-47 を 2 段階収率 66%で得た。この際の生成物のアノマー 位の立体化学は、アノマー位のプロトンの結合定数にて決定した (Table 3-12:還元末端糖を A、非 還元末端糖を B とおく。A は α (3.9 Hz)、B は β (7.7 Hz))。



Table 3-12

4 糖メチルグリコシド糖受容体 3-45 の合成を行った (Scheme 3-18)。非還元末端の2,3位に遊 離水酸基を持つ2糖メチルグリコシド体 3-47(1.2 当量)と2,3位に Lev 基を有する2糖チオ糖 **3-46**(1.0当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0g/mmol)存在下混在させ脱 水を行った。その後、-30 ℃にて NIS (1.2 当量)、Tf OH (0.3 当量) によりフェニルチオ基を活性化さ せグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過 カラム(GPC)を含む精製後、4糖3-55が収率68%、単一異性体で得られた。続いて、4糖3-55を ピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量の DMAP を加えることで2位にアセチル基の導入を行った。速 やかに反応は進行し、4 糖 3-56 を収率 92%で得た。この際の 3-55 と 3-56 の同定は 'H-NMR、'H-'H COSY を用いて行った(Table 3-13: 還元末端糖から A、B、C、D とおく。3-56 の糖ユニット B と C (内部の糖)は順不同)。3-55の糖ユニットBの2位の化学シフトに注目すると、化学シフトが3.47 ppm であるのに対し、アセチル化後の3-56はAを除く全ての2位の化学シフトが低磁場に存在する ことが確認できた(4.88~5.29 ppm)。また、¹H-¹H COSY より、3-55 は遊離水酸基のプロトンと2位 のプロトンの相関が見られた。これらより、グリコシル化反応は3位選択的に進行したものと決定 した。一方、3-55の糖ユニットCのアノマー位の結合定数が 6.3 Hz であったことにより、グリコ シル化反応はβ選択的に進行したものと決定した。続いて、4糖**3-56**に対し、THF 溶媒中、ヒドラ ジン/酢酸を加えてLev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、後処理、カラム精製を行う ことで、目的とするジオール 3-45 が定量的に得られた。



Scheme 3-18

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)									
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-B1 (J _{1,2})	H-B2	H-C1 (J _{1,2})	H-C2	H-D1 (J _{1,2})	H-D2		
3-55 3-56	4.38 (ND) 4.39 (3.9)	3.45 2.93	4.52 (7.7) 5.00 (7.2)	3.47 5.29	5.07 (6.3) 4.96 (4.8)	5.28 4.88	4.78 (7.7) 4.70 (7.7)	5.03 5.00		

ND: not determined

Table 3-13

8糖糖受容体 3-42 の合成を行った (Scheme 3-19)。非還元末端の2,3位に遊離水酸基を持つ 4糖メチルグリコシド体 3-45(1.0 当量)と2,3位にLev 基を有する4糖チオ糖 3-40(1.1 当量)を ジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その 後、−30 ℃にて NIS(1.21 当量)、TfOH(0.5 当量)によりフェニルチオ基を活性化させグリコシル化 反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を 含む精製後、8 糖 3-57 が収率 81%、単一異性体で得られた。続いて、8 糖 3-57 をピリジン溶媒中、 無水酢酸と触媒量の DMAP を加えることで2位にアセチル基の導入を行った。速やかに反応は進行 し、8 糖 3-58 を定量的に得た。この際の 3-57 と 3-58 の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行っ た(Table 3-14: 還元末端糖から A、B、C…Hとおく。3-57の糖ユニットBとC、E、F、Gは順不同、 3-58の糖ユニットBとC、D、E、F、Gは順不同)。3-58の糖ユニットDの2位の化学シフトに注目 すると、化学シフトが 3.35 ppm であるのに対し、アセチル化後の 3-58 は A を除く全ての 2 位の化 学シフトが低磁場に存在することが確認できた(4.82~5.21 ppm)。また、¹H-¹H COSY より、3-57 は 遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られた。これらより、グリコシル化反応は3位 選択的に進行したものと決定した。一方、アノマー位の水素の結合定数により構造決定を試みたが、 スペクトルの分離が十分でないため、一部のアノマー位しか結合定数を明らかにすることが出来な かった。アノマー位の構造決定は、脱保護後行うこととした。続いて、8糖 3-58 に対し、THF 溶媒 中、ヒドラジン/酢酸を加えてLev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、後処理、カラム 精製を行うことで、目的とする8糖糖受容体 3-42 が収率 92%で得られた。



Scheme 3-19

	δ (ppm	δ (ppm)								
compound	H-A2	H-B2	H-C2	H-D2	H-E2	H-F2	H-G2	H-H2		
3-57 3-58	3.07 2.91	5.23 5.21	5.20 4.89	3.35 4.89	4.93 4.87	4.89 4.83	4.83 4.82	4.99 5.00		

Table 3-14

3-5-3-4 16糖の合成

16糖メチルグリコシド体 3-61 の合成を行った(Scheme 3-20)。非還元末端の2,3位に遊離 水酸基を持つ8糖メチルグリコシド体 3-42(1.0 当量)と2,3位に Lev 基を有する8糖チオ糖 3-41(1.2 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(4.0 g/mmo1)存在下混在させ脱 水を行った。その後、-35 ℃にてNIS(1.44 当量)、TfOH(0.5 当量)によりフェニルチオ基を活性化 させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ 過カラム(GPC)を含む精製後、16糖 3-59 が収率 69%、単一異性体で得ることに成功した。非常に 大きな8糖同士のカップリング反応においても、2,3ジオールの糖受容体を用いる手法で効率的 に合成することが可能であった。続いて、16糖 3-59をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAP を加えることで2位にアセチル基の導入を行った。速やかに反応は進行し、16糖 3-60を収率 91% で得た。この際の 3-59と 3-60の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて検討した。3-59と 3-60の全 ての2位の化学シフト、および、アノマー位の結合定数を同定することにより構造決定を試みたが、 スペクトルの分離が十分でないため、一部の化学シフト、および、結合定数は明らかにすることが 出来なかった。しかし、¹H-¹H COSY より、3-59 は遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が 見られたため、グリコシル化反応は3位選択的に進行したものと考えている。一方、アノマー位の 構造決定は、脱保護後行うこととした。続いて、16糖3-60に対し、THF溶媒中、ヒドラジン/酢 酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、後処理、カラム精製を行うことで、 目的とする16糖糖受容体3-61が収率94%で得られた。



3-5-4 まとめ

2,3位遊離な糖受容体に対する位置選択的なグリコシル化反応による収束的な糖鎖伸長を検討 した。ブロモ糖の不安定性やジオールを有する糖受容体の低溶解性によって収率は安定しないもの の、非常に大きな8糖同士のグリコシル化反応においても十分な反応性が得られた。また、糖受容 体や糖供与体と生成物との物性が大きく異なり、容易に分離可能であった。これらの結果より、2, 3位遊離な糖受容体を用いた収束的合成法は16糖合成に有用であった。

3-6 脱保護の検討

糖鎖の脱保護を検討した。本章で合成した糖鎖の脱保護は、水素添加反応やBirch 還元を用いる 脱ベンジリデン(脱ベンジル)と塩基を用いるエステルの加水分解の2工程で行うことができる。 脱保護の順番は、2通りある。1)脱ベンジリデン(脱ベンジル)一エステル加水分解また、2)エス テル加水分解一脱ベンジリデン(脱ベンジル)である。一般的に、後処理が不溶性の金属触媒のろ 過のみですむ水素添加反応は、最終工程として選択される場合が多い。しかし、本合成において、 エステル基を先に除去した化合物は、複数のベンジリデン基で保護されているため、結晶性が高く、 溶媒への溶解性が低いことが予想された。そこで、今回の脱保護では、先に水素添加反応や Birch 還元による脱ベンジリデン(脱ベンジル)を行った後に、エステルの加水分解を行うこととした。

最初に、水素添加反応によるベンジリデン基の除去を検討した。水素添加反応の装置として、 H-Cube[™](Figure 3-10)を用いた。H-Cube[™]は、流通系の反応装置であり、流通経路内に電気分解に より発生させた水素が作られるため安全であり、また、温度や圧力(~100bar)も自由に設定でき る。フロー系なので操作が非常に簡便で、反応を追いやすいなどの利点が挙げられる。流通経路に パラジウムをはじめとする様々な触媒を担持したカートリッジを取り付けて使用可能である。



H-Cube[™] Figure 3-10

まず、直線的合成法で得られた糖鎖の脱保護を行った。6糖 3-16の脱保護を検討した。Pd 触媒 は、10% Pd/C のカートリッジを用いた。酢酸エチル/メタノール混合溶媒(1/1)に化合物を希釈し た溶液を調整した。その溶液を用いて、流速1 ml/min、60 ℃、60 bar で反応を行った。得られた 溶液の溶媒を減圧下除去した後、1%酢酸を含むメタノール溶液とした。その溶液を用いて、流速1 ml/min、60 ℃、60 bar で反応を行った。TLC にて反応の収束を確認後、溶媒を飛ばし、トルエン 共沸を行って酢酸を除いた(Scheme 3-21)。

続いて、エステル加水分解を行った。メタノール溶媒中、ナトリウムメトキサイドを用いてアシル基の脱保護を行い、得られた化合物に対し逆相シリカゲルクロマトグラフィーを行うことにより、6糖の脱保護体が3段階収率29% (Scheme 3-8 のグリコシル化反応から)で得られた。グリコシド結合の立体化学をアノマー位の水素の結合定数を用いて行った(Table 3-15:還元末端糖からA、B、C、D、E、Fとおく。BとC、D、E、Fは順不同)。その結果、脱保護体では、1位と2位の水素の結合定数は7.2~8.2 Hzであり、6糖 3-62 は全てβ結合していることが明らかとなった。



さらに、これまでに得られた単糖から5糖までの直鎖糖の脱保護を行った(Scheme 3-22)。同様の操作にて、水素添加反応、ベンゾイル基の脱保護を行った。単糖から5糖までそれぞれ2段階収率 31%、42%、48%、61%、36%で脱保護体が得られた。Table 3-16 に単糖から5糖のそれぞれの1位と2位のプロトンのビシナルカップリング定数を載せた。全てβ結合していることを確認した(7.7~8.2 Hz)。



	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)								
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	H-D1 (J _{1,2})	H-E1 (J _{1,2})				
3-63 3-64 3-65 3-66 3-67	4.23 (7.7) 4.44 (7.7) 4.45 (8.2) 4.45 (7.7) 4.44 (7.7)	4.70 (8.2) 4.72 (8.2) 4.72 (7.7) 4.71 (7.7)	4.75 (8.2) 4.74 (8.2) 4.72 (8.2)	4.77 (8.2) 4.74 (8.2)	4.76 (7.7)				

Table 3-16

このようにして直線的合成法にて得られた単糖から6糖までの脱保護をH-Cube[™]で行うことに成 功した。続いて、同様に、収束的合成法で得られた糖鎖の脱保護も行うことにした。

まず、8糖メチルグリコシド体 3-42の脱保護をH-Cube[™]で検討した(Scheme 3-23)。しかしなが ら、先と同様の操作で行ったものの、脱保護が進行しないどころか、原料の回収さえ出来なかった。 さらに、20% Pd(OH)₂/Cを担持したカートリッジを用いるも、同様に得られなかった。これは、糖 の脱保護反応中に糖鎖が凝集あるいは結晶化し、カートリッジ内に吸着されてしまったものと考え られる。先の単糖から6糖までの糖鎖(3-62~67)はアノマー位に8炭素の脂肪鎖があるが、8糖 3-42はアノマー位に1炭素の脂肪鎖があり、脱保護反応中における物性の違いがあるものと考えら れる。



続いて、8糖および16糖の脱保護には、当研究室で開発された固相脱保護法を用いることとした⁷⁾。本手法は、ポリマー上に保護糖を固定化したまま脱保護する手法である。固相単体を精製用 タグとしても用いて脱保護するため、各種反応中間体や最終物の取り扱いが難しい場合にも、固相 の性質を利用して目的物を容易に取り出すことが可能である。

16糖メチルグリコシル体 3-61 と8糖メチルグリコシド体 3-42 の脱保護について述べる (Scheme 3-24)。

各糖鎖 3-61、3-42(1.0 当量)と THP プレリンカー (6.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレ

キュラーシーブス 4A (8.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、0 ℃にて 10-カンファ ースルホン酸(4.0 当量)を加えた。一時間後、TLC で各糖鎖の消失を確認した。ろ過、濃縮を行い、 シリカゲル精製を行って未反応の THP プレリンカーを除いた。続いて、得られた活性化エステルを CH₂Cl₂/DMF (1/1)混合溶媒中、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を添加し、アミノ基を有する固 相担体 Argo Pore (0.75 mmol/g)へと固定化した。反応停止後、反応溶液をろ別し、固相担体の洗 浄および、乾燥することにより、各糖鎖を担持した Argo Pore (**3-69、3-70**)を得た。この際、固相 上に担持されない化合物が残った。¹H-NMR によりこの化合物の解析を試みたが、非常に複雑で困難 であった。塩基性条件 (DIEA) に安定であったため、THP プレリンカーのニトロフェニルエステルは 脱離していると考えられる。このことから、ジオール糖鎖に対して分子内で巻き込んでいる可能性 がある (Figure 3-11)。



Byproduct ?

Figure 3-11

続いて、Birch 還元を行うことでベンジルエーテルとベンジリデンアセタール、エステルの脱保 護を同時に行った。まず、糖鎖を担持した Argo Pore (**3-69、3-70**)を膨潤させるため、室温下 THF 中で 15 分間撹拌した。その後、反応容器を-78 ℃へと冷却し、液体アンモニアの導入を行った。 混合溶媒は液体アンモニア/THF = 9/1 の反応容器とし、-78 ℃条件下リチウム(50 mg)を加えた。 溶液が濃青色を呈しラジカルの発生を確認後、-78 ℃のままで1.5時間、アンモニア還流条件下1 時間反応を行った。反応溶液を濾別し、洗浄、および、乾燥することにより脱保護体担持 Argo Pore をそれぞれ得た。得られた Argo Pore を 5%メタノール-20%TFA-CH₂Cl₂溶液に 15 分間作用させ切り 出しを行った。このとき、得られた化合物の水酸基に対して TFA とのエステルが副生したため、メ タノール溶媒下、ジメチルアミンを加えてTFAエステルの脱保護を行った。速やかに反応は進行し、 減圧下溶媒を飛ばし、逆相カラムクロマトグラフィーにて精製を行うことで無保護の16糖3-17、 および、8 糖 3-68 をそれぞれ5 段階収率26%(平均収率76%)、46%(平均収率86%)で得るこ とに成功した。この際、非常に興味深いことに、脱保護体は逆相カラムのマトリックスである、1 8炭素のアルキル鎖を有するシリカゲルに保持された (Bond Elut-C18、溶媒:蒸留水)。構造か ら非常に高極性であると推測できるが、TLC から8糖よりも16糖の方が若干低極性であった。こ れは糖鎖が長くなるほど、多糖としての性質(疎水性、不溶性)を持ち始めていると考えられる。 生成物のアノマー位の立体化学は、¹H-NMR によるアノマー位のプロトンの結合定数にて決定した (16糖 3-17 の還元末端はα (4.79 ppm、3.9 Hz)、その他β (4.70~4.76 ppm、7.2~8.2 Hz)。 8 糖 3-68 の還元末端はα (4.79 ppm、3.9 Hz)、その他β (4.70~4.77 ppm、6.8~8.2 Hz))。



Scheme 3-24

以上により、16糖の全合成を達成したので、デクチン1との結合試験を東京薬科大学薬学部免 疫学教室大野尚仁教授、安達禎之准教授の協力のもと行った。

3-7 競合阻害活性試験

得られた単糖から6糖(3-63、3-64、3-65、3-66、3-67、3-62)と8糖3-68、16糖3-17の、 SPGとデクチン1との結合に対する競合阻害試験を行った。また、比較として12糖メチルグリコ シド体3-72を合成し、併せて阻害試験を行った。測定結果をFigure 3-12、Figure 3-13に示す。 測定結果より、化学合成で得られた単糖から6糖においてSPGとデクチン1の結合に対する阻害作 用が見られないのみならず、8糖や12糖、16糖においても特異的な結合作用は見られなかった。 このことより、本測定条件におけるデクチン1に対する結合作用は、単分子の糖鎖では検出出来る ほど大きくないと考えられる。



3-8 まとめ

デクチン1との結合に必要な最小の糖鎖の大きさはデクチン1タンパク質自体よりも小さいと仮 定し、分子力場計算によってβ(1,3)直鎖16糖であると決定した。β(1,3)直鎖16糖 を合成する際、直線的および収束的合成法の検討を行った。直線的合成法では、還元末端糖から一 糖ずつ伸ばす方法にて合成を行ったが、6糖保護体合成にて分離困難な副生成物が現れた。この結 果より、直線的合成戦略に基づく糖鎖合成は断念し、収束的合成法の開発を検討した。収束的合成 法では、16糖を8糖のブロックに分けてカップリングする方法にて合成を行った。同様に8糖は 4糖、4糖は2糖、2糖は1糖から構築した。糖受容体や糖供与体が大きくなった場合には、それ ぞれのグリコシル化反応に対する反応性が低下することが知られているが、反応性の向上を期待し た2,3位遊離な糖受容体を設計し、位置選択的なグリコシル化反応を行うことで16糖の構築に 成功した。また、脱保護を行い、単糖から6糖、および、8糖、12糖、16糖のSPGのデクチン 1への結合に対する競合阻害試験を行った。結果より、いずれの糖鎖も、SPGとデクチン1の結合 を阻害する結果が得られなかった。本結果から、単分子の糖鎖では結合力が弱く、SPGを用いる競 合阻害試験において結合を検出出来るほど大きくないと考えられる。そこで、より強い結合のため には糖鎖微粒子などの多価効果を期待する複合糖鎖の開発が課題である。

3-9 基質の合成

1) 直線的合成法

単糖供与体 3-4 の合成について述べる(Scheme 3-25)。Wang らにより報告された、糖のワンポットプロテクション¹⁰⁾の方法を用いて合成を行った。まず始めに、テトラアセチルチオ糖 3-73(1.0 当量)をメタノール、THF 混合溶媒中、ナトリウムメトキサイドを用いてアセチル基の脱保護を行っ た。後処理後、ピリジン溶媒中、トリメチルシリルクロライド(4.8 当量)と触媒量の DMAP を加えて テトラトリメチルシリルチオ糖 3-74 を得た。続いて、3-74 とベンズアルデヒド(1.05 当量)をジク ロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 3A(0.725 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、 -86 ℃にてトリメチルシリルトリフラート(0.15 当量)を加えて、4、6位のベンジリデン保護を行 った。TLC にて 3-74 の消失を確認後、2-ナフトアルデヒド(1.2 当量)、トリエチルシラン(1.1 当量)、 トリメチルシリルトリフラート(0.075 当量)を加えて 3 位選択的に還元的ナフチルメチル化を行っ た。5 時間後、無水安息香酸(3.0 当量)、トリメチルシリルトリフラート(0.40 当量)を加えて、2 位水酸基に対し酸性ベンゾイル化を行った。反応を完結させるため 0 ℃まで昇温し、12 時間後、 後処理を行った。酢酸エチルーへキサンにて再結晶を行い、5 段階収率 14%で単糖供与体 3-4 を得 た。NAP 基の 3 位選択性は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY にて確認した。



続いて、単糖供与体 3-5、3-6、3-7 の合成について述べる (Scheme 3-26)。共通中間体である 3 位に遊離水酸基を有する 3-75⁹⁾をジクロロメタン溶媒中レブリン酸 (1.5 当量)と縮合剤 EDCI (1.5 当 量)、触媒量の DMAP を加えて、3位に Lev 基の導入を行い、収率 81%で Lev 体 3-5 を得た。また、 中間体 3-75 をジクロロメタン溶媒中、クロロアセチルクロライドとピリジンを加えることで 3位 に CAc 基の導入を行い、収率 75%で CAc 体 3-6 を得た。一方、中間体 3-75 をジクロロメタン溶媒 中、アリルオキシカルボニルクロライドとピリジン、触媒量の DMAP を加えることで 3位に AOC 基 の導入を行い、収率 92%で AOC 体 3-7 を得た。



Scheme 3-26

2) 12糖の合成

12糖メチルグリコシド体 3-72 の合成について述べる。

1 2糖メチルグリコシド保護体 3-78 の合成を行った(Scheme 3-27)。非還元末端の2,3位に 遊離水酸基を持つ8糖メチルグリコシド体 3-42(1.0 当量)と2,3位にLev 基を有する4糖チオ糖 3-40(1.2 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(4.0 g/mmol)存在下混在させ脱 水を行った。その後、-35 ℃にてNIS(1.44 当量)、TfOH(0.5 当量)によりフェニルチオ基を活性化 させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ 過カラム(GPC)を含む精製後、1 2糖 3-76 が収率 70%、単一異性体で得られた。続いて、1 2糖 3-76 をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAP を加えることで2位にアセチル基の導入を行っ た。速やかに反応は進行し、1 2糖 3-77 を収率 96%で得た。この際の 3-76 と 3-77 の同定は¹H-NMR、 ¹H-¹H COSY を用いて検討した。3-76 と 3-77 の全ての2位の化学シフト、および、アノマー位の結 合定数を同定することにより構造決定を試みたが、スペクトルの分離が十分でないため、一部の化 学シフト、および、結合定数は明らかにすることが出来なかった。しかし、¹H-¹H COSY より、3-76 は遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られたため、グリコシル化反応は3位選択的 に進行したものと考えている。一方、アノマー位の構造決定は、脱保護後行うこととした。続いて、 1 2糖 3-77 に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えてLev 基の脱保護を行った。反応は速や かに進行し、後処理、カラム精製を行うことで、目的とする 1 2糖 3-78 が収率 92%で得られた。



12糖メチルグリコシル体 3-78 の脱保護を行った (Scheme 3-28)。保護糖鎖 3-78 (1.0 当量) と THP プレリンカー (6.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (8.0 g/mmol) 存在下混在させ脱水を行った。その後、0 ℃にて 10-カンファースルホン酸(4.0 当量)を加えた。 一時間後、ろ過、濃縮を行い、シリカゲル精製を行って未反応の THP プレリンカーを除いた。続い て、得られた活性化エステルを CH_oCl_o/DMF(1/1)混合溶媒中、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA) を添加し、アミノ基を有する固相担体 Argo Pore (0.75 mmo1/g)へと固定化した。反応停止後、反 応溶液をろ別し、固相担体の洗浄および、乾燥することにより、12糖を担持した Argo Pore を得 た。この際にも、8糖と16糖に見られた、固相に担持されない化合物が見られた。続いて、Birch 還元を行うことでベンジルエーテルとベンジリデンアセタール、エステルの脱保護を同時に行った。 まず、糖鎖を担持した Argo Pore を膨潤させるため、室温下 THF 中で 15 分間撹拌した。その後、 反応容器を-78 ℃へと冷却し、液体アンモニアの導入を行った。混合溶媒は液体アンモニア/THF = 9/1の反応容器とし、-78 ℃条件下リチウム(50 mg)を加えた。溶液が濃青色を呈しラジカルの発生 を確認後、-78 ℃のままで1.5時間、アンモニア還流条件下1時間反応を行った。反応溶液を濾別 し、洗浄、および、乾燥することにより脱保護体担持 Argo Pore3-79 を得た。得られた Argo Pore を 5%メタノール-20%TFA-CH₂Cl₂溶液に 15 分間作用させ切り出しを行った。このとき、得られた化 合物の水酸基に対して TFA とのエステルが副生したため、メタノール溶媒下、ジメチルアミンを加 えて TFA エステルの脱保護を行った。速やかに反応は進行し、減圧下溶媒を飛ばし、逆相カラムク ロマトグラフィーにて精製を行うことで無保護の12糖**3-72**を5段階収率21%(平均収率73%) で得ることに成功した。生成物のアノマー位の立体化学は、¹H-NMR によるアノマー位のプロトンの 結合定数にて決定した(還元末端は α (4.79 ppm、2.9 Hz)、その他 β (4.70~4.76 ppm、7.7 Hz))。



Scheme 3-28

References

- a) Deslandes, Y.; Marchessault, R. H.; Sarko, A. *Macromolecules* 1980, *13*, 1466-1471.
 b) Chuah, C. T.; Sarko, A.; Deslandes, Y.; Marchessault, R. H. *Macromolecules* 1983, *16*, 1375-1382.
- Jamois, F.; Ferrières, V.; Guégan, J.-P.; Yvin, J.-C.; Plusquellec, D.; Vetvickal, V. Glycobiology 2005, 15, 393-407.
- Nicolaou, K. C.; Winssinger, N.; Pastor, J.; DeRoose, F. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 449-450.
- 4) Manfred, H.; Herbert, M.; Bernd, Z.; 野村正勝 監修、馬場章夫、三浦雅博他 訳、有機化 学のためのスペクトル解析法、化学同人、2002.
- 5) a) Mootoo, D.R.; Konradsoon, P.; Udodong, U.; Fraser-Reid, B. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 5583-5584.
 b) Fraser-Reid, B.; Udodong, U.; Wu, Z.; Ottosson, H.; Merritt, J. R.; Rao, C. S.; Roberts,
- C.; Madsen, R. *Synlett* **1992**, 927-942.
- 6) Mo, K.-F.; Li, H.; Mague, J. T.; Ensley, H. E. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 439-447.
- 7) a) Tanaka, H.; Ishida, T.; Matoba, N.; Tsukamoto, H.; Yamada, H.; Takahashi, T. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 6349-6352.
 - b) Tanaka, H.; Tateno, Y.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. Org. Lett. 2008, 10, 5597-5600.
- 8) a) Fugedi, P., Birberg, W., Garegg, P. J., Pilotti, A. *Carbohydr. Res.* 1987, *164*, 297-312.
 b) He, H.; Yang, F.; Du, Y. *Carbohydr. Res.* 2002, *337*, 1673-1678.
 - c) Zeng, Y.; Kong, F. J. Carbohydr. Chem. 2003, 22, 881-890.
 - d) Zeng, Y.; Kong, F. *Carbohydr. Res.* 2003, *338*, 843-849.
 - e) Zeng, Y.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 338, 2359-2366.
 - f) Ning, J.; Zhang, W.; Yi, Y.; Yang, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Kong, F. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, *11*, 2193-2203.
 - g) Zeng, Y.; Zhang, W.; Ning, J.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2003, 337, 2383-2391.
 - h) Li, A.; Kong, F. Carbohydr. Res. 2004, 339, 2499-2506.
- i) Jones, N. A.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 3201-3206.
- 9) 雨夜徹、博士論文、東京工業大学、2002.
- 10) Gangadharmath, U. B.; Demchenko, A. V. Synlett 2004, 2191-2193.
- 11) Wang, C. -C.; Leel, J. -C.; Luol, S. -Y.; Suvarn S.; Huang, Y. -W., K.; Lee, C. -C.; Chang, K. -L.; Hung, S. -C. Nature 2007, 446, 896-899.

Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranoside (3-2)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (**3-1**) (432 mg, 0.746 mmol, 1.00 eq.), octanol (0.235 mL, 1.49 mmol, 2.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (746 mg) in dry CH₂Cl₂ (7.50 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (201 mg, 0.895 mmol, 1.20 eq.) and TfOH (20.0 μ L, 0.224 mmol, 0.300 eq.) at -40 °C. After being stirred at -30 °C for 40 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in pyridine (7.50 mL) was added HF•pyridine (0.750 mL) at room temperature. After being stirred at 70 °C for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene:ethyl acetate 95:5 to give octyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (230 mg, 0.489 mmol, 2 steps 66%).

[α]_D²⁵ -40.9 ° (*c* 0.995, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (d, 2H, b, J = 7.2 Hz), 7.36-7.60 (m, 8H, aromatic), 5.57 (s, 1H, a), 5.17 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.67 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.39 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.04 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 3.86 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 9.7$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.81-3.90 (br-m, 1H, OCH₂), 3.68 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.46-3.55 (m, 2H, H-5, OCH₂), 1.48 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.01-1.21 (m, 10H, aliphatic), 0.83 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.0, 137.0, 133.3, 130.0, 129.8, 129.4, 128.5, 128.4, 126.4, (102.0, 101.6(anomeric, benzylidene)), 81.1, 75.0, 72.6, 70.5, 68.8, 66.3, 31.8, 29.5, 29.3, 29.2, 25.9, 22.7, 14.1; IR (solid): 3539, 3036, 2000, 1376, 1048, 908, 639, 517 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₈H₃₇O₇ [M+H]⁺ m/z = 485.2539, found: 485.2540.



Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl -β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-3)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (**3-1**) (29.4 mg, 50.7 µmol, 1.20 eq.), Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (19.9 mg, 42.3 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (84.6 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.85 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (13.7 mg, 60.9 µmol, 1.44 eq.) and TfOH (2.62 µL, 29.6 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 14 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene:ethyl acetate 97:3 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid e (**3-3**) (18.5 mg, 19.4 µmol, 46%).

[α]_D²² -9.80 ° (*c* 0.925, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (d, 2H, b or b', J = 8.2 Hz), 7.68 (d, 2H, b or b', J = 8.2 Hz), 7.24-7.53 (m, 16H, aromatic), 5.56 (s, 1H, a or a'), 5.39 (s, 1H, a or a'), 5.16-5.24 (m, 2H, H-A2, H-B2), 4.88 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 7.2$ Hz), 4.54 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.2$ Hz), 4.37 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 5.3$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.15-4.23 (m, 2H, H-B6b, H-A3), 3.51-3.89 (m, 7H, H-A4, H-A6a, H-B3, H-B4, H-B5, H-B6a, OCH₂), 3.30-3.36 (m, 2H, H-A5, OCH₂), 1.33 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 0.91-1.27 (m, 10H, aliphatic), 0.83 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz), 0.61 (s, 9H, c), -0.14 (s, 3H, d), -0.27 (s, 3H, d'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.7, 164.5, 137.3, 137.2, 132.9, 132.6, 130.0, 129.8x2, 129.2, 129.1, 128.3, 128.2, 128.1, 126.3, 126.1, (101.8, 101.6, 101.4, 100.6(anomeric, benzylidene)), 81.4, 79.6, 78.0, 75.4, 73.6, 73.1, 70.2, 68.9x2, 66.5, 66.2, 31.8, 29.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 25.5, 22.7, 17.9, 14.1, -4.2, -5.0; IR (solid): 3062, 2932, 2856, 1917, 1727, 1603, 1451, 1378, 1268, 1084, 1007, 836, 748, 705, 496 cm⁻¹; HRMS

(ESI-TOF) calcd for $C_{54}H_{69}O_{13}Si [M+H]^+ m/z = 953.4507$, found: 953.4507.



Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-12)

To a stirred solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-3**) (18.0 mg, 18.9 µmol, 1.00 eq.) in pyridine (1.00 mL) was added HF•pyridine (37.8 µL) at room temperature. After being stirred at 70 °C for 2 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 75:25 to give octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-12**) (10.7 mg, 12.8 µmol, 67%).

[α]_D²⁴ -25.5 ° (*c* 0.995, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.73 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.27-7.54 (m, 16H, aromatic), 5.56 (s, 1H, a or a'), 5.36 (s, 1H, a or a'), 5.25 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 6.8$ Hz, $J_{A2,A3} = 8.2$ Hz), 5.11 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 7.2$ Hz, $J_{B2,B3} = 8.2$ Hz), 4.95 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 6.8$ Hz), 4.56 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.2$ Hz), 4.37 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.18-4.23 (m, 2H, H-A6b, H-A3), 3.64-3.89 (m, 6H, H-A4, H-A6a, H-B3, H-B4, H-B6a, OCH₂), 3.54 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = J_{B5,B6a} = 9.7$ Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.31-3.42 (m, 2H, H-A5, OCH₂), 2.54 (br-s, 1H, OH), 1.38 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 0.96-1.20 (m, 10H, aliphatic), 0.82 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 164.7, 137.25, 137.03, 133.03, 129.9x2, 129.7x3, 129.4, 129.3x2, 128.4x2, 128.3, 126.3, 126.2, (101.8, 101.6, 101.5, 100.4(anomeric, benzylidene)), 80.6, 79.5, 78.1, 75.4, 73.7, 72.7, 70.2, 68.9, 68.7, 66.5, 66.1, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 3553, 2933, 2347, 1731, 1457, 1268, 1077, 820, 696 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₈H₅₅O₁₃ [M+H]⁺ m/z = 839.3643, found: 839.3645.


Phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-naphthylmethyl)-β-D-glucopyranoside (3-4)

To a stirred solution of phenylthio 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside (**3-73**) (5.09 g, 11.6 mmol, 1.00 eq.) in MeOH (10.0 mL) and THF (10.0 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in pyridine (60.0 mL) was added trimethylsilyl chloride (7.02 mL, 55.5 mmol, 4.80 eq.) and a catalytic amount of DMAP at 0 °C. After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was poured into water. The aqueous layer was extracted with two portions of Et_2O . The combined extract was washed with 1 M HCl, water, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

A mixture of part of the residue (1.58 mmol, 1.00 eq.), benzaldehyde (0.167 mL, 1.66 mmol, 1.05 eq.) and pulverized activated molecular sieves (3A) (1.14 g) in dry CH_2Cl_2 (11.4 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added TMSOTf (42.9 µL, 0.237 mmol, 0.150 eq.) at -86 °C. After being stirred at the same temperature for 2 h, the reaction mixture was added triethylsilane (0.277 mL, 1.74 mmol, 1.10 eq.), 2-naphthaldehyde (296 mg, 1.89 mmol, 1.20 eq.) and TMSOTf (21.4 µL, 0.118 mmol, 0.0750 eq.). After being stirred at the same temperature for 5 h, the reaction mixture was added benzoic anhydride (1.19 g, 4.73 mmol, 3.00 eq.) and TMSOTf (72.4 µL, 0.631 mmol, 0.400 eq.). After being stirred at the 0 °C for 12 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystalized from ethyl acetate-hexane to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*- (2-naphthylmethyl)- β -D-glucopyranoside (**3-4**) (191 mg, 0.316 mmol, 5 steps 14%) as a white solid.

 $[\alpha]_{D}^{25}$ +53.1 ° (*c* 1.02, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (d, 2H, b, *J* = 7.2 Hz), 7.20-7.67 (m, 20H, aromatic), 5.63 (s, 1H, a), 5.31 (dd, 1H, H-2, *J*_{1,2} = 10.1 Hz, *J*_{2,3} = 8.7 Hz), 4.96 (d, 1H, c, *J*_{gem} = 12.1 Hz), 4.83 (d, 1H, c, *J*_{gem} = 12.1 Hz), 4.82 (d, 1H, H-1, *J*_{1,2} = 10.1 Hz), 4.42 (dd, 1H, H-6b, *J*_{5,6b} = 4.8 Hz, *J*_{gem} = 10.1 Hz), 3.93 (dd, 1H, H-3, *J*_{2,3} = 8.7 Hz, *J*_{3,4} = 9.2 Hz), 3.86 (br-t, 2H, H-4, H-6a), 3.57 (ddd, 1H, H-5, *J*_{4,5} = 9.7 Hz, *J*_{5,6a} = 10.1 Hz, *J*_{5,6b} = 4.8 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.1, 137.3, 135.2, 133.3, 133.1, 133.0x2, 132.3, 130.0, 129.8, 129.2, 129.0, 128.4x2, 128.3, 128.1, 128.0, 127.7, 127.1, 126.2x2, 126.0, 125.8, 101.5, 87.1(anomeric), 81.6, 79.2, 74.4, 72.0, 70.7, 68.7; IR (solid): 2948, 2307, 1716, 1582, 1385, 1264, 1097, 904, 709 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₇H₃₃O₆S [M+H]⁺ *m/z* = 605.1998, found: 605.2003.



Phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-levurinoyl-B-D-glucopyranoside (3-5)

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3**-75) (97.6 mg, 0.210 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (2.10 mL) was added levurinic acid (32.0 μ L, 0.315 mmol, 1.50 eq.), a catalytic amount of DMAP and EDCI-HCl (60.5 mg, 0.315 mmol, 1.50 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 80:20 to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-5**) (95.6 mg, 0.170 mmol, 81%)

 $[α]_D^{26}$ -1.50 ° (*c* 1.06, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (d, 2H, b, *J* = 7.2 Hz), 7.27-7.61 (m, 13H, aromatic), 5.53 (s, 1H, a), 5.52 (dd, 1H, H-3, *J*_{2,3} = 9.2 Hz, *J*_{3,4} = 9.7 Hz), 5.28 (dd, 1H, H-2, *J*_{1,2} = 10.1 Hz, *J*_{2,3} = 9.2 Hz), 4.95 (d, 1H, H-1, *J*_{1,2} = 10.1 Hz), 4.43 (dd, 1H, H-6b, *J*_{5,6b} = 4.8 Hz, *J*_{gem} = 10.6 Hz), 3.84 (dd, 1H, H-6a, *J*_{5,6a} = 10.1 Hz, *J*_{gem} = 10.6 Hz), 3.76 (dd, 1H, H-4, *J*_{3,4} = 9.7 Hz, *J*_{4,5} = 9.2 Hz), 3.65 (ddd, 1H, H-5, *J*_{4,5} = 9.2 Hz, *J*_{5,6a} = 10.1 Hz, *J*_{5,6b} = 4.8 Hz), 2.41-2.56 (m, 4H, c, d), 1.97 (s, 3H, e); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 205.7, 171.9, 165.3, 136.8, 133.5, 133.1, 131.9, 130.1, 129.4, 129.2, 129.1, 128.6, 128.5, 128.3, 126.2, 101.5, 87.0(anomeric), 78.3, 73.0, 71.2, 70.9, 68.6, 38.0, 29.6, 28.1; IR (solid): 2865, 2346, 1716, 1584, 1355, 1181, 1026, 699, 534 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₁H₃₁O₈S [M+H]⁺ *m/z* = 563.1740,

Experimental Section

found: 563.1737.



Phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl-β-D-glucopyranoside (3-6)

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3**-75) (98.9 mg, 0.213 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (2.10 mL) was added chloroacetyl chloride (20.4 μ L, 0.258 mmol, 1.20 eq.) and pyridine (41.3 μ L, 0.511 mmol, 2.40 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 90:10 to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl- β -D-glucopyranoside (**3**-6) (88.6 mg, 0.163 mmol, 77%)

[α]_D²⁶ -8.80 ° (*c* 1.03, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (d, 2H, b, J = 7.2 Hz), 7.28-7.62 (m, 13H, aromatic), 5.56 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 5.53 (s, 1H, a), 5.29 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.7$ Hz), 4.96 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.44 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.97 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 3.92 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 3.85 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 10.1$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.79 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz), 3.67 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 10.1$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.6, 165.3, 136.6, 133.7, 133.3, 131.6, 130.1, 129.3, 129.1x2, 128.7, 128.6, 128.4, 126.2, 101.7, 87.0(anomeric), 78.1, 74.7, 71.0, 70.9, 68.6, 40.5; IR (solid): 2857, 2296, 1766, 1376, 1097, 931, 672 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₈H₂₆O₇SCI [M+H]⁺ m/z = 541.1088, found: 541.1084.



Phenylthio 3-O-allyloxycarbonyl-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranoside (3-7)

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3**-75) (172 mg, 0.371 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (3.70 mL) was added allyl chloroformate (58.9 µL, 0.557 mmol, 1.50 eq.) and pyridine (90.0 µL, 1.11 mmol, 3.00 eq.), a catalytic amount of DMAP at -10 °C. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 90:10 to give phenylthio 3-*O*-allyloxycarbonyl-2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3**-7) (186.4 mg, 0.340 mmol, 92%)

[α]_D²⁶ +12.1 ° (*c* 1.02, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (d, 2H, b, J = 7.2 Hz), 7.29-7.62 (m, 13H, aromatic), 5.67 (br-m, 1H, d), 5.53 (s, 1H, a), 5.29-5.37 (m, 2H, H-2, e), 5.13 (dd, 1H, e', $J_{d,e'} = 16.9$ Hz, $J_{gem} = 0.97$ Hz), 4.95-5.01 (m, 2H, H-1, H-3), 4.41-4.45 (m, 3H, H-6b, c), 3.84 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 9.7$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.80 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.66 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = J_{5,6a} = 9.7$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.1, 154.3, 136.8, 133.5, 133.2, 131.8, 131.1, 130.1, 129.3, 129.2, 129.1, 128.5, 128.3x2, 126.3, 118.8, 101.7, 87.0(anomeric), 78.2, 77.0, 71.2, 70.8, 68.8, 68.5; IR (solid): 2864, 2340, 1760, 1603, 1268, 1148, 968, 689 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₀H₂₉O₈S [M+H]⁺ m/z = 549.1583, found: 549.1585.



Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-naphthylmethyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-8)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-naphthylmethyl)- β -D-glucopyranoside (**3-4**) (31.8 mg, 52.5 µmol, 1.20 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (20.6 mg, 43.8 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (87.6 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.880 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (14.2 mg, 63.1 µmol, 1.44 eq.) and TfOH (2.71 µL, 30.7 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 5 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene:ethyl acetate 95:5 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene -3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*n*-aphthylmethyl)- β -D-glucopyranoside (**3-8**) (17.7 mg, 18.1 µmol, 41%).

 $[\alpha]_{D}^{21}$ +19.3 ° (*c* 0.885, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.13-7.79 (m, 27H, aromatic), 5.55 (s, 1H, a or a'), 5.55 (s, 1H, a or a'), 5.27 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 6.8$ Hz, $J_{B2,B3} = 7.7$ Hz), 5.23 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 7.2$ Hz, $J_{A2,A3} = 8.2$ Hz), 4.88 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 6.8$ Hz), 4.84 (d, 1H, c, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.75 (d, 1H, c, $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.53 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.2$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.18 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.15 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 8.2$ Hz, $J_{A3,A4} = 9.2$ Hz), 3.91 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = 7.7$ Hz, $J_{B3,B4} = 9.2$ Hz), 3.64-3.84 (m, 5H, H-A4, H-B4, H-A6a, H-B6a, OC H_2), 3.52 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = J_{B5,B6a} = 9.7$ Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.39 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = J_{A5,A6a} = 9.7$ Hz, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz), 3.32 (br, 1H, OC H_2), 1.34 (br-t, 2H, OCH₂C H_2), 1.01-1.22 (m, 10H, aliphatic), 0.81 (t, 3H, 1.05) (t, 3H) (t, 3H)

CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.8, 164.6, 137.4, 137.3, 135.4, 133.1, 132.9, 132.7, 129.8, 129.7x2, 129.6, 129.3, 129.0, 128.3x5, 128.1, 127.9, 127.6, 126.7, 126.2x2, 126.1, 125.8, 125.7, (101.6x2, 101.2, 100.6(anomeric, benzylidene)), 81.0, 79.5, 78.3, 78,1, 73,8, 73.7, 73.6, 70.2, 68.9, 68.8, 66.6, 66.1, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2926, 1721, 1377, 1268, 1073, 1008, 688, 653 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₅₉H₆₃O₁₃ [M+H]⁺ m/z = 979.4269, found: 979.4274.



Deprotection of C3 position of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-naphthylmethyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (3-8)

To a stirred solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-naphthylmethyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-8**) (17.7 mg, 18.1 µmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (0.800 mL) and MeOH (0.200 mL) was added DDQ (20.5 mg, 90.5µmol, 5.00 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 12 h, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 75:25 to give octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-12**) (1.30 mg, 1.55 µmol, 9%).

Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-levurinoyl-β-D-glucopyranoside (3-9)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-5**) (30.0 mg, 53.3 µmol, 1.20 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (20.9 mg, 44.4 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (88.8 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.890 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (14.4 mg, 63.9 µmol, 1.44 eq.) and TfOH (2.75 µL, 31.1 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 14 h, the

reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 50:50 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*benzylidene-3-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-9**) (18.1 mg, 19.3 µmol, 47%).

[α]_D²² -5.00 ° (*c* 0.905, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.61 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.24-7.53 (m, 16H, aromatic), 5.58 (s, 1H, a or a'), 5.34 (s, 1H, a or a'), 5.31 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = 8.2$ Hz, $J_{B3,B4} = 9.2$ Hz), 5.23 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz, $J_{A2,A3} = 8.2$ Hz), 5.22 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 7.2$ Hz, $J_{B2,B3} = 8.2$ Hz), 4.93 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 7.2$ Hz), 4.53 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.37 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.20 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 5.3$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.16 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 8.2$ Hz, $J_{A3,A4} = 9.7$ Hz), 3.74-3.86 (m, 4H, H-A6a, H-B4, H-B6a, OC*H*₂), 3.70 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 9.7$ Hz, $J_{A4,A5} = 10.6$ Hz), 3.52 (ddd, 1H, H-B5, $J_{B4,B5} = J_{B5,B6a} = 9.7$ Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.46 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = 10.6$, $J_{A5,A6a} = 9.7$ Hz, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz), 3.33 (br-m, 1H, OC*H*₂), 2.30-2.47 (m, 4H, c, d), 1.93 (s, 3H, e), 1.34 (br-t, 2H, OCH₂C*H*₂), 0.86-1.21 (m, 10H, aliphatic), 0.81 (t, 3H, CH₂C*H*₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 205.8, 171.8, 164.9, 164.6, 137.2, 136.9, 133.0, 132.9, 129.9, 129.7, 129.6, 129.3x2, 129.2, 129.1, 128.4, 128.3, 128.2, 126.2, 126.1, (101.7, 101.5, 101.4, 100.8(anomeric, benzylidene)), 79.4, 78.7, 78.1, 73.5, 72.9, 72.1, 70.3, 68.8, 68.7, 66.6, 66.3, 37.9, 31.8, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1, 28.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2929, 2363, 1728, 1452, 1268, 1027, 847, 652, 496 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₅₃H₆₁O₁₅ [M+H]⁺ m/z = 937.4010, found: 937.4014.



Deprotection of C3 position of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-9)

To a stirred solution of the octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-9**) (18.1 mg, 19.3 μ mol,

1.00 eq.) in dry THF (1.00 mL) was added hydrazine monohydrate (0.0500 mL) and acetic acid (0.100 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 75:25 to give octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-12**) (14.5 mg, 17.3 µmol, 90%).

Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-10)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl- β -D-glucopyranoside (**3-6**) (27.0 mg, 49.9 µmol, 1.20 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (19.6 mg, 41.6 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (83.2 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.830 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (13.5 mg, 59.9 µmol, 1.44 eq.) and TfOH (2.60 µL, 29.1 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at 0 °C for 14 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ and further purified by gel permeation chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzyliden

[α]_D²² -6.80 ° (*c* 0.710, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.61 (d, 2H, b or b', J = 7.7 Hz), 7.24-7.54 (m, 16H, aromatic), 5.58 (s, 1H, a or a'), 5.37 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = J_{B3,B4} = 8.7$ Hz), 5.34 (s, 1H, a or a'), 5.24 (br-t, 2H, H-A2, H-B2), 4.95 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 6.8$ Hz), 4.54 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.37 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.20 (dd, 1H, H-B6b, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.16 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 8.7$ Hz, $J_{A3,A4} = 9.2$ Hz), 3.90 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 3.83 (d, 1H, CH₂Cl, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 3.68-3.86 (m, 4H, H-A6a, H-B4, H-B6a, OCH₂), 3.71 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 9.2$ Hz, $J_{A4,A5} = 10.1$ Hz), 3.44-3.56 (m, 2H, H-A5, H-B5), 3.34 (br-m, 1H, OCH₂), 1.34 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 0.88-1.20 (m, 10H, aliphatic), 0.81 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.6, 164.9, 164.6, 137.2, 136.8, 133.1, 133.0, 129.9, 129.7, 129.5, 129.4, 129.2, 129.0, 128.4x2, 128.3x2, 126.2, 126.1, (101.7, 101.5x2, 100.7(anomeric, benzylidene)), 79.5, 78.8, 77.8, 73.8, 73.4, 72.7, 70.3, 68.9, 68.7, 66.5, 66.2, 40.5, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2932, 1768, 1721, 1275, 129.4, 129.2, 129.0, 128.4x2, 128.3x2, 126.2, 126.1, (101.7, 101.5x2, 100.7(anomeric, benzylidene)), 79.5, 78.8, 77.8, 73.8, 73.4, 72.7, 70.3, 68.9, 68.7, 66.5, 66.2, 40.5, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2932, 1768, 1721, 1275, 129.4, 129.2, 129.0, 128.4x2, 128.3x2, 126.2, 126.1, (101.7, 101.5x2, 100.7(anomeric, benzylidene)), 79.5, 78.8, 77.8, 73.8, 73.4, 72.7, 70.3, 68.9, 68.7, 66.5, 66.2, 40.5, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2932, 1768, 1721, 1275, 103.4, 1275, 103.4, 129.4, 129.2, 129.4, 129.2, 129.4,



Deprotection of C3 position of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-10)

To a stirred solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-chloroacetyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-10**) (14.0 mg, 15.3 µmol, 1.00 eq.) in dry DMF (1.00 mL) was added thiourea (58.2 mg, 0.765 mmol, 5.00 eq.) and 2,6-lutidine (89.1 µL, 0.765 mmol, 5.00 eq.) at room temperature. After being stirred at 70 °C for 2 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with water, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 75:25 to give octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-12**) (11.4 mg, 13.6 µmol, 89%).

Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-allyloxycarbonyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-11)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-allyloxycarbonyl- β -D-glucopyranoside (**3-7**) (27.7 mg, 50.5 µmol, 1.20 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (19.8 mg, 42.1 µmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (84.2 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.840 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (13.6 mg, 60.6 µmol, 1.44 eq.) and TfOH (2.60 µL, 29.5 µmol, 0.700 eq.) at -40 °C. After being stirred at -10 °C for 21 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions

of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl -4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-allyloxycarbonyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-11**) (3.70 mg, 4.01 µmol, 10%).

[α]_D²² +4.20 ° (*c* 0.185, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (d, 2H, b or b', J = 8.2 Hz), 7.64 (d, 2H, b or b', J = 8.2 Hz), 7.24-7.53 (m, 16H, aromatic), 5.62 (br-m, 1H, d), 5.58 (s, 1H, a or a'), 5.26 (s, 1H, a or a'), 5.22-5.27 (m, 2H, H-B2, e), 5.11 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz, $J_{A2,A3} = 10.1$ Hz), 5.09 (dd, 1H, e', $J_{d,e'} = 17.4$ Hz, $J_{gem} = 1.4$ Hz), 4.96 (dd, 1H, H-B3, $J_{B2,B3} = 7.7$ Hz, $J_{B3,B4} = 11.6$ Hz), 4.95 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2} = 7.7$ Hz), 4.54 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.35-4.40 (m, 3H, H-B6b, c), 4.19 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 5.3$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.17 (dd, 1H, H-A3, $J_{A2,A3} = 10.1$ Hz, $J_{A3,A4} = 9.7$ Hz), 3.76-3.89 (m, 4H, H-A6a, H-B4, H-B6a, OCH₂), 3.69 (dd, 1H, H-A4, $J_{A3,A4} = 9.7$ Hz, $J_{A4,A5} = 10.6$ Hz), 3.46-3.56 (m, 2H, H-A5, H-B5), 3.34 (br, 1H, OCH₂), 1.35 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 0.86-1.21 (m, 10H, aliphatic), 0.81 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.7, 164.6, 154.3, 137.2, 136.9, 133.0, 132.9, 131.1, 130.0, 129.8, 129.6, 129.4, 129.2, 129.1, 128.4, 128.3, 128.2x2, 136.3, 126.2, 118.9, (101.7, 101.6, 101.4, 100.6(anomeric, benzylidene)), 79.4, 78.4, 77.8, 76.1, 73.6, 72.9, 70.3, 68.9, 68.7x2, 66.6, 66.1, 31.8, 29.4, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 2930, 1730, 1377, 1247, 1087, 698, 652, 497 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₅₂H₅₉O₁₅ [M+H]⁺ m/z = 923.3854, found: 923.3821.



Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-13)

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-levurinoyl-β-D-glucopyranoside (**3-5**) (235 mg, 0.417 mmol, 1.50 eq.), octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-

benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (**3-12**) (233 mg, 0.278 mmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (556 mg) in dry CH₂Cl₂ (5.60 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (113 mg, 0.500 mmol, 1.80 eq.) and TfOH (7.4 μ L, 83.4 μ mol, 0.300 eq.) at -40 °C. After being stirred at -20 °C for 15 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in dry THF (3.00 mL) was added hydrazine monohydrate (0.150 mL) and acetic acid (0.300 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30 and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene - β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-13**) (235 mg, 0.197 mmol, 2 steps 74%).

 $[\alpha]_{D}^{24}$ -10.6 ° (c 0.965, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (d, 2H, b or b' or b'', J = 7.2 Hz), 7.87 (d, 2H, b or b' or b'', J = 7.7 Hz), 7.68 (d, 2H, b or b' or b'', J = 7.7 Hz), 7.16-7.60 (m, 24H, aromatic), 5.46 (s, 1H, a or a' or a''), 5.43 (s, 1H, a or a' or a''), 5.19 (dd, 1H, H-C2, $J_{C1,C2} = 7.2$ Hz, $J_{C2,C3} = 7.7$ Hz), 5.15 (dd, 1H, H-B2, $J_{B1,B2} = 4.3$ Hz, $J_{B2,B3} = 3.9$ Hz), 5.11 (d, 1H, H-C1, $J_{C1,C2} = 7.2$ Hz), 4.94 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2}$ = 4.3 Hz), 4.90 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1.A2}$ = 7.7 Hz, $J_{A2.A3}$ = 8.7 Hz), 4.69 (s, 1H, a or a' or a''), 4.45 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.29 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.21 (dd, 1H, H-C6b, $J_{C5,C6b} = 4.8$ Hz, $J_{\text{gem}} = 10.6 \text{ Hz}$, 4.11-4.15 (m, 2H, H-A3, H-B6b), 4.07 (dd, 1H, H-4B, $J_{\text{B3,B4}} = 8.2 \text{ Hz}$, $J_{\text{B4,B5}} = 9.2 \text{ Hz}$), 4.03 (dd, 1H, H-3B, $J_{B2,B3} = 3.9$ Hz, $J_{B3,B4} = 8.2$ Hz), 3.97 (dd, 1H, H-3C, $J_{C2,C3} = 7.7$ Hz, $J_{C3,C4} = 8.7$ Hz), 3.47-3.78 (m, 7H, H-C4, H-B5, H-C5, H-A6a, H-B6a, H-C6a, OCH₂), 3.40 (ddd, 1H, H-A5, $J_{A4,A5} = J_{A5,A6a} = J_{A5,A6a}$ 9.2 Hz, $J_{B5,B6b} = 4.8$ Hz), 3.33 (br, 1H, OCH₂), 3.22 (dd, 1H, H-4A, $J_{A3,A4} = J_{A4,A5} = 9.2$ Hz), 2.57 (br-s, 1H, OH), 1.37 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.03-1.22 (m, 10H, aliphatic), 0.83 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.7 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.9, 164.7, 164.6, 137.4, 137.3, 137.0, 133.6, 133.2, 133.1, 130.1, 129.8x2, 129.6x2, 129.4, 129.3, 129.2, 128.9, 128.8, 128.4x3, 128.3, 128.0, 126.5, 126.4, 126.2, (102.0, 101.9, 101.5, 100.7, 98.3, 98.2(anomeric, benzylidene)), 80.9, 78.9, 77.8, 76.5, 74.9, 74.7, 74.5, 72.8, 72.7, 70.1, 68.9x2, 68.8, 66.5, 66.1, 65.5, 31.8, 29.5, 29.3, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 3480, 2923, 2855, 2367, 1733, 1554, 1377, 1173, 1022, 912, 773, 677 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{68}H_{73}O_{19}$ [M+H]⁺ m/z = 1193.4746,

Experimental Section



Octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-14)

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-5**) (200 mg, 0.355 mmol, 2.00 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyr anoside (**3-13**) (212 mg, 0.178 mmol, 1.00 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene), and pulverized activated molecular sieves (4A) (356 mg) in dry CH₂Cl₂ (3.60 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. To the reaction mixture was added NIS (96.1 mg, 0.427 mmol, 2.40 eq.) and TfOH (4.70 µL, 53.4 µmol, 0.300 eq.) at -40 °C. After being stirred at -20 °C for 1 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in dry THF (3.00 mL) was added hydrazine monohydrate (0.150 mL) and acetic acid (0.300 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with toluene:ethyl acetate 90:10 to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyra

[α]_D²⁵ +3.60 ° (*c* 1.55, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.16-7.94 (m, 30H, aromatic), 5.53 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 5.42 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 5.18 (dd, 1H, H-D2, $J_{D1,D2} = 7.2$ Hz, $J_{D2,D3} = 8.2$ Hz), 5.14 (dd, 1H, H-B2 or H-C2, $J_{1,2} = 4.3$ Hz, $J_{2,3} = 3.9$ Hz), 5.06 (d, 1H, H-D1, $J_{D1,D2} = 7.2$ Hz), 4.97 (d, 1H, H-B1 or H-C1, $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 4.93 (dd, 1H, H-A2, $J_{A1,A2} = 8.2$ Hz, $J_{A2,A3} = 8.7$ Hz), 4.79-4.84 (m, 2H, H-B1 or H-C1, H-B2 or H-C2), 4.82 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 4.80 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 4.46 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 8.2$ Hz), 4.33 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.20 (dd, 1H, H-D6b, $J_{D5,D6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.04-4.14 (m, 4H, H-A3, H-B3 or H-C3, H-B6b, H-C6b), 3.91-4.00 (m, 3H, H-B3 or H-C3, H-D3, H-B4 or H-C4), 3.30-3.79 (m, 13H, H-A4, H-B4 or H-C4, H-D4, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a, OC H_2), 2.57 (br-s, 1H, OH), 1.36 (br-t, 2H, OCH₂C H_2), 1.02-1.22 (m, 10H, aliphatic), 0.83 (t, 3H, CH₂C H_3 , J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.9, 164.7x3, 137.4, 137.3x2, 137.1, 133.7, 133.4, 133.1x2, 130.0x2, 129.8x2, 129.7x3, 129.4, 129.3, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.4x5, 128.3, 128.1x2, 126.4x3, 126.2, (101.9x2, 101.6, 101.3, 100.8, 98.8, 98.6, 97.1(anomeric, benzylidene)), 80.9, 79.1, 78.3, 77.6, 75.5, 75.0, 74.4, 74.2, 73.7, 72.7, 72.6, 70.2, 68.8, 68.7, 66.5, 66.1, 65.7, 65.6, 31.8, 29.5, 29.2, 29.1, 25.8, 22.7, 14.1; IR (solid): 3474, 2932, 2870, 1731, 1377, 1262, 1176, 1026, 696, 526 cm⁻¹.



Octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-5**) (101 mg, 0.179 mmol, 2.00 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-gluc

of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in dry THF (2.00 mL) was added hydrazine monohydrate (0.100 mL) and acetic acid (0.200 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with hexane:ethyl acetate 70:30 to give octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*

 $[\alpha]_{D}^{25}$ +20.3 ° (c 1.03, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.15-7.97 (m, 50H, aromatic), 5.51 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 5.44 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 5.20 (dd, 1H, H-E2, $J_{E1,E2} = 7.2$ Hz, $J_{E2,E3} =$ 8.2 Hz), 5.18 (dd, 1H, H-B2 or H-C2 or H-D2, $J_{1,2} = 4.8$ Hz, $J_{2,3} = 5.3$ Hz), 5.11 (d, 1H, H-E1, $J_{E1,E2} = 7.2$ Hz), 4.98 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{12} = 4.8$ Hz), 4.82-4.90 (m, 5H, H-B1 or H-C1 or H-D1x2, H-A2, H-B2 or H-C2 or H-D2x2), 4.82 (s, 1H, a or a' or a'' or a''' or a'''), 4.76 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 4.74 (s, 1H, a or a' or a'' or a'''), 4.44 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 4.31 (dd, 1H, H-A6b, $J_{A5,A6b} =$ 4.8 Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.22 (dd, 1H, H-E6b, $J_{E5,E6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.97-4.16 (m, 8H, H-A3, H-B3 or H-C3 or H-D3x2, H-E3, H-B4 or H-C4 or H-D4, H-B6b, H-C6b, H-D6b), 3.89 (dd, 1H, H-B3 or H-C3 or H-D3, $J_{2,3} = 3.9$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.20-3.78 (m, 16H, H-A4, H-B4 or H-C4 or H-D4x2, H-E4, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, H-E5, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a, H-E6a, OCH₂), 2.57 (br-s, 1H, OH), 1.36 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.02-1.22 (m, 10H, aliphatic), 0.83 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 8 165.9, 164.9, 164.7x2, 164.6, 137.4, 137.3, 133.9, 133.6, 133.2, 133.1x2, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4x2, 129.3, 129.2x3, 129.1x2, 129.0, 128.9x3, 128.7, 128.6, 128.5x2, 128.4x2, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 126.5, 126.4x2, 126.2, (102.1, 101.9, 101.5, 101.4, 101.1, 100.8, 98.5, 98.3, 97.3, 97.0(anomeric, benzylidene)), 80.9, 79.0, 78.2, 78.0, 77.6, 74.9, 74.7, 74.4, 74.3, 73.6, 73.1x2, 72.7, 72.5, 72.1, 70.1, 68.8, 68.7, 68.6, 66.5, 66.1, 65.7, 65.6, 65.5, 31.8, 29.5, 29.2x2, 29.1, 25.8, 22.7x2, 14.3, 14.1; IR (solid): 3507, 2923, 2854, 1742, 1377, 1052, 921, 772, 697, 526 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{108}H_{109}O_{31}$ [M+H]⁺ m/z = 1901.6953, found: 1901.6912.



Octyl 3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranoside (3-62)

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-levurinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-5**) (14.0 mg, 24.8 µmol, 2.00 eq.), octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyra

A solution of the residue in MeOH (5.00 mL) and ethyl acetate (5.00 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with flow rate 1 mL/min at 60 °C under 60 bar. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and concentrated *in vacuo*. A solution of the residue in MeOH (10.0 mL) and acetic acid (0.100 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation and azeotroped with toluene. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl 3-O-(3-O-

glucopyranoside (3-62) (1.80 mg, 1.63 µmol, 3 steps 29%).

 $[\alpha]_D^{25}$ -23.9 ° (*c* 0.0500, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 30 °C): δ 4.77 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-F1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.75 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-F1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.70 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-F1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.70 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-F1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.66 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1 or H-F1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.45 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 8.2$ Hz), 3.88-3.91 (m, 7H, H-A3, H-A6b, H-B6b, H-C6b, H-D6b, H-E6b, H-F6b), 3.62-3.78 (m, 12H, H-A4, H-B4, H-C4, H-D4, H-E4, H-F4, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a, H-E6a, H-F6a), 3.31-3.55 (m, 19H, H-A2, H-B2, H-C2, H-D2, H-E2, H-F2, H-B3, H-C3, H-D3, H-E3, H-F3, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, H-E5, H-F5, OCH₂), 1.61 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.25-1.34 (m, 10H, aliphatic), 0.84 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 6.8 Hz); IR (solid): 3275, 2923, 2164, 1624, 1433, 1203, 1035, 665, 536 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₄H₇₉O₃₁ [M+H]⁺ m/z = 1103.4651, found: 1103.4602.



Octyl β-D-glucopyranoside (3-63)

A solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-2**) (18.2 mg, 38.6 µmol, 1.00 eq.) in MeOH (5.00 mL) and ethyl acetate (5.00 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with flow rate 1 mL/min at 60 °C under 60 bar. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and concentrated *in vacuo*. A solution of the residue in MeOH (10.0 mL) and acetic acid (0.100 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation was collected and concentrated *in vacuo* and azeotroped with toluene. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl β -D-glucopyranoside (**3-63**) (3.50 mg, 12.0 µmol, 2 steps 31%).

 $[\alpha]_{D}^{25}$ -33.0 ° (*c* 0.105, acetone); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.23 (d, 1H, H-A1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 3.84-3.92 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.65 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 5.3$ Hz, $J_{gem} = 11.6$), 3.52 (br, 1H, OCH₂), 3.22-3.36 (m, 3H, H-4, H-5, OCH₂), 3.16 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 1.61 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.30-1.39 (m, 10H, aliphatic), 0.89 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 6.8 Hz); IR (solid): 3381, 2925, 2855, 1720, 1666, 1457, 1377, 1028, 672, 520 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₄H₂₉O₆ [M+H]⁺ *m/z* = 293.1964, found: 293.1965.



Octyl 3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranoside (3-64)

A solution of octyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-12**) (11.5 mg, 13.7 µmol, 1.00 eq.) in MeOH (5.00 mL) and ethyl acetate (5.00 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with flow rate 1 mL/min at 60 °C under 60 bar. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and concentrated *in vacuo*. A solution of the residue in MeOH (10.0 mL) and acetic acid (0.100 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl $3-O-\beta$ -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**3-64**) (2.60 mg, 5.72 µmol, 2 steps 42%).

 $[\alpha]_{D}^{25}$ -40.3 ° (*c* 0.0400, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 40 °C): δ 4.70 (d, 1H, H-B1, $J_{B1,B2}$ = 8.2 Hz), 4.44 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2}$ = 7.7 Hz), 3.87-3.90 (m, 3H, H-A3, H-A6b, H-B6b), 3.64-3.72 (m, 4H, H-A4, H-B4, H-A6a, H-B6a), 3.32-3.52 (m, 7H, H-A2, H-B2, H-B3, H-A5, H-B5, OCH₂), 1.59 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.25-1.29 (m, 10H, aliphatic), 0.84 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); IR (solid): 3295, 2922, 2134, 1661, 1375, 1158, 1018, 891, 668, 520 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₀H₃₉O₁₁ [M+H]⁺ m/z = 455.2492, found: 455.2495.



Octyl 3-O-(3-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranoside (3-65)

A solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (3-13) (12.6 mg, 10.6 µmol, 1.00 eq.) in MeOH (5.00 mL) and ethyl acetate (5.00 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with flow rate 1 mL/min at 60 °C under 60 bar. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and concentrated *in vacuo*. A solution of the residue in MeOH (10.0 mL) and acetic acid (0.100 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation. The reaction mixture in the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation. The reaction mixture is collected and concentrated *in vacuo* and azeotroped with toluene. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl 3-O-(3-O- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (3-65) (3.10 mg, 5.03 μ mol, 2 steps 48%).

 $[\alpha]_{D}^{25}$ -23.6 ° (*c* 0.130, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 45 °C): δ 4.75 (d, 1H, H-B1 or H-C1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.72 (d, 1H, H-B1 or H-C1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.45 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 8.2$ Hz), 3.88-3.91 (m, 4H, H-A3, H-A6b, H-B6b, H-C6b), 3.63-3.77 (m, 6H, H-A4, H-B4, H-C4, H-A6a, H-B6a, H-C6a), 3.32-3.56 (m, 10H, H-A2, H-B2, H-C2, H-B3, H-C3, H-A5, H-B5, H-C5, OCH₂), 1.60 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.26-1.35 (m, 10H, aliphatic), 0.84 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 6.8 Hz); IR (solid): 3336, 2912, 2154, 1642, 1454, 1344, 1082, 642, 483 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₆H₄₉O₁₆ [M+H]⁺ m/z = 617.3021, found: 617.3027.



Octyl 3-O-(3-O-(3-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl-β-D-gluco

A solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-14**) (15.6 mg, 10.1 µmol, 1.00 eq.) in MeOH (5.00 mL) and ethyl acetate (5.00 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with flow rate 1 mL/min at 60 °C under 60 bar. After hydrogenation, the residue in MeOH (10.0 mL) and acetic acid (0.100 mL) was introduced at the inlet tube to fill the hydrogenation reactor (H-CubeTM) with the same condition. After hydrogenation, the reaction mixture in the hydrogenation reactor was collected and azeotroped with toluene. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl 3-O-(3-O-(3-O- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)

 $[\alpha]_{D}^{25}$ -21.6 ° (*c* 0.245, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 45 °C): δ 4.77 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.74 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.72 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.45 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 3.85-3.92 (m, 5H, H-A3, H-A6b, H-B6b, H-C6b, H-D6b), 3.63-3.76 (m, 8H, H-A4, H-B4, H-C4, H-D4, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a), 3.32-3.56 (m, 13H, H-A2, H-B2, H-C2, H-D2, H-B3, H-C3, H-D3, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, OCH₂), 1.60 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.26-1.35 (m, 10H, aliphatic), 0.84 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 6.8 Hz); IR (solid): 3390, 2926, 2554, 1642, 1464, 1078, 1036, 856, 638, 494 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₂H₅₉O₂₁ [M+H]⁺ m/z = 779.3549, found: 779.3554.



Octyl 3-O-(3-O-(3-O-(3-O-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranoside (3-67)

A solution of octyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl

To a stirred solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added a catalytic amount of sodium methoxide at room temperature. After being stirred at the same temperature for 4 h, the reaction mixture was neutralized with DOWEX 50W-4X at room temperature. After being stirred for 5 min, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by reverse-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with MeOH:water 40:60 to give octyl $3-O-(3-O-(3-O-(3-O-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-$

 $[\alpha]_{D}^{25}$ -21.3 ° (*c* 0.115, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, 50 °C): δ 4.76 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.74 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.72 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.74 (d, 1H, H-B1 or H-C1 or H-D1 or H-E1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.44 (d, 1H, H-A1, $J_{A1,A2} = 7.7$ Hz), 3.85-3.91 (m, 6H, H-A3, H-A6b, H-B6b, H-C6b, H-D6b, H-E6b), 3.62-3.78 (m, 10H, H-A4, H-B4, H-C4, H-D4, H-E4, H-A6a, H-B6a, H-C6a, H-D6a, H-E6a), 3.31-3.55 (m, 16H, H-A2, H-B2, H-C2, H-D2, H-E2, H-B3, H-C3, H-D3, H-E3, H-A5, H-B5, H-C5, H-D5, H-E5, OCH₂), 1.60 (br-t, 2H, OCH₂CH₂), 1.26-1.34 (m, 10H, aliphatic), 0.84 (t, 3H, CH₂CH₃, J = 7.2 Hz); IR (solid): 3437, 2913, 2086, 1635, 1367, 1079, 896, 687, 517 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₈H₆₉O₂₆ [M+H]⁺ m/z = 941.4077, found: 941.4076.



Phenylthio 4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranoside (3-48)

To a stirred solution of phenylthio 4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-52**) (10.0 g, 27.8 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (100 mL) was added EDCI-HCl (12.8 g, 66.6 mmol, 2.40 eq.), levulinic acid (6.82 mL, 66.6 mmol, 2.40 eq.) and a catalytic amount of DMAP (340 mg, 2.78 mmol, 0.100 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 6 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystalized to give phenylthio 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-48**) (14.6 g, 26.2 mmol, 94%).

[α]_D²⁵ -39.9 (c = 1.05, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.55 (m, 10H, aromatic), 5.49 (s, 1H, benzylidene), 5.36 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz, $J_{3,4}$ = 9.7 Hz), 5.03 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2}$ = 10.1 Hz, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz), 4.78 (d, 1H, H-1, $J_{1,2}$ = 10.1 Hz), 4.39 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a}$ = 4.8 Hz, J_{gem} = 10.6 Hz), 3.79 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b}$ = 10.2 Hz, J_{gem} = 10.6 Hz), 3.65 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4}$ = 9.2 Hz, $J_{4,5}$ = 10.2 Hz), 3.57 (ddd, 1H, H-5, $J_{5,4}$ = 9.7 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.8 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.2 Hz), 2.49-2.88 (m, 8H, Lev), 2.19 (s, 3H, Lev), 2.15 (s, 3H, Lev) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.3 x 2, 172.0, 136.8, 133.1, 131.9, 129.2, 129.1, 128.5, 128.3, 126.3, 101.5, 86.9, 78.3, 72.8, 70.8, 70.6, 68.5, 37.9 x 2, 29.9, 29.8, 28.1, 28.0; IR (solid): 2980, 2036, 1717, 1586, 1411, 1148, 972, 690, 516 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₉H₃₃O₉S [M+H]⁺ m/z = 557.1845, found: 557.1843.



4,6-*O*-Benzyliden-2,3-*O*-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl bromide (3-49)

A mixture of phenylthio 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-48**) (4.99 g, 8.96 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (4.48 g) in dry CH₂Cl₂ (45.0 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to 0 °C. Iodinemonobromide (1.0 M solution in CH₂Cl₂, 13.4 mL, 13.4 mmol, 1.50 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at same temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue (**3-49**) was used for the next reaction without

further purification.

Phenylthio

$4, 6-\textit{O}-benzylidene-3-\textit{O}-(4, 6-\textit{O}-benzylidene-2, 3-di-\textit{O}-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranoside (3-53)$

A mixture of 4,6-*O*-benzylidene-2,3-*O*-levurinoyl- β -D-glucopyranosyl bromide (**3-49**) (8.96 mmol, 1.00 eq.), phenylthio 4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**3-52**) (3.39 g, 9.41 mmol, 1.05 eq.) (azeotropycally dried three times with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (9.00 g) in dry CH₂Cl₂ (72.0 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -10 °C. To the mixture was added AgOTf (2.76 g, 10.8 mmol, 1.20 eq.) in dry toluene (18.0 mL). After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The filtrate was chromatographed on silica gel with 80:20 toluene:ethyl acetate and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give phenylthio 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-*O*-levurinoyl- β -D -glucopyranoside (**3-53**) (3.10 g, 3.84 mmol, 2 steps 41%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56-7.58 (m, 2H, aromatic), 7.48 (d, 2H, aromatic, J = 6.8 Hz), 7.30-7.42 (m, 11H, aromatic), 5.53 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.32 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 5.06 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.84 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.67 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.34-4.38 (m, 2H, A-6a, OH), 4.15 (dd, 1H, B-6a, $J_{5,6a} = 10.6$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.55-3.81 (m, 6H, A-2, A-3, A-4, B-4, A-6b, B-6b), 3.38-3.50 (m, 2H, A-5, B-5), 2.44-2.98 (m, 8H, Lev), 2.23 (s, 3H, Lev), 2.12 (s, 3H, Lev); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 208.8, 206.3, 171.7 x 2, 137.3, 136.9, 133.0, 132.2, 129.1, 129.0, 128.2, 128.1 x 2, 126.2, 126.0, 102.9, 101.4, 101.0, 89.0, 84.6, 79.0, 78.2, 72.8, 72.0, 71.8, 70.7, 68.6, 66.2, 37.7, 30.1, 29.8, 27.9, 27.6; IR (solid): 3380, 2921, 2857, 2000, 1740, 1716, 1452, 1373, 1261, 1072, 1027, 747, 699, 554 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₂H₄₇O₁₄S [M+H]⁺ m/z = 807.2687, found: 807.2672.



$\label{eq:2-0-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D$-glucopyranosyl})-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D}-glucopyranosylba-byran$

To a stirred solution of phenylthio 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-53**) (3.03 g, 3.75 mmol, 1.00 eq.) in dry CH₂Cl₂ (19.0 mL) was added benzoyl chloride (1.32 mL, 11.2 mmol, 3.00 eq.), TMEDA (3.24 mL, 22.5 mmol, 6.00 eq.) and a catalytic amount of DMAP (45.8 mg, 0.375 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 12 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 85:15 toluene:ethyl acetate to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-46**) (2.77 g, 3.05 mmol, 81%).

 $[\alpha]_{D}^{24} = -23.1$ (c = 0.955, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.64 (dd, 1H, aromatic, J = 7.2 Hz, J = 7.7 Hz), 7.48-7.54 (m, 4H, aromatic), 7.26-7.41 (m, 13H, aromatic), 5.56 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 5.30 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 10.1$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz), 5.07 (dd, 1H, B3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 4.99 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.85 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 10.1$ Hz), 4.70 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.39 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.3$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.16-4.23 (m, 2H, A-3, B-6a), 3.83 (dd, 1H, A-6b). $J_{5,6b} = 10.1$ Hz, $J_{gem} 10.1$ Hz). 3.75 (dd, 1H, A-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.54-3.68 (m, 3H, B-4, A-5, B-6b), 3.34 (ddd, 1H, B-5, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 2.34-2.74 (m, 8H, Lev), 2.08 (s, 6H, Lev); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5, 206.4, 171.8, 171.4, 165.0, 137.2, 136.9, 133.7, 132.8, 132.4, 129.9, 129.6, 129.3, 129.0, 128.8, 128.3, 128.2, 126.2, 126.1, 101.3, 101.2, 100.9, 87.5, 79.6, 78.7, 78.3, 72.4, 71.9, 71.7, 71.0, 68.6, 66.2, 37.9, 37.8, 29.7, 27.9, 27.5; IR (neat) 2873, 1719, 1601, 1377, 1268, 1155, 1026, 916, 748, 699, 543 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{49}H_{51}O_{15}S$ [M+H]⁺ m/z = 911.2949, found: 911.2919.



Phenylthio

 $2\text{-}O\text{-}benzoyl\text{-}4, 6\text{-}O\text{-}benzylidene\text{-}3\text{-}O\text{-}(4, 6\text{-}O\text{-}benzylidene\text{-}\beta\text{-}D\text{-}glucopyranosyl)\text{-}\beta\text{-}D\text{-}glucopyranoside}$

(3-38)

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-46**) (932 mg, 1.02 mmol, 1.00 eq.) in THF (10.0 mL) was added acetic acid (2.00 mL) and hydrazine monohydrate (1.00 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 90:10 CHCl₃:MeOH and recrystalized to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-38**) (633 mg, 0.886 mmol, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.62 (dd, 1H, aromatic, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz, J = 7.2 Hz), 7.32-7.51 (m, 17H, aromatic), 5.60 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.27 (dd, 1H, A2, $J_{1,2} = 10.1$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.93 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 10.1$ Hz), 4.42-4.46 (m, 2H, B-1, A-6a), 4.19 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.85 (dd, 1H, A-6b, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.72-3.80 (m, 2H, A-4, B-6a), 3.57-3,65 (m, 2H, B-3, A-5), 3.38-3.46 (m, 3H, B-2, B-4, B-6b), 3.26 (ddd, 1H, B-5, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 2.91 (br-s, 1H, OH), 2.50 (br-s, 1H, OH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.8, 137.0, 136.6, 133.7, 133.4, 131.7, 130.0, 129.8, 129.6, 129.3, 129.1, 128.7, 128.6, 128.4 x 2, 126.4, 126.2, 103.1, 101.9, 101.7, 87.0, 80.3, 79.3, 79.0, 73.4, 72.8, 72.2, 70.9, 68.6, 68.4, 66.7; IR (solid): 3480, 2890, 2371, 1977, 1719, 1452, 1265, 1068, 709, 541 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₉H₃₉O₁₁S [M+NH₄]⁺ m/z = 715.2213, found: 715.2216.



2-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-g lucopyranosyl bromide (3-37)

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-46**) (940 mg, 1.03 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (1.03 g) in dry CH₂Cl₂ (10.3 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to 0 °C. Iodinemonobromide (1.0 M solution in CH₂Cl₂, 1.55 mL, 1.55 mmol, 1.50 eq.) was

Experimental Section

added to the reaction mixture. After being stirred at same temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 99:1 CHCl₃:NEt₃ and used for the next reaction without further purification.



 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-b-glucopyrano$

mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-А glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-32) (610 mg, 0.853 mmol, 1.00 eq.), 2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl bromide (3-31) (1.02 mmol, 1.20 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (1.70 g) in dry CH₂Cl₂ (13.8 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -10 °C. To the mixture was added AgOTf (318 mg, 1.23 mmol, 1.44 eq.) in dry toluene (3.40 mL). After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The filtrate was chromatographed on silica gel with 95:5 toluene:acetone to give phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidenabenzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-B-D-glucopyranosyl)-B-D-glucopyranosyl pyranoside (3-33) (984 mg, 0.649 mmol, 76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.18-8-04 (m, 35H, aromatic), 5.55 (s, 1H, benzylidene), 5.42 (s, 2H, benzylidene), 5.26 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.6$ Hz), 5.21 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 5.10 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2} = 5.5$ Hz, $J_{2,3} = 4.4$ Hz), 5.06 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 5.01 (d, 1H, C-1, $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 4.88 (s, 1H, benzylidene), 4.87 (br-d, 2H, A-1, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.83 (s, 1H, benzylidene), 3.22-4.43 (m, 19H, A-3, A-4, A-5, A-6a, A-6b, B-3, B-1, B-2, B-3, B-4, B-5, B-6a, B-6b, C-4, C-5, C-6a, C-6b, D-4, D-5, D-6a, D-6b), 3.06 (d, 1H, OH, J = 3.4 Hz), 2.51-2.79 (m, 8H, Lev), 2.13 (s, 6H, Lev); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 207.1, 206.4, 171.9, 171.3, 165.6, 165.1, 137.9, 137.4, 137.2, 136.9, 136.6, 133.6, 133.5, 131.2, 131.9, 129.9, 129.8 x 2, 129.5, 129.4 x 2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3 x 2, 128.0, 126.4, 126.2, 126.1, 126.0, 125.4, 103.1, 101.9, 101.6, 101.5, 101.4, 100.5, 100.4, 99.1, 86.9, 79.1, 78.9 x 2, 78.8, 78.4, 77.7, 77.6, 74.1 x 2, 73.9, 72.1, 71.9, 70.6, 68.7, 68.6, 68.5 x 2, 66.8, 66.3, 65.4, 37.9, 29.8 x 3, 28.0, 27.8, 21.5; IR (solid): 3497, 2869, 2429, 1967, 1734, 1378, 1267, 1177, 1101, 971, 747, 553 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₈₂H₈₃O₂₆S [M+H]⁺ m/z = 1515.4893, found: 1515.4910.



$\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-b-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-b-glucopyranosyl$

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.13-8.07 (m, 35H, aromatic), 5.52 (s, 1H, benzylidene), 5.38 (s, 1H, benzylidene), 5.23 (s, 1H, benzylidene), 5.21 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, $J_{2,3} = 7.7$ Hz), 5.12 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 4.99 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.91 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 6.8$ Hz), 4.89 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.2$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.81 (dd, 1H, H-2', $J_{1,2} = 4.8$ Hz, $J_{2,3} = 7.3$ Hz), 4.79 (s, 1H, benzylidene), 4.75 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.71 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.64 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 3.26-4.37 (m, 19H, A-3, A-4, A-5, A-6a, A-6b, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-3', H-4', H-5', H-6a', H-6b', D-4, D-5, D-6a, D-6b), 2.40-2.71 (m, 8H, Lev), 2.09 (s, 3H, Lev), 2.05 (s, 3H, Lev), 1.73 (s, 3H, Ac); 1³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4, 206.3, 171.7, 171.3, 169.0, 164.8, 164.7, 137.2, 137.1, 136.8, 133.8, 133.4, 133.0, 132.2, 129.8, 128.9, 128.1 x 2, 128.0, 126.1, 126.0, 101.6, 101.2 x 2, 100.8 x 2, 98.6, 98.1, 87.4, 78.5, 78.4, 78.3, 77.9, 76.2, 76.0, 73.7, 73.0, 72.2, 71.7, 71.6, 70.8, 68.6, 68.5, 37.8, 37.7, 29.7, 29.6, 27.9, 27.5, 20.4; IR (neat) 2871, 1753, 1373, 1266, 1096, 917, 750, 699 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₈₄H₈₅O₂₇S [M+H]⁺ m/z = 1557.4999, found: 1557.5037.



 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl$

To a stirred solution of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopy yranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-40**) (165 mg, 0.106 mmol, 1.00 eq.) in THF (2.00 mL) was added acetic acid (1.00 mL) and hydrazine monohydrate (0.500 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 99:1 CHCl₃:MeOH to give phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-gluco

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.21-8.08 (m, 35H, aromatic), 5.51 (s, 1H, benzylidene), 5.45 (s, 1H, benzylidene), 5.30 (s, 1H, benzylidene), 5.26 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, $J_{2,3} = 6.3$ Hz), 5.07 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 6.8$ Hz), 5.01 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.86 (dd, 1H, H-2', $J_{1,2} = 4.8$ Hz, $J_{2,3} = 4.8$ Hz), 4.78 (s, 1H, benzylidene), 4.77 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.70 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 4.56 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 3.30-4.35 (m, 21H, A-3, A-4, A-5, A-6a, A-6b, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-3', H-4', H-5', H-6a', H-6b', D-2, D-3, D-4, D-5, D-6a, D-6b), 3.05 (s, 1H, OH), 2.58 (s, 1H, OH), 1.76 (s, 3H, Ac); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 165.5, 165.0, 137.3, 137.2, 137.1, 136.8, 134.0, 133.5, 132.6, 130.0, 129.9, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3 x 2, 129.2, 129.0, 128.9, 128.7, 128.4 x 2, 128.3, 128.2, 126.5, 126.4, 126.3, 126.2, 102.5, 101.9 x 3, 101.5, 101.2, 98.6, 98.1, 87.4, 80.4, 78.9, 78.3, 78.2, 78.1, 76.7, 76.6, 73.7, 73.4, 73.2, 72.9, 72.1, 71.0, 68.8, 68.7, 68.5 x 2. 66.7. 65.8. 65.4. 20.5; IR (solid): 3513, 2870, 1961, 1717, 1452, 1265, 1092, 961, 749, 712, 541 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₇₄H₇₃O₂₃S [M+H]⁺ m/z = 1361.4263, found: 1361.4270.



 $\label{eq:2-0-Benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl bromide (3-43)$

A mixture of phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O* -(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**3-40**) (174 mg, 0.112 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (223 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.20 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to 0 °C. Iodinemonobromide (1.0 M solution in CH₂Cl₂, 0.220 mL, 0.220 mmol, 2.00 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at same temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 90:9:1 toluene:acetone:NEt₃ and used for the next reaction without further purification.



Phenylthio

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0$

A mixture of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-

 $O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D$ -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-38) (130 mg, 0.0956 mmol, 1.00 eq.), 2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylideneene-2,3-O-levurinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl bromide (3-43) (0.112 mmol, 1.17 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (191 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.53 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -10 °C. To the mixture was added AgOTf (35.4 mg, 0.138 mmol, 1.44 eq.) in dry toluene (0.380 mL). After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated in vacuo. The filtrate was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-0))))))))) zylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene -2,3-O-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-54) (112 mg, 0.0400 mmol, 42%)

[α]_D²³ = -16.6 (c = 0.990, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃) δ 7.19-8.03 (m, 65H), 3.22-5.49 (m, 56H), 2.74 (d, 1H, OH, J= 2.4 Hz), 2.36-2.71 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.78 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.9, 171.4, 169.6, 169.0, 165.5, 165.2, 165.0, 164.8, 137.4 x 4, 137.2, 137.0, 136.9, 134.0, 133.9, 133.6, 132.9, 132.4, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, x 3, 129.4, 129.3 x 2, 129.2, 129.1 x 2, 128.9, 128.7, 128.3 x 2, 128.2 x 2, 128.1, 126.4, 126.3 x 2, 126.2, 126.1, 126.0, 102.9, 101.7, 101.6, 101.4, 101.3, 101.1, 101.0, 100.9, 100.6, 99.8, 99.0 x 2, 98.6, 98.4, 87.6, 78.8, 78.6, 78.5, 78.4 x 2, 78.0, 76.6, 76.4, 76.3, 74.5, 74.4, 74.3, 73.9, 73.7, 73.1, 72.7, 72.2, 71.8 x 2, 70.9, 68.8, 68.7, 68.6 x 2, 68.5, 66.8, 66.2, 66.1, 65.9, 65.8, 65.7 x 2, 38.0 x 2, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 20.8, 20.5; IR (solid): 3566, 2875, 1730, 1452, 1374, 1262, 1071, 751, 711, 551 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₅₂H₁₅₀O₅₀S [M+H]⁺ m/z = 2807.8994, found: 2807.8999.



Phenylthio

 $\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano} \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyrano) \\ lidene-3-0-($

$syl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranoside (3-41)$

To a stirred solution of phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzyl idene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2, 3-O-levurinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopy lucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (3-54) (92.4 mg, 0.0329 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (0.700 mL) was added acetic anhydride (30.8 µL, 0.329 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (2.00 mg, 0.0165 mmol, 0.500 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone to give phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzyli ylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-O-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyra nosyl)-\beta-D-glucopyranosyl noside (3-41) (86.5 mg, 0.0303 mmol, 92%).

 $[α]_D^{26} = -14.4$ (c = 0.965, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃) δ 7.15-8.04 (m, 65H), 3.17-5.51 (m, 56H), 2.35-2.71 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.76 (s, 6H), 1.74 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2. 171.8, 171.4, 169.1, 169.1, 164.9, 164.8 x 2, 137.4 x 2, 137.2, 136.9, 134.0, 134.0, 133.9 x 3, 133.5, 133.1, 132.3, 129.9 x 3, 129.7, 129.6, 129.5 x 2, 129.3, 129.1 x 2, 129.0 x 2, 128.9 x 2, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 126.5, 126.4 x 2, 126.2 x 3, 126.1, 101.9, 101.6, 101.4, 101.3, 101.0, 100.9, 100.6, 98.5 x 2, 98.3, 97.9, 97.8, 87.6, 78.6, 78.5, 78.4, 78.2, 78.0, 76.1 x 2, 76.0, 75.7, 75.4 x 2, 74.2 x 2, 73.8, 73.2, 72.3, 72.1, 71.8 x 2, 70.9, 68.7, 68.6, 66.2, 66.1, 66.0, 65.6 x 2, 65.5, 38.0, 37.7, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 20.6, 20.5; IR (solid): 2874, 2005, 1751, 1601, 1439, 1216, 965, 710, 696, 558 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₅₄H₁₅₃O₅₁S [M+H]⁺ *m/z* = 2849.9099, found: 2849.9001.



$2-O-benzyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(4, 6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranoside (3-47)$

A mixture of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**3-51**) (4.98 g, 13.4 mmol, 1.00 eq.), phenylthio 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranoside (**3-48**) (8.18 g, 14.7 mmol, 1.10 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (6.70 g) in dry CH₂Cl₂ (66.9 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -30 °C. *N*-iodosuccinimide (3.97 g, 17.7 mmol, 1.32 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (0.12 mL, 1.34 mmol, 0.100 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 92:8 toluene:acetone and used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of part of residue (12.0 mmol) in THF (30.0 mL) and MeOH (30.0 mL) was added a catalytic amount of NaOMe (64.7 mg, 1.20 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 60:40 toluene:ethyl acetate to give methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene $-3-O-(4,6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranoside ($ **3-47**) (5.56 g, 8.93 mmol, 2 steps 66%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.48-7.49 (m, 4H, aromatic), 7.33-7.39 (m, 11H, aromatic), 5.55 (s, 1H, benzylidene), 5.51 (s, 1H, benzylidene), 4.75 (d, 1H, PhC*H*₂, *J*_{gem} = 12.1 Hz), 4.64-4.68 (m, 2H, A-1, PhC*H*₂), 4.60 (d, 1H, B-1, *J*_{1,2} = 7.7 Hz), 4.17-4.28 (m, 3H, A-3, A-6a, B-6a), 3.75-3.83 (m, 3H, B-3, A-5 or B-5, A-6b or B-6b), 3.70 (dd, 1H, A-6b or B-6b, *J*_{5,6b} = 10.1 Hz, *J*_{gem} = 10.1 Hz), 3.61-3.65 (m, 2H, A-2, OH), 3.52-3.59 (m, 3H, B-2, A-4, B-4), 3.42 (ddd, 1H, A-5 or B-5, *J*_{4,5} = 9.7 Hz, *J*_{5,6a} = 4.8 Hz, *J*_{5,6b} = 9.7 Hz), 3.34 (s, 3H, OMe), 2.73 (d, 1H, OH, *J*_{B-3,OH} = 1.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 137.2, 137.0, 136.9, 129.3, 129.1, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 126.4, 125.9, 105.6, 102.0, 101.0, 98.2, 80.5, 80.3, 79.8, 78.6, 75.8, 73.1, 73.0, 68.8, 68.7, 66.8, 62.6, 55.4; IR (solid): 3485, 2883, 2158, 1613, 1452, 1373, 1284, 1179, 1076, 971, 745, 694, 552 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₄H₃₉O₁₁ [M+H]⁺ *m/z* = 623.2492, found: 623.2471.

第3章



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranoside (3-55)$

2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-А mixture of methyl (**3-47**) (419 mg, glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside 0.673 mmol, eq.), 1.20 phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-gluc opyranoside (3-46) (511 mg, 0.560 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (1.12 g) in dry CH₂Cl₂ (11.2 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -30 °C. N-iodosuccinimide (151 mg, 0.673 mmol, 1.20 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (0.150 mL, 0.112 mmol, 0.300 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO3 and 10% aq. Na2S2O3, and brine, dried over MgSO4, filtered, and The residue was chromatographed on silica gel with 70:30 toluene:ethyl acetae and evaporated in vacuo. further purified by permeation chromatography (GPC) methyl gel to give 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-0-benzylidena-3-0-0 enzylidene-2,3-di-O-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucop yranoside (3-55) (546 mg, 0.384 mmol, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.23-7.53 (m, 28H, aromatic), 5.53 (s, 1H, benzylidene), 5.50 (s, 1H, benzylidene), 5.39 (s, 1H, benzylidene), 5.28 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, $J_{2,3} = 6.8$ Hz), 5.21 (s, 1H, benzylidene), 5.15 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 5.07 (d, 1H, C-1, $J_{1,2} = 6.3$ Hz), 5.03 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.78 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.52 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.38-4.42 (m, 2H, A-1, PhC H_2), 4.30 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 12.6$ Hz), 4.18-4.26 (m, 4H, A-6a, B-6a, C-6a, D-6a), 4.06-4.11 (m, 2H, B-3, C-3), 3.94 (dd, 1H, C-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.81 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.34-3.77 (m, 14H, A-2, B-2, A-4, B-4, D-4, A-5, B-5, C-5, D-5, A-6b, B-6b,

C-6b, D-6b, OH), 3.26 (s, 3H, OMe), 2.40-2.78 (m, 8H, Lev), 2.09 (s, 6H, Lev); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.6, 206.4, 171.8, 171.4, 165.2, 137.4, 137.3, 137.2, 137.1, 136.9, 133.4, 129.8, 129.7, 129.2, 129.0 x 2, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 126.3, 126.2, 126.1, 125.9, 105.5, 101.5, 101.4, 101.2, 100.9, 100.8 x 2, 98.4, 80.2, 79.9, 79.7, 79.0, 78.9, 78.7, 78.4, 78.2, 75.8, 74.4, 73.2, 71.8, 68.8 x 2, 68.7, 68.6, 67.0, 66.2, 66.0, 62.5, 55.3, 37.9, 37.8, 29.8, 28.0, 27.6; IR (solid): 3525, 2916, 2158, 2012, 1716, 1452, 1374, 1269, 1087, 932, 772, 695, 551 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₇₇H₈₃O₂₆ [M+H]⁺ *m/z* = 1423.5173, found: 1423.5195.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylide$

To a stirred solution of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**3-55**) (519 mg, 0.364 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (1.80 mL) was added acetic anhydride (0.341 mL, 3.64 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (4.40 mg, 0.0364 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene:acetone to give methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopy/anosyl)- β -D-glucopy/anosyl)- β -D-glucopy/anosyl)- β -D-glucopy/anosyl)- β -D-glucopy/anosyl)- β -D-

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.17-7.62 (m, 28H, aromatic), 5.51 (s, 1H, benzylidene), 5.37 (s, 1H, benzylidene), 5.33 (s, 1H, benzylidene), 5.29 (dd, 1H, H-2', $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 7.7$ Hz), 5.09 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 4.97-5.01 (m, 2H, H-1', D-2), 4.96 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 4.88 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 4.8$ Hz, $J_{2,3} = 4.3$ Hz), 4.72 (s, 1H, benzylidene), 4.70 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.39 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 3.9$ Hz), 4.37 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.30 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 12.1$

Hz), 4.20-4.25 (m, 3H, A-6a, D-6a, H-6a'), 4.13 (dd, 1H, H-3', $J_{2,3} = 7.7$ Hz, $J_{3,4} = 8.2$ Hz), 4.00-4.09 (m, 3H, A-3, H-4, H-6a), 3.82-3.86 (m, 2H, H-3, H-4'), 3.59-3.75 (m, 5H, D-4, A-5, A-6b, D-6b, H-6b'), 3.46-3.53 (m, 2H, H-5', H-6b), 3.33-3.45 (m, 2H, D-5, H-5), 3.31 (s, 3H, OMe), 3.27 (dd, 1H, A-4, $J_{3,4} = 9.4$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 2.93 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 2.35-2.75 (m, 8H, Lev), 2.09 (s, 3H, Lev), 2.07 (s, 3H, Lev), 1.93 (s, 3H, Ac); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) & 206.5, 138.0, 137.5 x 2, 137.4, 136.9, 133.5, 130.0, 129.9, 129.4, 129.1 x 2, 128.9 x 2, 128.5, 128.4, 128.2 x 2, 128.1, 128.0, 126.5, 126.2, 126.1, 102.1, 101.4, 101.0, 100.8, 100.7, 99.0, 98.7, 98.4, 80.5, 79.9, 78.7, 78.6, 78.4, 78.2, 74.1, 73.8, 73.2, 73.1, 71.9, 71.8, 69.1, 68.8, 68.6 x 2, 66.4, 66.2, 65.3, 62.4, 55.3, 37.9, 37.9, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 21.0; IR (solid): 2931, 2006, 1745, 1372, 1230, 1044, 750, 698, 557 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₇₉H₈₅O₂₇ [M+H]⁺ *m/z* = 1465.5337, found: 1465.5308.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylide$

To a stirred solution of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene -3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**3-56**) (453 mg, 0.309 mmol, 1.00 eq.) in THF (4.00 mL) was added acetic acid (2.00 mL) and hydrazine monohydrate (1.00 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 98:2 CHCl₃:MeOH to give methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2 -*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyrano osyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**3-45**) (405 mg, 0.319 mmol, quant.).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.23-7.59 (m, 28H, aromatic), 5.52 (s, 1H, benzylidene), 5.43 (s, 1H, benzylidene), 5.31-5.34 (m, 2H, benzylidene, H-2), 5.16 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 6.3$
Hz), 5.01 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 4.8$ Hz), 4.92 (dd, 1H, H-2', $J_{1,2} = 4.8$ Hz, $J_{2,3} = 4.3$ Hz), 4.76 (s, 1H, benzylidene), 4.59 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.40-4.43 (m, 2H, A-1, PhCH₂), 4.33 (d, 1H, PhCH₂, $J_{gem} = 12.1$), 4.19-4.22 (m, 2H, A-6a, H-6a), 4.01-4.15 (m, 4H, A-3, H-3, H-4', H-6a'), 3.86-3.96 (m, 3H, H-3', H-4, D-6a), 3.65-3.78 (m, 4H, D-3, A-5, A-6b, H-6b), 3.58 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 10.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 3.31-3.53 (m, 10H, D-2, A-4, D-4, D-5, D-5', H-5', D-6b, D-6b', OMe), 3.12 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 3.05 (d, 1H, OH, $J_{D-2,OH} = 2.9$ Hz), 2.58 (d, 1H, OH, $J_{D-3,OH} = 1.5$ Hz), 1.97 (s. 3H, Ac); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.8, 165.3, 138.0, 137.5, 137.4, 137.0, 136.8, 133.6, 130.1, 129.8, 129.5, 129.4, 129.3, 129.1, 128.8, 128.5, 128.4 x 2, 128.3, 128.2, 128.1, 126.6, 126.4, 126.3, 126.2, 102.4, 102.2, 101.9, 101.5, 101.0, 98.8, 98.6, 98.5, 80.4, 80.3, 79.8, 78.8, 78.4, 78.2, 77.6, 74.2, 73.7, 73.5, 73.3, 72.9 x 2, 69.1, 68.8 x 2, 68.5, 66.7, 65.9, 65.2, 62.5, 55.3, 20.9; IR (solid): 3590, 2923, 2005, 1748, 1703, 1452, 1374, 1178, 974, 744, 695, 558 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₆₉H₇₃O₂₃ [M+H]⁺ m/z = 1269.4543, found: 1269.4543.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-2,3-0-levurinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucop$

A mixture of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-α-D-glucopyranoside (**3-45**) (202 mg, 0.159 mmol, 1.00 eq.), phenylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D mmol, 0.500 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene:acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2,3-*O*-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)

 $\left[\alpha\right]_{\text{D}}^{23} = -24.9 \text{ (c} = 1.54, \text{ CHCl}_3\right); ^{1}\text{H NMR (400 MHz, CDCl}_3\right) \delta 7.96-8.08 \text{ (m, 6H, aromatic)}, 7.14-7.60 \text{ (m, 54H, aromatic)}, 5.47 \text{ (s, 1H)}, 5.38 \text{ (s, 1H)}, 5.29 \text{ (s, 1H)}, 5.18-5.25 \text{ (m, 2H)}, 5.16 \text{ (s, 1H)}, 5.12 \text{ (dd, 1H, } J = 9.2 \text{ Hz}, J = 9.7 \text{ Hz}\right), 5.07-5.09 \text{ (m, 2H)}, 4.97-5.02 \text{ (m, 3H)}, 4.80-4.94 \text{ (m, 6H)}, 4.76 \text{ (d, 1H, } J = 6.3 \text{ Hz}\right), 4.71 \text{ (d, 1H, } J = 7.7 \text{ Hz}\right), 4.41-4.44 \text{ (m, 2H)}, 4.36 \text{ (d, 1H, } J = 3.4 \text{ Hz}\right), 4.32 \text{ (d, 1H, } J = 12.1 \text{ Hz}\right), 3.25-4.24 \text{ (m, 43H)}, 3.07 \text{ (dd, 1H, } J = 3.4 \text{ Hz}, J = 9.2 \text{ Hz}\right), 2.72 \text{ (d, 1H, OH (D-2) } J = 1.9 \text{ Hz}\right), 2.31-2.71 \text{ (m, 8H)}, 2.09 \text{ (s, 3H)}, 2.01 \text{ (s, 3H)}, 1.97 \text{ (s, 3H)}, 1.81 \text{ (s, 3H)}; ^{13}\text{C NMR} \text{ (100 MHz, CDCl}_3\right) \delta 206.5, 206.4, 171.9, 171.5, 171.4, 169.7, 168.9, 165.4, 165.1, 164.8, 137.9, 137.4 \text{ x } 2, 137.3, 136.9, 133.8, 133.6, 130.1, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.2 \text{ x } 2, 129.1, 129.0 \text{ x } 2, 128.9, 128.7 \text{ x } 2, 128.6, 128.4, 128.3 \text{ x } 2, 128.2 \text{ x } 2, 128.1 \text{ x } 2, 126.5, 126.4, 126.3 \text{ x } 2, 126.2 \text{ x } 2, 126.4, 120.3, 102.2, 101.7 \text{ x } 2, 101.4, 101.3, 101.1, 100.9, 100.8, 100.6, 99.2 \text{ x } 2, 98.9 \text{ x } 2, 98.8, 98.4, 80.4, 79.9, 78.8, 78.7, 78.6, 78.5 \text{ x } 2, 78.4 \text{ x } 2, 78.3, 77.8 \text{ x } 2, 76.4, 76.3, 76.2, 74.4, 74.2, 73.9 \text{ x } 2, 73.8, 73.3, 73.0, 72.7, 71.8 \text{ x } 2, 68.8, 68.7, 68.5 \text{ x } 2, 66.2, 66.1 \text{ x } 2, 65.9, 65.6, 65.3, 62.4, 62.3, 59.6, 55.3, 38.1, 37.8, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 21.5, 21.0, 20.8; IR (solid): 3568, 2872, 1989, 1725, 1452, 1374, 1263, 1220, 1084, 963, 766, 699, 550 \text{ cm}^{-1}; \text{HRMS} (ESI-TOF) \text{ calcd for } C_{147}\text{H}_{151}\text{O}_{50} \text{ [M+H]}^+ m/z = 2715.9273, \text{ found: } 2715.9207.$



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylidena-3-0-(2-0-benzylide$

$l)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranoside (3-58)$

To a stirred solution of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene -3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-O-levurin oyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl yl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-57) (316 mg, 0.116 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (2.30 mL) was added acetic anhydride (0.110 mL, 1.16 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (7.10 mg, 0.0581 mmol, 0.500 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene:acetone to give methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzy zylidene-2,3-O-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyrano syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-58) (322 mg, 0.117 mmol, quant.).

 $[\alpha]_{D}^{23} = -18.5$ (c = 1.11, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00-8.05 (m, 6H), 7.16-7.59 (m, 54H), 5.52 s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.19-5.23 (m, 2H), 5.17 (s, 1H), 5.13 (dd, 1H, J = 9.2 Hz, J = 9.7 Hz), 5.00 (dd, 1H, J = 7.7 Hz, J = 9.3 Hz), 4.96 (d, 1H, J = 4.8 Hz), 4.93 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 4.78-4.90 (m, 9H), 4.74 (s, 1H), 4.70 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 4.64 (br-d, 2H, J = 5.3 Hz), 4.40 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 3.4$ Hz), 4.36 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 12.1$ Hz), 2.316-4.24 (m, 42H), 2.91 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 2.35-2.71 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.75 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.9, 171.4, 169.5, 169.1, 169.0, 164.9, 164.8, 164.5, 138.0, 137.5, 137.4 x 2, 136.9, 134.1, 133.4, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0 x 2, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 x 2, 128.1, 128.0, 126.5, 126.4 x 2, 126.2 x 2, 126.1, 102.3, 101.7, 101.5, 101.4, 101.0 x 2, 100.9, 100.8, 100.7, 98.7, 98.5, 98.4, 98.3, 97.8, 80.4, 79.9, 78.6, 78.5, 78.4, 78.3, 78.2 x 2, 78.1, 76.1, 75.7, 75.5, 75.3, 74.6, 74.2, 73.8 x 2, 73.2, 72.8, 72.3, 72.0, 71.8 x 2, 69.1, 68.8, 68.7 x 2, 68.6, 66.2, 66.1 x 2, 65.6 x 2, 65.3, 62.4, 55.3, 38.0, 37.8, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 21.0, 20.7, 20.6; IR (solid): 2874, 2157, 2008, 1744, 1453, 1372, 1264, 1221, 1093, 750, 712, 698, 557 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₄₉H₁₅₃O₅₁ [M+H]⁺ m/z = 2757.9379, found: 2757.9246.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-glucopyranosyl)-\beta-D-gluc$

To a stirred solution of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene -3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzyli dene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3 -*O*-levurinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl ucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (**3-58**) (301 mg, 0.109 mmol, 1.00 eq.) in THF (2.00 mL) was added acetic acid (1.00 mL) and hydrazine monohydrate (0.500 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was 85:15 chromatographed on silica gel with toluene:acetone to give methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-0-0-(2-O-benzylidena-3-0-0-0-0-(2-O-benzylidena-3-0-0-0-0-0-0-0-0-0-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene -3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-42) (256 mg, 0.100 mmol, 92 %).

 $[\alpha]_D^{25} = -19.0$ (c = 0.910, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02-8.07 (m, 6H), 7.17-7.59 (m, 54H), 5.52 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.25-5.28 (m, 2H), 5.13 (s, 1H), 5.07 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 4.95-5.00 (m, 2H), 4.78-4.92 (m, 8H), 4.75 (s, 1H), 4.71 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 4.64 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz), 4.51 (d, 1H, 7.7 Hz), 4.36-4.40 (m, 2H), 4.31 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 3.20-4.24 (m, 44H), 3.05 (br-s, 1H), 2.92 (dd, 1H, *J* = 3.4 Hz, *J* = 9.2 Hz), 2.58 (br-s, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.76 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 169.4, 169.0, 165.6, 164.9, 164.5, 138.0, 137.5, 137.3 x 2, 137.1, 136.8, 134.1, 133.3, 129.9 x 3, 129.5, 129.3 x 2, 129.2, 129.1 x 2, 129.0, 128.9 x 2, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 x 2, 128.1 x 3, 127.9, 126.5, 126.4 x 2, 126.2 x 2, 126.1, 102.6, 102.2, 101.9, 101.7, 101.5, 101.4, 101.1, 100.9, 100.7, 98.6, 98.5, 98.3, 97.7, 80.4, 80.3, 79.9, 78.8, 78.3, 78.2, 78.0, 75.6 x 2, 75.3, 74.6, 74.2, 73.7, 73.6, 73.4, 73.1, 72.8, 72.1, 69.1,

68.8, 68.7 x 2, 68.6, 68.5, 68.4, 66.7, 66.1, 66.0, 65.9, 65.5, 65.4, 65.3, 62.3, 55.3, 29.7, 20.9, 20.6; IR (solid): 3525, 2875, 2014, 1732, 1453, 1370, 1314, 1265, 1219, 1025, 988, 751, 696, 550 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{139}H_{140}O_{47}Na [M+Na]^+ m/z = 2583.8463$, found: 2583.8455.



Methyl

 $\begin{array}{l} 2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}acetyl-4,6-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(4,6-O\mbox{-}benzylidene-2,3-di\mbox{-}O\mbox{-}(2-O\mbox{-}benzylidene-3-O\mbox{-}(4,6-O\mbox{-}benzylidene-2,3-di\mbox{-}O\mbox{-}(4,6-O\mbox{-}benzylidene-2,3-di\mbox{-}O\mbox{-}(4,6-O\mbox{-}benzylidene-2,3-di\mbox{-}O\mbox{-}levulinoyl\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}D\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}\beta\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyranosyl)\mbox{-}glucopyran$

A mixture of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-gluc opyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl opyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-42) (78.8 mg, 0.0308 mmol, 1.00 eq.), phenylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3 -O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D β-D-glucopyranoside (3-40) (57.5 mg, 0.0369 mmol, 1.20 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (123 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.20 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -30 °C. N-iodosuccinimide (10.0 mg, 0.0443 mmol, 1.44 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid $(1.40 \ \mu L, 0.0154 \ mmol, 0.500 \ eq.)$ were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 15 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and The residue was chromatographed on silica gel with 90:10 toluene: acetone and evaporated in vacuo. further purified by gel permeation chromatography (GPC) to methyl give 2-O-benzyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzy

O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levul inoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyra

 $[\alpha]_{D}^{23} = -16.5$ (c = 0.185, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99-8.04 (m, 10H), 7.16-7.59 (m, 80H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.64-5.24 (m, 30H), 4.29-4.40 (m, 4H), 3.21-4.23 (m, 63H), 2.93 (dd, 1H, J = 3.4 Hz, J = 9.2 Hz), 2.74 (d, 1H, OH, J = 1.0 Hz), 2.35-2.71 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.77 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5, 206.4, 171.8, 171.4, 169.6, 169.5, 169.0, 165.5, 165.1, 164.8, 164.8, 164.5, 138.0, 137.5, 137.4 x 2, 137.3, 137.2, 137.0, 136.9, 134.1 x 2, 134.0 x 2, 133.9, 133.6, 133.3, 130.1, 129.9 x 2, 129.8 x 2, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4 x 2, 129.3, 129.2 x 2, 129.1 x 2, 129.0, 128.9 x 2, 128.8 x 3, 128.7, 128.6 x 2, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 x 2, 128.1, 127.9, 126.5, 126.4, 126.3 x 2, 126.2, 126.1, 126.0, 102.8, 102.3, 102.2, 101.7, 101.5, 101.4, 101.3, 101.2 x 2, 101.1 x 2, 101.0, 100.9 x 2, 100.8 x 2, 100.5, 99.8, 98.8 x 2, 98.7, 98.5, 98.4 x 2, 80.4, 79.9, 78.7 x 2, 78.6 x 2, 78.5, 78.4 x 2, 78.3, 78.2 x 2, 78.0, 77.9, 77.8, 77.7 x 2, 77.6, 76.3, 76.0, 75.6, 75.4, 74.5, 74.4, 74.1, 73.9, 73.8, 73.1, 72.8, 72.2, 72.1, 71.8, 71.7, 70.6, 69.1, 68.8, 68.7 x 2, 68.5 x 2, 68.5, 66.8, 66.2 x 2, 66.1, 66.0 x 2, 65.7, 65.6, 65.3, 62.3, 55.3, 37.9, 37.7, 29.7 x 2, 28.0, 27.6, 20.9, 20.7, 20.6 x 2; IR (solid): 3525, 2883, 2149, 2014, 1863, 1718, 1601, 1423, 1269, 932, 771, 715, 551 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₁₇H₂₁₈O₇₄Na [M+Na]⁺ m/z = 4030.3193, found: 4030.3250.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2,0-benzoyl)-3-0-glucopyranosyl)-3-D-glucopyranosyl)$

To a stirred solution of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene -3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-be

dene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzyli O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyrano syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-76) (82.4 mg, 0.0205 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (0.820 mL) was added acetic anhydride (19.2 µL, 0.205 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (1.30 mg, 0.0103 mmol, 0.500 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone to give methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3dene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-B-D-glucopyranosy l)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl l)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl l)-α-D-glucopyranoside (**3-77**) (79.4 mg, 0.0196 mmol, 96%).

 $[\alpha]_{D}^{23} = -13.7$ (c = 0.220, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.04 (m, 10H), 7.18-7.59 (m, 80H), 5.52 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.10-5.25 (m, 6H), 4.63-5.02 (m, 27H), 4.40 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 4.37 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 4.31 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 3.15-4.24 (m, 62H), 2.92 (dd, 1H, *J* = 3.4 Hz, *J* = 9.2 Hz), 2.33-2.72 (m, 8H), 2.10 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.76-1.77 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.9, 171.4, 169.5, 169.1 x 2, 164.9, 164.5, 138.0, 137.5, 137.4, 136.9, 134.1, 134.0, 133.4, 130.0, 129.9 x 2, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0 x 2, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3 x 2, 128.2, 128.1 x 2, 128.0, 126.5 x 2, 126.4 x 2, 126.3, 126.2, 126.1, 102.3, 101.7, 101.6, 101.4 x 2, 101.0 x 2, 100.9, 100.8, 100.6, 98.7, 98.5, 98.4, 98.3, 97.8, 80.4, 79.9, 78.6, 78.5, 78.4, 78.3, 78.2 x 2, 78.0, 77.9, 77.8 x 2, 77.7, 76.1, 75.7 x 2, 75.4 x3, 75.3, 75.2, 74.6, 74.2 x 2, 73.8, 73.4, 73.2, 72.8, 72.4, 72.1 x 3, 71.8 x 2, 70.6, 69.1, 68.8, 68.7, 68.6, 66.2, 66.1 x 2, 65.6 x 2, 65.3, 62.4, 55.3, 38.8, 38.0, 37.7, 32.0, 29.8, 29.7, 29.4, 28.0, 27.6, 22.8, 21.0, 20.7, 20.6, 17.4, 14.2; IR (solid): 2928, 2024, 1726, 1452, 1373, 1219, 1180, 1025, 750, 710, 551 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₁₉H₂₂₀O₇₅Na[M+Na]⁺ *m*/*z* = 4072.3299, found: 4072.3208.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl)-3-0-glucopyranosyl)-3-D-glucopyranosyl)$

To a stirred solution of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzy 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidenzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O--4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylid zoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyrano syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyran side (3-77) (75.0 mg, 0.0185 mmol, 1.00 eq.) in THF (1.00 mL) was added acetic acid (0.500 mL) and hydrazine monohydrate (0.250 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, acetate. filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene: acetone to give methyl 2-O-benzyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benz ylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl pyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl pyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-78) (66.0 mg, 0.171 mmol, 92%).

 $[\alpha]_D^{23} = -17.1$ (c = 2.33, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99-8.06 (m, 10H), 7.16-7.59 (m, 80H), 5.52 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.25-5.28 (m, 2H), 5.18 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 5.07 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.64-5.60 (m, 23H), 4.51 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.40 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 4.37 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 4.30 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 3.17-4.23 (m, 64 H), 3.06 (br-s, 1H), 2.92 (dd, 1H, *J* = 3.5 Hz, *J* = 9.2 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.76-1.79 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 169.4, 169.1, 169.0, 165.6, 164.9 x 3, 164.5, 138.0, 137.5, 137.4, 137.1, 136.8, 134.1 x 2, 134.0 x 2, 133.4, 130.9, 130.0, 129.9, 129.8, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1 x 2, 129.0 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3 x 2, 128.2 x 2, 128.1 x 3, 127.9, 126.5, 129.4, 128.3 x 2, 128.2 x 2, 128.1 x 3, 127.9, 126.5, 128.4, 128.3 x 2, 128.4, 128.3 x 2, 128.4, 128.3 x 2, 128.

第3章

126.4, 126.2 x 3, 102.6, 102.2, 101.9, 101.8 x 2, 101.7, 101.7, 101.6, 101.5, 101.4 x 2, 101.1, 100.9 x 2, 100.7, 98.6, 98.5, 98.4, 98.3, 97.8 x 2, 80.4, 80.3, 79.9 x 2, 78.3, 78.2, 78.1 x 2, 77.7, 75.7, 75.5, 75.3 x 2, 75.2, 74.5, 74.2, 73.7, 73.6, 73.5, 73.1, 72.8, 72.1 x 2, 72.0, 70.6, 69.1, 68.8, 68.7 x 2, 68.6, 68.4, 66.7, 66.1, 66.0, 65.9, 65.6, 65.5, 65.4 x 2, 65.3 x 2, 55.3, 38.8, 32.0, 30.4, 29.8, 29.7 x 2, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 23.8, 23.0, 22.7, 21.0, 20.7, 20.6, 14.2, 14.1, 11.0; IR (solid): 3525, 2873, 2341, 1734, 1453, 1374, 1219, 1180, 985, 766, 711, 537 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{209}H_{208}O_{71}Na[M+Na]^+ m/z = 3876.2563$, found: 3876.2551.



Methyl

 $\begin{array}{l} 2-O\-benzyl-4,6-O\-benzylidene-3-O\-(2-O\-acetyl-4,6-O\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl-4,6-O\-benzylidene-3-O\-(2-O\-acetyl-4,6-O\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzylidene-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-\beta\-b\-benzoyliden-3-O\-(2-O\-benzoyl)\-benzoyl)\-\beta\-benzoyliden-3-O\-(2-O\-benzoy$

A mixture of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -

being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene:acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*

 $[\alpha]_D^{23} = -19.6$ (c = 0.180, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.04 (m, 14H), 7.14-7.58 (m, 106H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.63-5.23 (m, 42H), 4.29-4.40 (m, 4H), 3.15-4.24 (m, 83H), 2.93 (dd, 1H, J = 3.9 Hz, J = 9.2 Hz), 2.30-2.72 (m, 9H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.75-1.77 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.9, 171.4, 169.6, 169.5, 169.1 x 2, 165.6, 165.2 x 2, 164.9, 164.5, 138.0, 137.9, 137.5, 137.4 x 2, 137.3, 137.2, 137.1, 136.9, 134.1 x 2, 133.9, 133.7, 133.4, 130.0, 129.9 x 2, 129.7, 129.5, 129.4 x 2, 129.3 x 2, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9 x 2, 128.8, 128.5, 128.4 x 2, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 126.5, 126.4 x 2, 126.3, 126.3, 126.2, 126.1, 126.0, 125.4, 103.0, 102.2, 101.7, 101.6, 101.5, 101.4 x 2, 101.3, 101.1 x 2, 101.0 x 2, 100.9, 100.8, 100.6, 100.1, 98.8, 98.7, 98.6 x 2, 98.5 x 2, 98.4, 98.3 x 2, 98.0, 97.8, 80.4, 80.0, 79.0, 78.9, 78.8, 78.7 x 2, 78.6, 78.5, 78.4 x 2, 78.3, 78.2 x 2, 78.1 x 2, 77.7, 76.1 x 2, 75.9, 75.7, 75.6 x 2, 75.5 x 2, 75.4, 75.2 x 2, 74.6, 74.5, 74.3, 74.2, 74.1, 73.9, 73.8, 73.2, 72.9, 72.4, 72.3 x 3, 72.2 x 2, 72.1, 71.8 x 2, 70.6, 69.1, 68.8 x 2, 68.7 x 2, 68.7, 68.6, 66.7, 66.2, 66.1, 66.0, 65.8, 65.7, 65.6, 65.3, 62.3, 55.3, 38.0, 37.7, 29.8, 29.7, 28.0, 27.6, 21.5, 21.0, 20.7 x 2, 20.6, 15.7, 14.2; IR (solid): 3511, 2881, 2013, 1726, 1454, 1262, 983, 772, 712, 557 cm⁻¹.



Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-acetyl-4,6-$

dene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylide

To a stirred solution of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzy 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(4,0-D-benzylidena-3-O-(4,0-D-benzylidena-3-O-(4,0-D-benzylidena-3-O-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylidena-3-0-(4,0-D-benzylide zylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O -benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzy -O-benzylidene-3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-B-D-gluc opyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl opyranosyl)-β-D-glucopyranosyl opyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-gluc opyranoside (3-59) (72.6 mg, 0.0140 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (1.10 mL) was added acetic anhydride (13.1 µL, 0.140 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (0.900 mg, 7.00 µmol, 0.500 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone to give methyl vacuo. 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzy O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene -3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzyli dene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene ylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucop $ucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl$ $ucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl$ ucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-60) (66.7 mg, 0.0128 mmol, 91%).

 $[\alpha]_{D}^{23} = -13.9$ (c = 0.200, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.04 (m, 14 H), 7.15-7.59 (m, 106H),

5.52 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.10-5.25 (m, 9H), 4.63-5.01 (m, 36H), 4.40 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 4.37 (d, 1H, J = 12.1 Hz), 4.30 (d, 1H, J = 12.1 Hz), 3.16-4.24 (m, 82H), 2.92 (dd, 1H, J = 3.4 Hz, J = 9.2 Hz), 2.35-2.71 (m, 8H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.76-1.77 (m, 18H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.8, 171.4, 169.5, 169.1, 169.0, 164.9, 164.5, 138.0, 137.9, 137.5, 137.4, 136.9, 134.1, 134.0, 133.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4 x 2, 129.3, 129.1 x 2, 129.0, 128.9, 128.8 x 2, 128.7, 128.6 x 2, 128.5, 128.4, 128.3 x 2, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 126.5, 126.4 x 2, 126.2 x 2, 126.1, 125.3, 102.2, 101.7, 101.6 x 2, 101.4 x 2, 101.3, 101.0, 100.9 x 2, 100.7, 100.6, 98.6, 98.5, 98.4, 98.3, 98.2 x 2, 97.8 x 2, 80.4, 79.9, 78.6, 78.5, 78.4, 78.3, 78.2, 78.1, 77.7, 76.6, 76.0, 75.7, 75.6, 75.4 x 2, 75.3 x 2, 75.2 x 3, 74.5, 74.2, 74.1 x 2, 73.8, 73.7, 73.1, 72.8 x 2, 72.3, 72.0, 71.8, 71.7, 70.6 x 2, 69.1, 68.8, 68.7, 68.6, 66.2, 66.1, 66.0, 65.9 x 3, 65.6 x 2, 65.5, 65.3, 65.2, 62.3, 55.3, 38.8, 37.9, 37.7, 32.0, 30.4, 29.7, 29.6 x 2, 29.5 x 2, 29.4, 29.3, 29.2 x 2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.0, 27.6, 26.8, 22.7, 21.5, 20.9, 20.6 x 2, 15.6, 14.2; IR (solid): 2929, 2327, 2013, 1724, 1456, 1263, 1220, 984, 711, 550 cm⁻¹.

Ph TO Ph TO

Methyl

 $\label{eq:2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-($

To a stirred solution of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene -3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyra

opyranoside (3-60) (62.7 mg, 0.0120 mmol, 1.00 eq.) in THF (1.00 mL) was added acetic acid (0.500 mL) and hydrazine monohydrate (0.250 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, acetate. filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene: acetone to give methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,0-acetyl-4 ne-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benz ylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-be nzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-B-D-glucopyranosyl)-B-D-glucopy ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-61) (56.8 mg, 0.0113 mmol, 94%).

 $[\alpha]_D^{23} = -15.7$ (c = 1.17, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.07 (m, 14H), 7.16-7.59 (m, 106H), 5.52 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.25-5.28 (m, 2H), 5.18 (br-s, 4H), 5.13 (s, 1H), 5.07 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.64-5.01 (m, 33H), 4.51 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.40 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz), 4.37 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 4.31 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz), 3.15-4.24 (m, 84H), 3.06 (br-s, 1H), 2.92 (dd, 1H, *J* = 3.2 Hz, *J* = 9.2 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.76-1.79 (m, 18H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.5, 169.4, 169.1, 169.0, 165.6, 164.9 x 2, 164.5, 138.0, 137.5, 137.4, 137.1, 136.9, 134.1 x 2, 134.0 x 2, 133.4, 130.0 x 2, 129.7, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.1 x 3, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4 x 2, 128.3 x 2, 128.2 x 2, 128.1 x 2, 128.0, 127.9, 126.5, 126.4, 126.3, 126.2 x 2, 102.7, 102.2 x 2, 101.9, 101.7, 101.6, 101.5, 101.4 x 2, 101.1, 100.9, 100.8, 98.7, 98.5, 98.4, 98.3, 98.2, 97.8 x 2, 80.4, 80.3, 79.9, 78.9, 78.3, 78.2, 78.1 x 2, 77.8, 75.7, 75.6, 75.3 x 2, 75.2, 74.6, 74.2, 73.8, 73.6, 73.5, 73.1, 72.8, 72.1 x 2, 70.6, 69.1, 68.8 x 2, 68.6, 68.5, 68.4, 66.7, 66.1, 66.0, 65.9 x 2, 65.5, 65.4, 65.3, 62.3, 55.3, 32.0, 29.8, 29.4, 29.3, 22.8, 21.0, 20.7, 20.6, 14.2; IR (solid): 3525, 2873, 1958, 1734, 1452, 1374, 1263, 1179, 984, 752, 713, 550 cm⁻¹.



Methyl

 $\label{eq:solution} \begin{array}{l} 3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\alpha-D-glucopyranosil de (3-68) \end{array}$

A mixture of methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-β-D-gluc opyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-

To a solution of the residue in dry CH_2Cl_2 (0.500 mL) and dry DMF (0.500 mL) was added Argo Pore resin (0.750 mmol/g, 10.0 eq.) and DIEA (0.0100 mL) at room temperature. After being shaken at room temperature for 12 h, the reaction mixture was filtrated and the resin was washed three times each with DMF (3.00 mL x 2), CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2), MeOH (3.00 mL x 2), and CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2). The resin was dried in vacuo.

The solid-support (resin was packed into MacroKansTM microreactor) was stirred in dry THF (3.00 mL) at room temperature for 15 min. Then liq. NH₃ (27.0 mL) and lithium-granule (50.0 mg) were added at -78 °C. After being stirred at the same temperature for 1.5 h, the reaction mixture was allowed to warm to reflux. After being stirred under reflux for 1 h, the reaction mixture was quenched with MeOH and stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the solid-support was washed three times each with THF (10.0 mL x 2), CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2), THF/distilluted water (1/1) (10.0 mL x 2), MeOH (10.0 mL x 2), and CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2). The solid-support (**3-70**) was dried in vacuo.

The solid-support (**3-70**) was treated with a solution of TFA (0.800 mL), MeOH (0.160 mL), and CH_2Cl_2 (3.04 mL) at room temperature for 30 min. The reaction mixture was filtered and rinsed with MeOH and distilluted watar. The filtrate was concentrated and azeotroped three times with EtOH.

 $[α]_D^{23}$ = +14.8 (c = 0.175, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.79 (d, 1H, anomericHα, *J* = 3.9 Hz), 4.76 (br-d, 1H, anomericHβ x 5, *J* = 8.2 Hz), 4.72 (d, 1H, anomericHβ, *J* = 6.8 Hz), 4.70 (d, 1H, anomericβ, *J* = 7.2 Hz), 3.83-3.91 (m, 8H), 3.67-3.78 (m, 16H), 3.31-3.55 (m, 27H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.4, 85.2, 76.5, 74.1, 69.0, 61.5.; IR (solid): 3633, 2998, 2722, 2566, 2031, 1465, 1180, 1042, 902, 769, 653, 514 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₉H₈₅O₄₁ [M+H]⁺ *m*/*z* = 1329.4566, found: 1329.4550.



Methyl

A mixture of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-3-O-(2-O-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-3-O-(2-Acetyl-4,0-acetyl-4,0-acetyl-3-O-(2-Acetyl-4,0-acetyl-3-O-(2-Acetyl-4,0-acetyl-3-O-acetyl-3-O-(2-Acetyl-3-O-acetyl-3ne-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benz ylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl pyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl pyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-78) (19.6 mg, 5.08 μmol, 1.00 eq.), (3,4-dihydro-2H-pyran-2-ylmethoxy)-acetic acid 4-nitro-phenyl ester (8.90 mg, 0.0305 mol, 6.00 eq.) (azeotroped two times with toluene), and pulverized activated MS-4A (41.0 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.410 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to 0 °C. 10-Camphorsulfonic acid (4.70 mg, 0.0203 mmol, 4.00 eq.) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated in vacuo and chromatographed on a small amount of silica gel to remove excess (3,4-dihydro-2H-pyran-2-ylmethoxy)-acetic acid 4-nitro-phenyl ester. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a solution of the residue in dry CH_2Cl_2 (0.500 mL) and dry DMF (0.500 mL) was added Argo Pore resin (0.750 mmol/g, 10.0 eq.) and DIEA (0.0500 mL) at room temperature. After being shaken at room temperature for 12 h, the reaction mixture was filtrated and the resin was washed three times each with DMF (3.00 mL x 2), CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2), MeOH (3.00 mL x 2), and CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2). The resin was dried in vacuo.

The solid-support (resin was packed into MacroKansTM microreactor) was stirred in dry THF (3.00 mL) at room temperature for 15 min. Then liq. NH₃ (27.0 mL) and lithium-granule (50.0 mg) were added at -78 °C. After being stirred at the same temperature for 1.5 h, the reaction mixture was allowed to warm to reflux. After being stirred under reflux for 1 h, the reaction mixture was quenched with MeOH and stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the solid-support was washed three times each with THF (10.0 mL x 2), CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2), THF/distilluted water (1/1) (10.0 mL x 2), MeOH (10.0 mL x 2), and CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2). The solid-support (**3-79**) was dried in vacuo.

The solid-support (**3-79**) was treated with a solution of TFA (0.800 mL), MeOH (0.160 mL), and CH_2Cl_2 (3.04 mL) at room temperature for 15 min. The reaction mixture was filtered and rinsed with MeOH and distilluted watar. The filtrate was concentrated and azeotroped three times with EtOH.

 $[α]_D^{24} = -2.08$ (c = 0.0550, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.79 (d, 1H, anomericHα, J = 2.9 Hz), 4.76 (br-d, 9H, anomericHβ x 9, J = 7.7 Hz), 4.72 (d, 1H, anomericHβ, J = 7.7 Hz), 3.83-3.91 (m, 12H), 3.63-3.78 (m, 24H), 3.31-3.55 (m, 39H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.4, 85.0, 76.5, 74.2, 69.0, 61.5; IR (solid): 3476, 3140, 2596, 2019, 1465, 1188, 1043, 915, 775, 654, 524 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{73}H_{125}O_{61}$ [M+H]⁺ m/z = 1977.6679, found: 1977.6666.



Methyl

A mixture of methyl 2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benz ylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0nzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopy ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranoside (3-61) (4.60) mg, 0.881 µmol, 1.00 eq.), 3-(3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)-propanoic acid 4-nitro-phenyl ester (6.80 mg, 0.0245 mmol, 27.8 eq.) (azeotroped two times with toluene), and pulverized activated MS-4A (mg) in dry CH₂Cl₂ (0.0200 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to 0 °C. 10-Camphorsulfonic acid (0.400 mg, 1.76 µmol, 2.00 eq.) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After being stirred at the same temperature for 5 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated in vacuo and chromatographed on a small amount of silica gel to remove excess 3-(3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)-propanoic acid 4-nitro-phenyl ester. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a solution of the residue in dry CH_2Cl_2 (1.00 mL) and dry DMF (1.00 mL) was added Argo Pore resin (0.750 mmol/g, 30.0 eq.) and DIEA (0.0500 mL) at room temperature. After being shaken at room temperature for 12 h, the reaction mixture was filtrated and the resin was washed three times each with DMF (3.00 mL x 2), CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2), MeOH (3.00 mL x 2), and CH_2Cl_2 (3.00 mL x 2). The resin was dried in vacuo.

The solid-support (resin was packed into MacroKansTM microreactor) was stirred in dry THF (3.00 mL) at room temperature for 15 min. Then liq. NH₃ (27.0 mL) and lithium-granule (50.0 mg) were added at -78 °C. After being stirred at the same temperature for 1.5 h, the reaction mixture was allowed to warm to reflux. After being stirred under reflux for 1 h, the reaction mixture was quenched with MeOH and stirred at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the solid-support was washed three times each with THF (10.0 mL x 2), CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2), THF/distilluted water (1/1) (10.0 mL x 2), MeOH (10.0 mL x 2), and CH₂Cl₂ (10.0 mL x 2). The solid-support (**3-69**) was dried in vacuo.

The solid-support (**3-69**) was treated with a solution of TFA (0.800 mL), MeOH (0.150 mL), and CH_2Cl_2 (3.04 mL) at room temperature for 15 min. The reaction mixture was filtered and rinsed with MeOH and distilluted watar. The filtrate was concentrated and azeotroped three times with EtOH.

To a solution of the residue in MeOH (1.00 mL) was added dimethylamine (0.100 mL) at room temperature. After being shaken at the same temperature for 5 min, the reaction was concentrated *in vacuo*

 $[α]_D^{24} = -2.36$ (c = 0.0800, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.79 (d, 1H, anomericHα, J = 3.9 Hz), 4.75-4.77 (br-d, 13H, anomericHβ x 13, J = 8.2 Hz), 4.72 (d, 1H, anomericHβ, J = 7.2 Hz), 4.70 (d, 1H, anomericHβ, J = 7.2 Hz), 3.83-3.91 (m, 17H), 3.63-3.78 (m, 31H), 3.44-3.55 (m, 46H), 3.31-3.41 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.3, 85.0, 76.4, 74.1, 68.9, 61.5; IR (solid): 3637, 3022, 2716, 2573, 2012, 1465, 1198, 1077, 797, 663, 524 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₉₇H₁₆₅O₈₁ [M+H]⁺ m/z = 2625.8792, found: 2625.8809.

HO _	HO	HO 🔨	HO	HO_	HO	HO_	, HO _	、 、								
HO	LOHO-	LOHO-	-OHO-	-OHO-	-OHO-	-OHO-	-0HO-	-OHO-	-0HO-	-0HO-	_0.HO	-OHO-	LOHON	LOHO-	LOHO-	70
HOT	~01		-10r	201		202	202	->0r	-10r	202	201	~~~~~		-101	-201	-
	OH	OH	OH	ОН	OH	ОН	OH	OH	OH	ОН	ОН	OH	OH	OH	OH	HO _{OMe}









Ph

70 07

LevO

Pho v

ÒLev

Pho 0

ÒBz

Pho 0

ÒAc





Pho 0

ÒBz

Pho O

Ю













140227 FMC 2.30H 2.30H













N62}3 12 MC 2,30H 2,4C


















第4章

βグルカン関連オリゴ糖鎖の合成法の開発

4-1 はじめに

3章の結果から、直鎖16糖までの単分子の糖鎖ではデクチン1との結合が見られず、より強い 結合のためには多価効果を期待する複合糖鎖の開発が必要であると結論付けた。そこで、デクチン 1を介した免疫調整機能分子の合成を目指し、βグルカン糖鎖を微粒子上に束ねた糖鎖微粒子の開 発を行うこととした(Figure 4-1)。糖鎖の微粒子への固定化を行うことで、糖鎖の多価効果によ るデクチン1に対する強い相互作用効果(結合力向上や免疫活性化作用発現など)を期待した。こ の微粒子は自然免疫活性化のメカニズムを明らかにするための人工真菌モデル化合物と考えられ、 微粒子に適切なマーカー(蛍光など)をもたせることで、生物プロセスの過程を解析するための有 用なケミカルプローブになると期待した。本章では、微粒子への固定化を目的として還元末端にア ミノ基を有するオリゴ糖鎖を行なうこととした。



Figure 4-1

4-2 標的化合物の設計

序論において述べたように、9糖を主鎖とする合成βグルカンにおいて、β(1,6)分岐鎖を 有する糖鎖は直鎖の糖鎖よりもデクチン1に対して約100倍の結合力を有することが報告され ている。¹⁾そこで、本研究では、アミノアルキル基を有する直鎖の16糖、および、分岐17糖以 下のβグルカンを合成標的分子として、糖鎖長および分岐構造に関わる多様性指向型合成戦略の開 発を行うこととした。すなわち、Figure 4-2に示す6種類の非還元末端にアミノ基を有する分岐糖 および直鎖糖を合成ターゲットとすることとした。



Figure 4-2

4-3 合成戦略

3章では、2糖+2糖、4糖+4糖、8糖+8糖と逐次的なブロック合成法を用いて16糖の構築を行った。しかしながら、この手法では標的化合物である16糖を効率的に合成するためには有用であるが、糖鎖長や分岐構造など骨格構造の複雑な多糖の部分構造を多種類構築するためには必ずしも効率的な合成戦略であるとは言えない。そこで、本研究では、共通オリゴ糖ブロックを利用する多様性指向型合成戦略に基づく合成の開発を行うことした。16糖主鎖の糖鎖4-1、4-2は、4糖主鎖のブロックに分けて2,3位ジオール型糖受容体に対する位置選択的グリコシル化と脱保護を順次繰り返すことにより合成する。すなわち、直鎖の4糖4-8、および、分岐単糖を有し主鎖4糖とする5糖4-9を用意することにより、直鎖8糖4-3、12糖4-2、16糖4-1、および、分岐9糖4-6、13糖4-5、17糖4-4が合成できる。その際、分岐糖部を内部に有する分岐オリゴ糖ブロックを用いることにより、分岐構造のグリコシル化反応への影響を抑えることとした。そこで、直鎖4糖ブロックは、前章の収束的合成法と同様、非還元末端糖の2、3位に化学選択的に脱保護可能なレブリノイル基、4、6位にベンジリデン基を有するオリゴ糖を用いる。4糖チオ糖4-8 は、

2糖活性化糖 4-12 と2糖チオ糖 4-10 との化学選択的グリコシル化反応により合成する。一方、分岐5糖 4-9 は、6 位に穏和な還元条件で脱保護可能なオルトアジドメチルベンゾイル基(以下 Azmb 基) を有する2糖チオ糖 4-11 の3 位遊離水酸基に対して2糖活性化糖 4-12 とグリコシル化反応を行い、得られた4糖の Azmb 基を脱保護することで得られる6 位遊離水酸基に対して単糖イミデート糖 4-13 とグリコシル化反応を行うことで合成する。6 位に糖を有するグルコースの3 位は非常に反応性が低下していることが明らかになっているため、先に直鎖4糖を合成した後反応性の高い6 位水酸基へのグリコシル化することに効率的に分岐糖が合成できると考えた。最終段階である脱保護反応とアジド基の還元は、Birch 還元反応を用いて行なう。



4-4 多様性指向型合成戦略に基づく合成

以下の順序で研究を進めた。

- 1) 直鎖の4 糖糖供与体 4-8 の合成
- 2)分岐糖の5糖糖供与体4-9の合成
- 3) 直鎖の4糖糖受容体4-7の合成と直鎖の8糖、12糖、16糖の合成
- 4) 分岐9糖、13糖、17糖の合成

- 5) 位置選択性の証明
- 6) 脱保護の検討

1) 直鎖の4 糖糖供与体 4-8 の合成

直鎖4糖糖供与体 4-8 の合成について述べる(Figure 4-4)。前章での4糖合成と同様、合成中間 体となる2糖チオ糖 4-12(X = SR)を合成し、2糖糖供与体 4-12(X = leaving group)および2糖糖 受容体 4-10 へと変換することで4糖 4-8 へと糖鎖伸長を行う。



Figure 4-4

しかしながら、前章においてブロモ糖(X = Br)とチオ糖を用いる化学選択的グリコシル化反応に おける収率の不安定さが課題であった。ブロモ糖とチオ糖の化学選択的グリコシル化反応において 低収率となった要因を以下に挙げて考察する。

(1) ブロモ糖の不安定性

(2) ジオール糖受容体の結晶性の高さ

(1) ブロモ糖は、銀塩を活性化剤とするグリコシル化反応において最も用いられる糖供与体の一つである。しかしながら、今回用いたブロモ糖は、ブロモ糖自身が不安定であり、反応系中での分解が見受けられた。より反応性が高いが、取り扱いが容易な糖供与体を用いる必要がある。

(2) ベンジリデンアセタールを有するやフェニルチオ糖は、極性と結晶性が高かったため、反応 溶媒となる塩化メチレン溶媒に対する溶解性が低かった。2,3ジオール糖受容体の位置選択的グ リコシル化反応において、糖受容体の析出してしまうと、糖供与体との当量比が崩れるために、生 成物のさらなるグリコシル化を促進すると考えられる(Figure 4-5)。そのため、実際には、希釈 条件下、比較的高めの反応温度で(-10~0 ℃)グリコシル化反応を行なった。その結果、目的物 は得られたものの、ブロモ糖の分解反応を抑制することは困難であった。



Figure 4-5

以上の考察をふまえ、糖受容体と糖供与体について、以下のような改善を検討することした。す なわち

- (1) 糖受容体のチオ基を、フェニルチオ基からエチルチオ基へと変えることにより、糖受容体の 結晶性を低下させ、塩化メチレンに対する溶解性の向上を図る。
- (2) 糖供与体については、脱離基と活性化剤を検討することにより、より適した糖供与体を探索 する。

まず、糖供与体の脱離基について検討した。

a) クロロ糖 **4-14**(X=C1)

ブロモ基よりも脱離性が低く、同様の条件で活性化可能なハロゲン化糖。

b)フッ化糖 **4-15**(X=F)

安定な糖であり、 $SnC1_2$ -Ag $C10_4^{2}$ や Cp_2HfC1_2 -Ag OTf^{3} 等で活性化可能である。

c) トリクロロアセトイミデート糖 4-16(X=0C(NH)CC1₃)

調製のためにラクトール構造に変換する必要はあるが、触媒量のルイス酸で活性化可能であり、 反応性も高い。しかしながら、反応性の低い糖受容体を用いた場合には、脱離したトリクロロアセ トアミドが、N-グリコシル化したグリコシルアミドを副生成物として得られる。

d) チオ糖の4-17(X=SPh)、4-18(X=SEt)

チオ糖は、あらかじめ低温下、1-ベンゼンスルフィニルピペリジン(以下 BSP) /トリフルオロメ タンスルホン酸無水物(以下 Tf₂0)⁴⁾またはベンゼンスルフィニルモルホリン(以下 BSM) /Tf₂0⁵⁾条 件下活性化させた後に、チオ糖糖受容体を加えてグリコシル化反応することにより、同一のチオ糖 同士においても化学選択的にグリコシル化できることが知られている。活性化糖本体はトリフラー ト糖であると考えられている。活性種の反応性が高く、糖供与体への変換が必要無いため優れた手 法である。しかしながら、トリフラート糖が低温下ある程度の寿命を有する必要がある。

a)~c)における活性化糖の合成を行った。

a) クロロ糖 4-14(X=C1)

単糖クロロ糖4-14(X=C1)の合成を検討した(Scheme 4-1)。2,3位にLev基を有するチオ糖4-17(= 3-55、1.0 当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ 脱水を行った。その後、0 ℃で、一塩化ヨウ素(1.0 M CH₂Cl₂溶液、2.0 当量)を加えることで、 クロロ基の導入を行った。TLC 解析を行うことで、原料が消失する前に系中が複雑な混合物の混ざ りとなったのを確認した。2 時間後、反応がほぼ停止したため、さらに一塩化ヨウ素(1.0 M CH₂Cl₂ 溶液、2.0 当量)を加えた。開始4時間後、TLC上でチオ糖4-17 の消失を確認した。後処理後、シ リカゲル精製を行うことで高極性成分を除いた。NMR 解析、MASS 解析の結果、痕跡量しかクロロ体 を確認することができなかった。また、ブロモ体同様、シリカゲル精製において一部分解し、ラク トール体4-19 の生成が見られた。これらより、クロロ体の調製は困難であると考えられる。



b)フッ化糖 4-15(X=F)

単糖フッ化糖 4-15(X=F)の合成を検討した(Scheme 4-2)。2,3位に Lev 基を有するチオ糖 4-18(1.0 当量)に対し、ジクロロメタン溶媒中、三フッ化ジエチルアミノ硫黄(DAST、1.3 当量) と NBS(1.5 当量)を加えることで、フルオロ基の導入を行った。1時間後、TLC上でチオ糖 4-18 の消失を確認した。しかしながら、系中が複雑な混合物の混ざりとなった。NBSによってベンジリ デンアセタールの酸化、脱離が進行したものと考えられる。以上により、フルオロ体の調製は困難 であると考えられる。



c) トリクロロアセトイミデート糖 4-16 (X=0C (NH) CC1₃)

単糖イミデート糖 4-16(X=OC(NH)CCl₃)の合成を検討した(Scheme 4-3)。まず、ラクトール 4-19 への変換の検討を行った(Table 4-1)。一般的に、チオ糖のラクトール体への変換反応は、基質が 異なるだけでなく、スケールが変わることにおいても収率が大きく変動することがあり、その都度 条件検討が必要である。2,3位に Lev 基を有するチオ糖 4-18(1.0 当量)に対し、アセトン/水(1 00/1) 混合溶媒中、NBS(2.0 当量) を加えることで、チオ基の脱離を試みた(Entry 1)。5分 後、TLC 上でチオ糖 4-18 の消失を確認した。しかしながら、系中は高極性化合物の混合物となった。 NBS の水による分解物(酸)によってベンジリデンアセタールの脱離が進行したものと考えられる。 その他に目立った副生成物が見られなかったため、ラクトール化の条件検討を行うこととした。本 結果より、系中において過剰に存在する活性化剤が副反応を引き起こす要因になると考え、あらか じめ調製した活性化剤を滴下する方法を行った。チオ糖 4-18(1.0 当量)に対し、ジクロロメタン/ 水(100/1)混合溶媒中、あらかじめ調製した活性化剤である、NIS(1.3当量)に対しTfOH(0.0678 当量)を加えたジクロロメタン/THF(40/1)混合溶液を滴下した(Entry 2)。TLC 上でチオ糖 4-18の消失を確認し、目的のラクトール体 4-19を確認したが、ほぼベンジリデンアセタールの脱 離が進行したものとみられる高極性化合物の混合物となった(収率5%)。これらの結果より、水と 酸が比較的高い温度(0 ℃)において共存する系がベンジリデンアセタールの脱離を促すと考えら れる。そこで、無水条件かつ低温でチオ糖を活性化することができれば、塩基性水溶液へと注ぐこ とで、水酸基の導入と同時に酸の中和を行うことができ、安定にラクトール体が得られるのではな いかと考えた。低温でチオ糖を活性化する条件として、Crich らによって報告されている反応性の 高いスルフィニル /Tf₂0^{4),5)}条件を採用した。チオ糖 **4-18**(1.0 当量)に対し、ジクロロメタン溶媒 中、-40 ℃にて BSM (1.1 当量)、Tf₂O (1.2 当量) によりチオ基を活性化させた (Entry 3)。5 分後、 勢いよく撹拌した飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と 10%チオ硫酸ナトリウム水溶液、酢酸エチルの 二相系に対し、反応混合物を注ぐことで糖に水酸基の導入を行った。後処理後、NMR 解析によって アノマー位に2位のLev 基が転位した化合物(Scheme 4-3 括弧内)が見られたため、ラクトールへの 変換を行った。得られた混合物に対し、ジクロロメタン溶媒中、トリエチルアミンを加えることで アノマー位のLev 基が2位に転位し、ラクトール体 4-19 を2段階収率 96% (α:β = 61:39) で得 た。本手法では、再現性良くラクトール体が得られた。また、30gスケールのチオ糖であっても高 収率で目的物が得られた(2段階収率90%)。続いて、得られたラクトール体 4-19 に対し、ジクロ ロメタン溶媒中、トリクロロアセトニトリル(3.0 当量)、触媒量の炭酸セシウム(0.10 当量)を 加えてイミデート基の導入を行い、収率 96%でイミデート糖 **4-16**(α:β = 50:50)を得た。このイ ミデート糖 4-16 はブロモ糖よりも安定性が高く、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて も基質の損壊やイミデート基の脱離は見られなかった。



Scheme 4-3

Entry	Activator	temp. (°C)	4-19 (%)
1	NBS (2.0 eq.)	0	decomposed
2	NIS (1.3 eq.), TfOH (0.0678 eq.)	0	5
3	BSM (1.1 eq.), Tf ₂ O (1.2 eq.); NEt ₃ /CH ₂ Cl ₂	-40	96

これらの結果を受けて、エチルチオ糖2,3ジオール体 4-21⁶⁾を糖受容体とする化学選択的グリ コシル化反応の検討を行った(Scheme 4-4)。エチルチオ糖は、フェニルチオ糖よりも塩化メチレン 溶媒に対する溶解性が高く、低温においても析出は観測されなかった。



Scheme	4-4
--------	-----

Entry	x	Activator	Isolated C3-selective	Yield (%) C2-selective	C2-selective product
1	αBr (4.97 g ^{a)})	AgOTf (1.2 eq.)	28	0	HO SEt
2	αBr (15.0 g ^{a)})	AgOTf (1.2 eq.)	12	0	Ph- 0- 0 Levo
3	OC(NH)CCl ₃ (12.4 g)	TMSOTf (0.1 eq.)	69	6	4-24
4	OC(NH)CCl ₃ (39.7 g)	TMSOTf (0.1 eq.)	64	7	
5	βSPh (57.8 mg)	Tf ₂ O (1.2 eq.), BSP (1.1 eq.) TTBP (1.5 eq.)	comple>	(mixture	BSP O II
6	βSEt (53.8 mg)	Tf ₂ O (1.2 eq.), BSP (1.1 eq.) TTBP (1.5 eq.)	comple>	(mixture	Ph ^S N

a) ブロモ糖調製前のチオ糖換算、収率は2段階収率

Table 4-2

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)			
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A1 (J _{1,2}) H-A2		H-B1 (J _{1,2})
4-22 4-23	4.47 (9.7) 4.52 (9.7)	3.61 5.01	3.73-3.79 3.93	4.85 (7.7) 5.04-5.11

Table 4-3

・ブロモ糖糖供与体を用いる検討(Entry 1,2)

エチルチオ糖2,3ジオール体 4-21 (1.0 当量)と2,3位水酸基に Lev 基を有するブロモ糖 4-20(1.0 当量、調製は3章に準ずる)をジクロロメタン、トルエン混合溶媒中、モレキュラーシー ブス 4A(0.5 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-40 ℃で、銀トリフラート(以下 AgOTf、 1.2 当量)を用いてブロモ基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。開始2時間後、TLC上で 4-20 の消失を確認した。後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2糖 4-22 が単一異性体で得られ た。この際、糖供与体量を多く用いるほど収率の低下が確認できた(4.97 g(28%: Entry 1)、15.0 g(12%: Entry 2)。収率はブロモ化からの2段階収率)。低収率となった原因として、ブロモ糖の 調製において高極性の副生成物が多く見られた(Scheme 4-5)。理由として、大量になるほど反応溶 液の温度コントロールが難しく、一臭化ヨウ素によってベンジリデンアセタールが酸化、開裂した ものと考えられる。また、グリコシル化反応における糖供与体 4-20 の消失に時間がかかり、生成 する TfOH によってベンジリデンアセタールが外れたためであると考えられる。



Scheme 4-5

続いて、2糖 4-22 のベンゾイル化を行った、2糖 4-22(1.0 当量)をピリジン溶媒中、ベンゾイ ルクロライド(3.0 当量)と触媒量の DMAP(0.1 当量)を加えることで2位にベンゾイル基の導入 を行った。その後、120 ℃で4時間反応を行い、TLC上で4-22 の消失を確認した。後処理、精製を 行い、収率 96%で2糖 4-23 を得た。この際の4-22 と4-23 の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて 行なった(Table 4-3:還元末端糖をA、非還元末端糖をBとおく。ピークの分離が悪い化学シフト は範囲を示した)。還元末端糖の2,3位の化学シフトに注目すると、ベンゾイル化前後において 3位の化学シフトにはあまり変化が見られないが、2位の化学シフトが 1.40 ppm 低磁場シフトし た。また、¹H-¹H COSY より、4-22 は遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られた。こ れらより、グリコシル化反応は3位選択的に進行したものと決定した。一方、4-22 のアノマー位の 立体化学は、アノマー位のプロトンの結合定数にて、β体であると決定した。 ・イミデート糖糖供与体を用いる検討(Entry 3,4)

エチルチオ糖2,3ジオール体 4-21 (1.05~1.10 当量) と2,3位水酸基に Lev 基を有するイミ デート糖 4-16 (1.0 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A (1.0 g/mmol) 存在下混 在させ脱水を行った。その後、-40 °Cで、トリメチルシリルトリフラート(以下 TMSOTf、0.1 当量) を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル 化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC) を含む精製後、高収率でβ(1,3) 体 4-22 が得 られた。また、少量ではあるがβ(1,2) 体 4-24 の生成が見られた。この際、糖供与体量に収 率はほとんど左右されなかった(12.4 g(69%: Entry 3)、39.7 g(64%: Entry 4))。40 g スケー ルのイミデート糖においても高収率で目的のβ(1,3) 2糖 4-22 が得られており、今回の化学 選択的グリコシル化反応においてイミデート糖とエチルチオ糖の組み合わせが良い結果を与える ことが分かった。

・チオ糖のプレアクティベートを用いる検討(Entry 5,6)

2,3位水酸基にLev 基を有するチオ糖 4-17(X = SPh、1.0当量)および 4-18(X = SEt、1.0当 量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(1.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。 その後、-60 ℃で、BSP(1.1当量)と 2,4,6-トリ-*t*-ブチルピリジン(以下 TTBP、1.5当量)、Tf₂0(1.2 当量)を加えてチオ基を活性化させた。5分後、チオ糖 2,3ジオール体 4-21(0.9当量)を加えて グリコシル化反応を行った。5分後、TLC上にて糖供与体(4-17、4-18)および糖受容体 4-21 が消 失し、系中が複雑化していることを確認した。後処理を行うも、副生成物の解析は困難であった。 塩基 TTBP 存在下においても、当量発生する TfOH の酸にベンジリデンアセタールが開裂し、複雑化 したものと考えられる。

以上の検討により、大量合成を視野に入れた、活性化糖の調製と化学選択的グリコシル化反応を 高収率で行うことができるイミデート糖が有用であることが分かった。直鎖の4糖糖供与体4-8や 分岐糖の5糖糖供与体4-9の合成においてもこのイミデート糖とエチルチオ糖の組み合わせを用い ることとした。

直鎖の4糖 4-28 (4-8 のエチルチオ糖体 (R = Et))の合成を行った。共通中間体である2,3 Lev 基を有する2糖チオ糖 4-23 からイミデート糖 4-25 とジオール 4-26 への変換を行い、化学選択 的グリコシル化反応を行うことで4糖 4-8 を得る。まず、2糖チオ糖 4-23 の変換を行った (Scheme 4-6)。チオ糖 4-23 をジクロロメタン溶媒中、-50 ℃にて BSM (1.1 当量)、Tf₂0 (1.2 当量)により チオ基を活性化させた。5 分後、勢いよく攪拌した飽和重曹水溶液と10%チオ硫酸ナトリウム水溶 液、酢酸エチルの二層系に対し、反応混合物を注ぐことで糖に水酸基の導入を行った。続いて、ジ クロロメタン溶媒中、トリエチルアミンを加えることでラクトール体 (2 段階収率 86%、α:β = 66:34)を得た。得られたラクトール体に対し、ジクロロメタン溶媒中、トリクロロアセトニトリ ル (5.0 当量)、触媒量の炭酸セシウム (0.10 当量)を加えてイミデート基の導入を行い、収率 96% でイミデート糖 4-25 (α:β = 84:16) を得た。このイミデート糖 4-25 も単糖のイミデート糖 4-16 と同様、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて基質の損壊やイミデート基の脱離は見られ なかった。一方、非還元末端の2,3位に Lev 基を有する 4-23 に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/ 酢酸を加えて Lev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、後処理、精製を行うことで、目的 とするジオール 4-26 が収率 99%で得られた。



続いて、4 糖チオ糖 4-28 の合成を示す(Scheme 4-7)。非還元末端の2,3位に遊離水酸基を持 つ2糖チオ糖 4-26(1.2当量)と2,3位にLev 基を有する2糖イミデート糖 4-25(1.0当量)をジク ロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、 -50 ℃で、TMSOTf(0.1 当量)を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。そ の結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、4糖 4-27 が収率 90%で得られた。続いて、4 糖 4-27 をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量の DMAP を 加えることで2位にアセチル基の導入を行った。速やかに反応は進行し、4糖4-28を収率96%で 得た。この際の 4-27 と 4-28 の同定は 'H-NMR、'H-'H COSY を用いて行なった (Table 4-4: 還元末端 糖からA、B、C、Dとおく。4-28の糖ユニットBとC(内部の糖)は順不同)。4-27の糖ユニットB の2位の化学シフトに注目すると、化学シフトが3.41 ppm であるのに対し、アセチル化後の4-28 は全ての2位の化学シフトが低磁場に存在することが確認できた(4.83~5.19 ppm)。また、¹H-¹H COSY より、4-27 は遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンの相関が見られた。これらより、グリ コシル化反応は3位選択的に進行したものと決定した。一方、4糖4-27の糖ユニットCのアノマ 一位の結合定数は、小さくなっていることが明らかとなった。これは、舟形の立体配座が含まれて いることによると考えている。アノマー位の正確な構造決定は、後に行うこととした(直鎖の4糖 糖受容体 4-7 の合成 Scheme 4-13 にて)。



Scheme 4-7

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)							
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A2	H-B1 (J _{1,2})	H-B2	H-C1 (J _{1,2})	H-C2	H-D1 (J _{1,2})	H-D2
4-27 4-28	4.66 (9.7) 4.50 (9.7)	5.23-5.29 4.93	4.40 (7.2) 4.88 (6.8)	3.41 4.83	5.01 (4.8) 4.64 (5.3)	5.11 5.19	4.88 (7.7) 4.70 (7.7)	5.06 4.99

Table 4-4

2) 分岐糖の5糖糖供与体 4-9 の合成

分岐5糖糖供与体 4-9 の合成方法について述べる(Figure 4-6)。5糖 4-9 は三つのフラグメント 4-13、4-25、4-31 に分けて合成する(Figure 4-6下)。化学選択的グリコシル化の組み合わせは先 の検討で有用であったイミデート糖とエチルチオ糖の組み合わせとした。その際、二つの合成方法 が考えられる。以下に挙げて検討する。

Route 1) 3位遊離水酸基を有する2糖4-31に対し、2糖イミデート糖4-25をグリコシル化させる。その後、得られた4糖4-29の6位保護基(P²)を脱保護し、Demchenkoら⁷⁾に反応性の高い糖 供与体であると報告されている単糖糖供与体4-13をグリコシル化反応させる(Figure 4-6 左)。込み入った内部の糖にグリコシル化させるが、反応性の高い一級水酸基である6位にグリコシル化さ せるため、大きな問題はないと考えた。また、序論において述べたが、当研究室雨夜は4糖受容体 の任意の6位に対し、単糖を導入することに成功している。

Route 2) 6 位遊離水酸基を有する 2 糖 4-31 に対し、単糖イミデート糖 4-13 をグリコシル化させる。その後、得られた 3 糖 4-30 の 3 位保護基(P⁴)を脱保護し、 2 糖糖供与体 4-25 をグリコシル 化反応させる(Figure 4-6 右)。この合成方法では、 3 糖 4-30 の分岐鎖が立体障害となり、 3 位水 酸基の反応を下げる可能性がある。

以上から、Route 1の合成法で分岐5糖糖供与体 4-9 を得ることとした。



Figure 4-6

2糖受容体 4-31 の候補として、以下の二種類のチオ糖を挙げる(Figure 4-7)。すなわち、2、 3ジオールを有し、4、6位に 2-アジドメチルベンゾイル(以下 AZMB) 基を有する2糖 4-32 と、 3位に遊離水酸基を有し、6位に AZMB 基を有する2糖 4-33 である。AZMB 基はアジド基を還元する ことにより生じたアミンが分子内でエステル基を求核攻撃することで水酸基から脱離する⁸⁾。安定 な保護基であるが、他の保護基に影響を与えない穏和な条件で外れるために有用な保護基である。



Figure 4-7

まず、3位選択的グリコシル化反応に有用であったジオールを用いて効率的に分岐糖を合成しようと考えた(Figure 4-8)。2糖 4-25 との3位選択的グリコシル化反応後、得られた4糖の4、6位のAZMB 基を脱保護し、反応性の高い一級水酸基である6位に対して単糖 4-13 との6位選択的グリコシル化反応が行えると考えた。しかしながら、2糖 4-32 は4、6位の保護基としてエステル 基を用いた場合には、4位のエステルによる3位水酸基の反応性の低下の影響により、十分な3位



水酸基へのグリコシル化反応の位置選択性が得られない可能性がある。

Figure 4-8

2糖 4-32 の合成を行った(Scheme 4-8)。非還元末端の2, 3位に遊離水酸基を持つ単糖チオ糖 4-21(1.2当量)と2, 3位にLev 基を有する単糖イミデート糖 4-34(1.0当量)をジクロロメタン溶 媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-10 ℃で、 TMSOTf(0.1 当量)を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速 やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2糖 4-35 が収率 52%で得られた。続いて、2糖 4-35 のベンゾイル化を行った、2糖 4-35(1.0 当量)をピリジン溶 媒中、ベンゾイルクロライド(3.0当量)と触媒量の DMAP(0.1 当量)を加えることで 2 位にベン ゾイル基の導入を行った。その後、120 ℃で4時間反応を行い、TLC 上で4-35の消失を確認した。 後処理後、Lev 基の脱保護を行った。得られた化合物に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加 えた。反応は速やかに進行し、後処理、精製を行うことで、目的とするジオール 4-32 が2段階収 率 43%で得られた。この際の **4-32**の同定は ¹H-NMR、 ¹H-¹H COSY を用いて行なった(Table 4-5:還 元末端糖をA、非還元末端糖をBとおく)。還元末端糖Aの2,3位の化学シフトに注目すると、3 位の化学シフトは高磁場よりであるが、2位の化学シフトは低磁場であり、ベンゾイル化が2位に 進行したことが分かる。このことからグリコシル化反応は3位選択的に進行したものと決定した。 一方、非還元末端糖 B のアノマー位の立体化学は、アノマー位のプロトンの結合定数にて、β 体で あると決定した。



Scheme 4-8

	δ (ppm) (J, Hz)			
compound	H-A2	H-A3	H-B1 (J _{1,2})	H-B2	H-B3
4-32	5.39	4.24	4.48 (7.7)	3.52	3.64

Table	4-5
-------	-----

続いて、2糖 **4-32** による位置選択的グリコシル化反応の検討を行った(Scheme 4-9)。この際、 位置選択性の解析を容易にするため、単糖供与体 4-16 を用いた。非還元末端の2, 3位に遊離水 酸基を持つ2糖チオ糖4-32(1.0当量)と単糖イミデート糖4-16(1.5当量)をジクロロメタン溶媒中、 モレキュラーシーブス 4A(4.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-30 ℃で、TMSOTf(0.2 当量)を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリ コシル化反応は進行し、TLC上で二種類の生成物が見られた。後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む 精製を試みるも、非常に分離困難であったため、混合物のままアセチル化を行うことで生成物の同 定を行うことにした。得られた混合物をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量の DMAP を加えること でアセチル基の導入を行った。速やかに反応は進行し、 β (1,3)3 糖 4-36 および β (1,2) 3 糖 4-37 を 4:1 の比で得た (NMR により生成比を決定)。この際の 4-36、4-37 の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行なった。4-36 の2位の化学シフトに注目すると、アセチル化前後で化学シフトが 1.14 ppm 低磁場シフトした (3.54→4.68 ppm)。このことから、3位結合体であると決定した。ま た、4-37の3位の化学シフトに注目すると、アセチル化前後で化学シフトが1.70 ppm 低磁場シフ トした (3.63→5.33 ppm)。このことから、2位結合体であると決定した。一方、非還元末端糖の アノマー位の立体化学は、アノマー位のプロトンの結合定数(4-36:4.71 ppm (7.7 Hz)、4-37:4.32 ppm (8.2 Hz)) にて、 β 体であると決定した。





以上、4,6位にAZMB基を用いた2糖4-32では位置選択的グリコシル化反応の選択性が下がり、

非常に分離困難なβ(1,2)生成物が得られることが分かった。この結果より、分岐5糖の合成 において2糖4-32を用いるのは適切ではないと結論付けた。

続いて、3位に遊離水酸基を有し、6位に AZMB 基を有する2糖 4-33 を用いる分岐5糖の合成を 行うことにした(Figure 4-9)。非還元末端糖の2位にベンゾイル基を有するため、反応性が低下 する可能性や副生成物の可能性が考えられるが、モノオールに反応を行うために分離困難な位置異 性体は得られない。4位の保護基は3位の求核性を上げるために、電子供与性であるベンジル基を 用いた。



2糖4-33の合成を行った(Scheme 4-10)。非還元末端の2,3位に遊離水酸基を持つ単糖チオ糖 **4-21**(1.2 当量)と、化学選択的に脱保護可能な *t*-ブチルジメチルシリル(以下 TBS) 基を3位に、 AZMB 基を6位に有する単糖イミデート糖4-38(1.0当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシ ーブス 4A(1.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-15 ℃で、TMSOTf (0.2 当量)を用 いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反 応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2糖 4-39 が収率 94%で得られた。続い て、2糖4-39のベンゾイル化を行った、2糖4-39(1.0当量)をピリジン溶媒中、ベンゾイルクロ ライド(3.0当量)と触媒量のDMAP(0.1当量)を加えることで2位にベンゾイル基の導入を行っ た。その後、120 ℃で7時間反応を行い、TLC上で 4-35 の消失を確認した。後処理後、TBS 基の脱 保護を行った。得られた化合物に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えた。反応は速やかに 進行し、後処理、精製を行うことで、目的とするモノオール4-33が2段階収率84%で得られた。 この際の **4-39**と **4-33**の同定は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて行なった(Table 4-6: 還元末端糖を A、 非還元末端糖をBとおく。ピークの分離が悪い化学シフトは範囲を示した)。4-39と4-33の還元末 端糖 A の2, 3 位の化学シフトに注目すると、3 位はほとんど変化がないのに対して、2 位の化学 シフトが大きく低磁場シフトしており、ベンゾイル化が2位に進行したことが分かる。このことか らグリコシル化反応は3位選択的に進行したものと決定した。一方、非環元末端糖Bのアノマー位 の立体化学は、アノマー位のプロトンの結合定数にて、β体であると決定した。



Scheme 4-10

	δ (ppm) (<i>J</i> , H	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)				
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A1 (J _{1,2}) H-A2		H-B1 (J _{1,2})		
4-39 4-33	4.25-4.31 4.50-4.60	3.31-3.42 5.30	3.79 4.27	4.93 (7.7) 4.86 (7.2)		

6 位遊離水酸基を有する4糖チオ糖4-41の合成を示す(Scheme 4-11)。非還元末端の3位に遊離 水酸基を持つ2糖チオ糖4-33(1.0当量)と2糖イミデート糖4-25(1.1当量)をジクロロメタン溶媒 中、モレキュラーシーブス4A(0.5g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-50℃で、 TMSOTf(0.1当量)を用いてイミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その後、反応 を完結させるために室温まで昇温し、反応開始から2時間後にイミデート糖4-25の消失を確認し た。後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、4糖4-40が収率59%で得られた。この際、2糖 チオ糖4-33と非常に極性の近い副生成物が見られたが、2位のベンゾイル基が転位したものと考 えられる。また、2位結合体は得られていないため、転位体にグリコシル化反応は進行していない ものと考えられる。この際の4-40の立体化学は'H-NMR、'H-'H COSYを用いて確認した(Table 4-7: 還元末端糖からA、B、C、Dとおく。ピークの分離が悪い化学シフトは範囲を示した)。4糖4-40 の糖ユニットCのアノマー位のプロトンの結合定数(7.7Hz)により、β体であると決定した。続い て、4糖4-40をTHF 溶媒中、水(5.0当量)とトリ-*m*ブチルフォスフィン(3.0当量)を加える ことで6位のAZMB 基の脱保護を行った。速やかに反応は進行し、4糖4-41を収率93%で得た。



Scheme 4-11

	δ (ppm) (<i>J</i> , Hz)				
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-A1 (J _{1,2}) H-B1 (J _{1,2})		H-D1 (J _{1,2})	
4-40	4.37-4.44	4.69-4.81	4.96 (7.7)	4.55 (7.7)	

分岐 5 糖チオ糖 4-42 の合成を示す (Scheme 4-12)。 6 位に遊離水酸基を有する 4 糖チオ糖 4-41 (1.0 当量) と単糖イミデート糖 4-13⁹⁾ (2.0 当量) をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシー ブス 4A (1.0 g/mmol) 存在下混在させ脱水を行った。その後、-10 ℃で、TMSOTF (0.1 当量) を用いて イミデート基を活性化させ、グリコシル化反応を行った。その後、反応を完結させるために 0 ℃ま で昇温し、反応開始から 3 時間後に 4 糖チオ糖 4-41 の消失を確認した。後処理、ゲルろ過カラム (GPC) を含む精製後、5 糖 4-42 が収率 91%で得られた。この際の 4-42 の立体化学は ¹H-NMR、¹H-¹H COSY を用いて確認した (Table 4-8:還元末端糖から A、B、C、D、E とおく。ピークの分離が悪い化 学シフトは範囲を示した)。新たに結合が生成する 4-42 の糖ユニットEのアノマー位のプロトンの 結合定数 (7.7 Hz)により、β体であると決定した。



Scheme 4-12

	δ (ppm) (<i>J</i> , H				
compound	H-A1 (J _{1,2})	H-B1 (J _{1,2})	H-C1 (J _{1,2})	H-D1 (J _{1,2})	H-E1 (J _{1,2})
4-42	4.13-4.26	4.54-4.66	4.73-4.80	4.51 (7.7)	4.65 (7.7)

3) 直鎖の4 糖糖受容体 4-7 の合成と直鎖の8 糖、12糖、16 糖の合成

・アジドアルキル基を有する4糖糖受容体4-7の合成

アジドアルキル基を有する4糖糖受容体4-7の合成を行った(Scheme 4-13)。4糖糖受容体4-7 は脂肪鎖アルコールに対し4糖チオ糖4-28をグリコシル化させることで得る。モノトシル化され たヘキサンジオール(1.2当量)と2,3位にLev基を有する4糖チオ糖4-28(1.0当量)をジクロロ メタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(4.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃ で、ルヨードコハク酸イミド(以下NIS、1.2当量)、トリフルオロメタンスルホン酸(以下TfOH、 0.50当量)によりエチルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。開始から30分後、ヘキサ ンジオールモノトシル体の消失を確認した。後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、トシル アルキル基を有する4糖4-43が収率31%で得られた。また、エステル化されたヘキサンジオール モノトシル体が見られた。強い酸性条件では、嵩低いアルコールが糖鎖のエステル基を求核攻撃し てしまうと考えられる。この際の4-43の立体化学は¹H-NMR、¹H-¹H COSYを用いて確認した(Table 4-9:還元末端糖からA、B、C、Dとおく。糖ユニットBとC(内部の糖)は順不同)。新たに結合が 生成する4-43の糖ユニットAのアノマー位のプロトンの結合定数(7.7 Hz)により、β体であると 決定した。さらに、全てのアノマー位の結合定数がβ体を表しており(6.3~7.7 Hz)、4糖チオ糖 4-28 は全てβ結合していることを証明する結果である。続いて、トシルアルキル基を有する4糖 4-43 を DMF 溶媒中、アジ化ナトリウムを加えることでアジド基の導入を行った。室温で反応は進行 し、4 糖 4-43 の消失を確認した。後処理後、Lev 基の脱保護を行った。得られた化合物に対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えた。反応は速やかに進行し、後処理、精製を行うことで、目的と するアジドアルキル基を有するジオール 4-7 が 2 段階収率 73%で得られた。



・直鎖8糖の合成

直鎖8糖4-45の合成を行った(Scheme 4-14)。直鎖8糖4-45は2,3ジオール4糖4-7に対し 4糖チオ糖4-28をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール4糖4-7(1.0当量)と2,3 位にLev 基を有する4糖チオ糖4-28(1.1当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス 4A(2.0 g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.32当量)、TfOH(0.50 当量)によりエチルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシ ル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する8糖4-44 が収率97%、単一異性体で得られた。この際の8糖4-44の3位選択性の証明は5)位置選択性の 証明にて述べる。また、β選択性の証明は、脱保護後行うこととした。続いて、8糖4-44をピリ ジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAPを加えることで2位にアセチル基の導入を行った。速やか に反応は進行し、8糖4-44の消失を確認した。後処理後、Lev 基の脱保護を行った。8糖4-44に 対し、THF 溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えてLev 基の脱保護を行った。反応は速やかに進行し、 後処理、カラム精製を行うことで、目的とする2,3ジオール8糖4-45が2段階収率93%で得ら れた。



Scheme 4-14

直鎖12糖の合成

直鎖12糖4-47の合成を行った(Scheme 4-15)。直鎖12糖4-47は2,3ジオール8糖4-45 に対し4糖チオ糖4-28をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール8糖4-45(1.0当量)と 2,3位にLev基を有する4糖チオ糖4-28(1.2当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシー ブス4A(6.0g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.44当量)、TfOH(0.50 当量)によりエチルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシ ル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する12糖 4-46が収率88%、単一異性体で得られた。この際の12糖4-46の3位選択性の証明は「5)位置 選択性の証明」にて述べる。また、β選択性の証明は、脱保護後行うこととした。続いて、12糖 4-46をピリジン溶媒中、無水酢酸と触媒量のDMAPを加えることで2位にアセチル基の導入を行っ た。速やかに反応は進行し、12糖4-46の消失を確認した。後処理後、Lev基の脱保護を行った。 得られた化合物に対し、THF溶媒中、ヒドラジン/酢酸を加えてLev基の脱保護を行った。反応は 速やかに進行し、後処理、カラム精製を行うことで、目的とする2,3ジオール12糖4-47が2 段階収率92%で得られた。



Scheme 4-15

直鎖16糖の合成

直鎖16糖4-48の合成を行った(Scheme 4-16)。直鎖16糖4-48は2,3ジオール12糖4-47 に対し4糖チオ糖4-28をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール12糖4-47(1.0当量) と2,3位にLev基を有する4糖チオ糖4-28(1.2当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシ ーブス4A(10g/mmol)存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.44当量)、TfOH(0.70 当量)によりエチルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシ ル化反応は進行し、後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する16糖 4-48 が収率82%、単一異性体で得られた。物性変化の少ないと考えられる4糖と12糖とのグリ コシル化反応であるが、生成物である16糖との分離は可能であった。この際の16糖4-48の3 位選択性の証明は5)位置選択性の証明にて述べる。また、β選択性の証明は、脱保護後行うこと とした。なお、免疫調整機能分子の合成研究や機能評価研究のために約1gの16糖4-48を供給し た。本手法は、スケールアップにも対応できる効率的な合成法である。



Scheme 4-16

4)分岐9糖、13糖、17糖の合成

それぞれ、直鎖の4、8、12糖糖受容体に対し、分岐5糖糖供与体とのグリコシル化反応を行 うことで得る。

・分岐9糖の合成

分岐9糖4-49の合成を行った(Scheme 4-17)。分岐9糖4-49は2,3ジオール4糖4-7に対し 分岐5糖チオ糖4-42をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール4糖4-7(1.0当量)と5 糖チオ糖4-42(1.2当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(6.0g/mmol)存在下混 在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.44当量)、TfOH(0.30当量)によりエチルチオ基 を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、後処理、 ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する9糖4-49が収率89%、単一異性体で 得られた。この際の9糖4-49の3位選択性の証明は5)位置選択性の証明にて述べる。また、β 選択性の証明は、脱保護後行うこととした。



Scheme 4-17

・分岐13糖の合成

分岐13糖4-50の合成を行った(Scheme 4-18)。分岐13糖4-50は2,3ジオール8糖4-45 に対し分岐5糖チオ糖4-42をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール8糖4-45(1.0当 量)と5糖チオ糖4-42(1.5当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(6.0 g/nmol) 存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.80当量)、TfOH(0.50当量)によりエチ ルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、 後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する13糖4-50が収率79%、単 ー異性体で得られた。この際の13糖4-50の3位選択性の証明は5)位置選択性の証明にて述べ る。また、β選択性の証明は、脱保護後行うこととした。



Scheme 4-18

・分岐17糖の合成

分岐17糖4-51の合成を行った(Scheme 4-19)。分岐17糖4-51は2,3ジオール12糖4-47 に対し分岐5糖チオ糖4-42をグリコシル化させることで得る。2,3ジオール12糖4-47(1.0 当量)と5糖チオ糖4-42(1.5当量)をジクロロメタン溶媒中、モレキュラーシーブス4A(10g/nmol) 存在下混在させ脱水を行った。その後、-35℃で、NIS(1.80当量)、TfOH(0.30当量)によりエチ ルチオ基を活性化させグリコシル化反応を行った。その結果、速やかにグリコシル化反応は進行し、 後処理、ゲルろ過カラム(GPC)を含む精製後、2位遊離水酸基を有する17糖4-51が収率82%、単 ー異性体で得られた。物性変化の少ないと考えられる5糖と12糖とのグリコシル化反応であるが、 生成物である17糖との分離は可能であった。この際の17糖4-51の3位選択性の証明は5)位 置選択性の証明にて述べる。



Scheme 4-19

5) 位置選択性の確認

βグルカンはグルコースの繰り返し構造を有する糖鎖であるため、長鎖になるほどその構造決定 は難しい。特に、本章での、直鎖8糖、12糖、16糖や分岐9糖、13糖、17糖における完全 な構造の帰属は非常に難しい。そこで、化学合成においては、選択性を伴う反応ごとに証明をする ことが望ましい。本項では3位選択的グリコシル化反応後の位置選択性の証明について述べる。ま た、β結合の証明に関しては、アノマー位の結合定数が保護基の影響を受けやすいため、脱保護を 行うことで証明する(次項)。 すでに直鎖4糖糖供与体 4-28 と分岐5 糖糖供与体 4-42、直鎖4 糖糖受容体 4-7 の主鎖がβ(1, 3)結合していることの証明はなされているので、直鎖8 糖 4-44 と分岐9 糖 4-49 の主鎖(1,3) 結合の証明は、新たに生成した結合の3位選択性を証明できれば良いことになる。さらに、直鎖8 糖 4-44 の(1,3)結合の証明がなされれば、直鎖12糖 4-46 と分岐13糖 4-50 の主鎖(1, 3)結合の証明は、新たに生成した結合の3位選択性を証明できれば良いことになる。同様に、直 鎖12糖 4-46 の(1,3)結合の証明がなされれば、直鎖16糖 4-48 と分岐17糖 4-51 は新た に生成した結合の3位選択性を証明できれば良い。

今回、位置選択的グリコシル化反応後において、残る遊離水酸基に着目した。2次元NMR(¹H-¹H COSY)において、遊離水酸基のプロトンと2位のプロトンが相関していることを証明できれば、遊離水酸基は2位のものであることがわかり、3位選択的にグリコシル化反応が進行したことが証明できる(Figure 4-10)。それぞれの糖鎖は非常に複雑な¹H-NMRのピークを呈するが、水酸基の化学シフトは濃度や温度によって値を変化させることができ、検出可能であると考えた。手順について述べる。



Figure 4-10

(1) 重水素化による水酸基の¹H-NMR ピークの消失から、水酸基のピークであることを証明する。 (2)¹H-¹H COSY により、水酸基と相関しているピークを探し、その帰属をする(2位または3位)。

この手法を用いることで、直鎖8糖、12糖、16糖や分岐9糖、13糖、17糖の主鎖構造が 全て(1,3)結合でつながっていることを証明した。ここでは、特に複雑な¹H-NMRのピークを呈 する分岐17糖について示す。その他の糖鎖は章末の実験項のNMRに詳細を載せた。

(1) 重水素化による水酸基の証明

分岐17糖4-51における通常の¹H-NMR チャートを Figure 4-11上に、重水を添加して重水素化 を行ったチャートを Figure 4-11下に示す。Figure 4-11を比べると重水素化を行ったチャートに おいて、2.35 ppm 付近のピークが消失した(Figure 4-12 拡大)。この結果から、2.35 ppm のピー クは遊離水酸基であることが証明された。



Figure 4-11



Figure 4-12

(2)¹H-¹H COSY による、水酸基と相関するピークの帰属

分岐17糖4-51の¹H-¹H COSY チャートを Figure 4-13 に示す。2.35 ppmの水酸基プロトンピー クに相関するピークとして2.65 ppm 付近のピークが挙げられる。このピークは¹H-¹H COSY のデー タから2位のプロトンピークであることが分かっており、遊離水酸基が2位のものであることを証 明する結果である。

この結果から、分岐17糖4-51の合成反応である、2,3ジオール12糖4-47と5糖チオ糖4-42 の位置選択的グリコシル化反応は3位選択的であったことが証明された。



Figure 4-13

6) 脱保護の検討

本項では、直鎖8糖4-44、12糖4-47、16糖4-48、および、分岐9糖4-49、13糖4-50、 17糖4-51の脱保護を検討する。合成した分岐糖には分岐鎖に多くのベンジル基が用いられてい るため、固-液反応である固相脱保護において外れ切らない可能性がある。そこで、直接Birch 還 元反応を行う、液-液反応にて脱保護を試みることにした。液相にて脱保護反応を行う上で、糖鎖 の凝集化による反応の停止、および、高極性糖鎖の取り扱いの難しさが問題点として残る。それぞ れについて考察する。
(1) 糖鎖の凝集化

今回の糖鎖はベンジリデン保護基とベンジル基、エステル基、アジド基を有している。このうち Birch 還元において外れるのはベンジリデン保護基とベンジル基、アジド基(アミノ基に変換)で ある。結晶性が高い芳香環保護基が先に外れるため、凝集化防止が期待できる。また、アジド基は 還元されやすく、生成したアミノ基が液体アンモニア溶媒において高い溶解性を発揮すると期待で きる。また、通常のBirch 還元は低温で行うため(-78~-35 ℃)に基質の低溶解性が予想されるが、 室温で反応が行えるエチレンジアミン溶媒を用いたBirch 還元(ベンケサー還元)も検討する。

(2) 高極性糖鎖の取り扱い

糖鎖を液相において Birch 還元する際、反応後の大量の金属塩と水溶性糖鎖の分離の問題が挙げ られる。3章において8糖および12糖、16糖メチルグリコシド体は順に疎水性が上がり、逆相 カラム (Bond Elut-C18) により容易に精製が可能であった。本章で合成した糖鎖においてもBirch 還元による金属塩との分離が可能であると推測できる。また、ゲルろ過カラムや陽イオン交換樹脂 を用いることで金属塩との分離を図る。

以上を踏まえ、液相 Birch 還元による脱保護の検討を行った(Scheme 4-20(17糖)上)。それぞ れの糖鎖(直鎖8糖4-44、12糖4-47、16糖4-48、および、分岐9糖4-49、13糖4-50、1 7 糖 4-51) に対し、THF、EtOH 混合溶媒中、反応容器を-78 ℃へと冷却し、液体アンモニアの導入 を行った。EtOH はプロトン供与体であり、Birch 還元の反応性を向上させる目的で加えた。混合溶 媒は液体アンモニア/THF/EtOH = 8.5/1/0.5の反応容器とし、-78 ℃条件下リチウム(100 mg)を加 えた。溶液が濃青色を呈しラジカルの発生を確認後、アンモニア還流条件下1.5時間反応を行った。 反応溶液に対し、MeOH を加えることでラジカルを消失させ、室温で 12 時間攪拌することでエステ ル基の脱保護を行った。減圧下溶媒を飛ばし、大量のリチウム塩と脱保護された糖鎖を確認した。 この際、陽イオン交換樹脂(DOWEX™50WX8)を用いてある程度リチウムイオンを除き、その後、ゲ ルろ過カラムにより塩と低分子の副生成物を除くことにした。しかしながら、少量であるが強塩基 条件下において陽イオン交換樹脂に基質が取り込まれた。糖鎖の末端アミンを介して陽イオン交換 樹脂の硫酸基と静電吸着したものと考えられる。続いて、ゲルろ過カラムにより塩と低分子の副生 成物をある程度除き、逆相カラム(Bond Elut-C18)により精製を行った。いずれの糖鎖も逆相カ ラムによって保持され、精製可能であった。それぞれの収率は、直鎖8糖**4-3**(43%)、12糖**4-2**(90%)、 16糖4-1 (80%)、および、分岐9糖4-6 (quant.)、13糖4-5 (81%)、17糖4-4 (51%)である。 この際、17糖においてベンジル基が外れ残った副生成物が見られた。そこで、より強力な還元反 応であるベンケサー還元の検討を行った(Scheme 4-20 下)。17糖 4-51 に対し、THF、エチレンジ アミン (EDA) 混合溶媒中(THF/EDA = 1/9)、0 ℃でリチウム(100 mg)を加えた。溶液が濃青色を呈 しラジカルの発生を確認した。反応開始後、TLC 解析を行ったところ、系中が複雑化していた。目 的の17糖 4-4 よりも高極性の生成物が見られたことから、基質が損壊したものと考えられる。そ の後、反応を続けるも、TLC 上の生成物に収束は見られなかった。



Scheme 4-20

以上の検討により、全ての糖鎖の脱保護に成功した。糖鎖の立体化学は、¹H-NMR によるアノマー 位のプロトンの結合定数にて全てβ体であることを確認した(直鎖8糖4-3(4.44~4.76 ppm、7.7 Hz)、12糖4-2(4.44~4.76 ppm、7.7~8.2 Hz)、16糖4-1(4.45~4.77 ppm、7.7 Hz)、およ び、分岐9糖4-6(4.44~4.80 ppm、7.7 Hz)、13糖4-5(4.45~4.76 ppm、7.7~8.7 Hz)、17 糖4-4(4.44~4.76 ppm、7.7 Hz))。前項の結果と併せて、合成した糖鎖の主鎖が全てβ(1,3) 結合していることが証明された。構造が証明されたこれらの糖鎖は、βグルカンの機能を解明する ための有用なケミカルプローブになると期待できる。

4-5 結合試験および免疫活性化試験

3章において直鎖 β (1,3) 16糖メチルグリコシド体では、天然 β グルカン (SPG) とデク チン1との結合に対する阻害作用は見られなかった。Williams らの報告では、 β (1,6) 分岐鎖 糖は直鎖糖よりも飛躍的にリガンドとしての能力が上がることを主張しており、今回合成した17 糖をはじめとする β (1,6) 分岐鎖糖は阻害作用能を有する可能性がある。本節では β グルカン 糖鎖を微粒子上に束ねた免疫調整機能分子の合成を行う上で、担持糖鎖の評価を行った。

4-5-1 競合阻害活性試験

得られた直鎖8糖、12糖、16糖、および、分岐9糖、13糖、17糖(4-1~4-6)の、SPG とデクチン1との結合に対する競合阻害試験を行った。測定結果をFigure 4-14に示す。横軸はSPG および合成βグルカンオリゴ糖鎖の濃度であり、縦軸は吸光度である。一定の吸光度を表す(一定 量のデクチン1とSPGとの結合を阻害する)ために必要なオリゴ糖鎖の濃度が少ないほど、デクチ ン1に強く結合する。測定結果より、直鎖16糖4-1、分岐17糖4-4が、SPGの10分の1程度の 強い結合作用を示すことを見出した。分子量3千弱の糖鎖が、平均分子量45万の天然β(1,3) グルカンの10分の1の結合能を有することは非常に興味深い結果である。16糖メチルグリコシ ド体では阻害作用が確認できなかったため、末端のアミノアルキル基が結合の関与や溶解性の向上 など、何らかの役割を担っていることが示唆された。実際に、アミノアルキル体はメチルグリコシ ド体よりも溶解性が高かった。一方、13糖4-5、12糖4-2が、その順で弱いながら競合阻害作 用を示した。



Figure 4-14

4-5-2 NMR を用いる結合様式の検討

デクチン1に対するリガンドの供給が可能となったので、結合様式を解明することとした。直鎖 16糖4-1とデクチン1との結合様式を、飽和移動差NMR (STD-NMR)¹⁰⁾を用いて解析した。16糖 メチルグリコシド体は結合が確認できず、アミノアルキル基を有する16糖4-1では阻害作用が見 られたことから、その結合様式は非常に興味深い。STD-NMRは、高分子タンパク質と低分子リガン ドの直接的な相互作用を解析できる方法である(Figure 4-15)。特に、そのため、複合体形成の平 衡定数が比較的小さいリガンドにおいても、その結合部位を明らかにすることができる特徴を有し ている。本手法では、タンパク質とそのリガンドの混合溶液中のタンパク質のシグナルを照射して 飽和させる。その結果、複合体形成したリガンドにタンパク質からリガンドへ飽和移動が起こる。 タンパク質に面したリガンドの水素への飽和移動が大きいため、結合に関与している部分の水素の シグナルが、そうでない部分のシグナルより大きく現れる。また、解離平衡速度が十分速い場合に は、そのシグナルの影響をうけた分子の数が増幅されるため、NMRによって観測が容易になる。得 られたスペクトルと通常の手法で測定したスペクトルを比較することにより、リガンドのどの部分 がタンパク質との結合に関与しているかを明らかにする。





本測定は、理化学研究所山口芳樹博士の指導のもと行なった。結果を以下に示す。まず始めに、 デクチン1に直鎖16糖4-1を添加しながら¹H-NMRによりタンパク質のシグナル変化を追跡した。 その結果、シグナルに顕著な変化は見られず、¹H-NMR で測定され得るほど結合力は強くないと考 えられる。続いて、デクチン1存在下、直鎖16糖4-1のSTD-NMRを測定した。具体的な測定方法 としては以下の条件で行った。

・デクチン1 (10 µM):1 6 糖 4-1 = 1:25、PBS buffer (pH 7.4)、10^sD₂0 としてサンプルの調整を 行い、5 ℃において測定を行った。

・1H-NMR において16糖 4-1のシグナルはないがデクチン1のシグナルが存在する領域に、飽和させるためのパルスを連続して照射させ(16糖 4-1のシグナルは5 ppm以下に存在。デクチン1の

アミド、アロマティック領域である 7.5 ppm に 25 Hz の強度で 60 回連続照射)、スペクトルを測定 する。

・飽和移動がおこらない領域(タンパク質や糖鎖のピークが存在しない領域:40 ppm)において、 同じ条件で照射したスペクトルを測定する。

・両者の差スペクトルである STD シグナルを得た。

500 MHz の NMR を用いて測定した結果、直鎖16糖4-1の糖鎖ピークの領域(約3.1~3.7 ppm) において、差スペクトルのシグナルが観測され、デクチン1と直鎖16糖4-1が直接結合すること を確認した(Figure 4-16: 500 MHz)。また、アミノアルキル基は差スペクトルのシグナルが観測 されず、直接結合に関与しないことが明らかになった(アルキルプロトン a~f 消失)。



Figure 4-16

続いて、より詳細に結合様式を解析するために、600 MHz の NMR を用いて STD-NMR を測定し、¹H-NMR のスペクトルを重ねることでスペクトルの増減を比較した(Figure 4-17: 600 MHz)。その結果、 STD-NMR スペクトルにおける糖鎖の3位のプロトンのシグナル強度が¹H-NMR スペクトルと比較して 増加した。すなわち、直鎖16糖4-1において特に3位のプロトンがデクチン1と強く相互作用し

ていることが明らかになった。また、非還元末端のグルコースユニットのプロトンシグナル強度が 減少しており、デクチン1との結合にはあまり関与していないものと考えられる。



Figure 4-17

以上の結果より、デクチン1と直鎖16糖4-1との結合について考察する。

通常、3位のプロトンはβグルカン糖鎖のらせん分子の内側を巻いており(3章初めの16糖の 計算結果、および、X線データより)、デクチン1と結合する際にらせんが解けながら相互作用して いるものと考えられる。このことから予想するに、16糖4-1は3位のプロトンがデクチン1に接 しながら挟み込むように結合しているのではないだろうかと考えている。また、アルキルアミノ基 は結合に直接関与せず、溶解性の向上に寄与したものではないかと考えている(3章における16 糖メチルグリコシド体よりも水溶性高い)。

本結果より、本 β グルカン類縁体は、糖鎖部位でデクチン1と結合しており、天然の β グルカンの結合様式を解明する上でも非常に有用なプローブとなることが明らかになった。

4-5-3 免疫活性化試験

得られた直鎖8糖、12糖、16糖、および、分岐9糖、13糖、17糖(4-1~4-6)の、デク チン1およびそのシグナルシステムを導入した細胞を用いる免疫活性化作用について検証した。デ クチン1と結合する分子を発見したことから、生理活性を発現する可能性も考えられる。免疫反応 において中心的役割を果たす転写因子 NF-кB の活性化試験を行った。デクチン1を介する免疫シグ ナル系を導入した 293T 細胞を用いて NF-kB 活性化の評価を Dual-Luciferase assay を用いて行っ た。測定結果を Figure 4-18 に示す。横軸は SPG および合成 β グルカンオリゴ糖鎖の濃度であり、 縦軸は NF-κB にアシストされるホタルルシフェラーゼとチミジンキナーゼ (TK) プロモーターにア シストされるウミシイタケルシフェラーゼ(バックグラウンド)の比である。内部コントロールの 活性で標準化することにより、外的影響が低減され、実験データ解釈の信頼性を高めることができ る。測定結果より、結合作用が見られた16糖4-1、17糖4-4には、デクチン1を介した免疫活 化作用を有することを見出した¹¹⁾。しかしながら、その活性強度は、結合作用より予想されるもの よりも小さい。本結果より、免疫作用の活性化には、糖鎖の結合だけでなく、標的タンパク質同士 の集合化などの工程が必要であることを示していると考えている。また、13糖以下(4-2、4-3、 4-5、4-6) では活性化が行われなかった。今回の Figure には載せていないが、3章において合成 したメチルグリコシド体16糖、12糖、8糖の免疫活性化作用についても検証を行ったところ、 いずれも活性化作用を示さなかった。デクチン1の免疫活性化作用発現と結合には密接な関係があ ることがわかった。



Figure 4-18

続いて、デクチン1と同様に自然免疫活性化に関係している受容体タンパク質 TLR4 を用いて直

鎖8糖、12糖、16糖(4-1~4-3)の免疫活性化試験を行った。TLR4はLPS(リポ多糖)の受容体として知られている。合成したオリゴ糖とLPS(0.5 μ g/ml)を作用させ、LPSによるNF- κ B活性化の増強および、抑性について評価を行った。測定結果をFigure 4-19に示す(8糖(G8-NH2)、12糖(G12-NH2)、16糖(G16-NH2))。その結果、TLR4遺伝子導入293T細胞における、LPSによるNF- κ B活性化においては、どの糖鎖においても、増強も抑制も示さなかった。この結果から、16糖4-1はデクチン1に特異的に活性を誘導する可能性を示した。



Figure 4-19

4-6 まとめ

デクチン1を介した免疫調整機能分子の合成を目指し、βグルカン糖鎖を微粒子上に束ねた糖鎖 微粒子の開発を行うこととした。本章では、微粒子への固定化を見据えたオリゴ糖鎖の設計とその 類縁体合成法の開発を行い、その生物評価を行った。この際、直鎖糖および分岐鎖を有する糖鎖の、 糖鎖長に関わる効率的な類縁体合成法の開発を行った。4糖チオ糖および5糖チオ糖を合成し、こ の二つの組み合わせによって様々な糖鎖を合成可能であると考えた。この際、3章において開発し た2,3ジオール糖受容体の設計と、イミデート糖とチオ糖の化学選択的グリコシル化反応を用い て効率的かつ収率良く、直鎖の8糖、12糖、16糖、および、分岐の9糖、13糖、17糖を合 成することに成功した。免疫調整機能分子の合成研究や機能評価研究を見据えて、本合成手法を用 いて16糖保護体を約1g供給し、大量合成にも適応可能であることを示した。続いて、合成βグ ルカンオリゴ糖の、SPG とデクチン1との結合に対する競合阻害試験を行った。その結果、直鎖1 6 糖および分岐17糖に強い阻害作用を見出した。デクチン1のリガンドを開発することができた ので、アミノアルキル基を有する直鎖16糖とデクチン1との結合様式を STD-NMR を用いて解析し た。その結果、糖鎖部位でデクチン1と結合していることが分かり、特に3位のプロトンと強く相 互作用していることが明らかとなった。このことから、天然の β グルカンの結合様式を解明する 上でも非常に有用なプローブとなることが明らかになった。さらに、免疫活性化試験を行ったとこ ろ、結合作用を示した直鎖16糖と分岐17糖が、デクチン1を介して免疫活性化することを示し た。さらに直鎖16糖は他の受容体タンパク質 TLR4 を介する免疫活性化に影響を与えなかった。 以上から、直鎖16糖はデクチン1特異的に活性を誘導する可能性を示し、デクチン1を介した生 物プロセスの過程を解析するための有用なケミカルプローブになると期待できる。

4-7 基質の合成

単糖供与体 **4-18** の合成について述べる (Scheme 4-21)。2、3位に遊離水酸基を有する **4-21** に対し、ジクロロメタン溶媒中、レブリン酸 (2.2 当量)と縮合剤 EDCI (2.2 当量)、触媒量の DMAP を加えて、2,3位に Lev 基の導入を行い、定量的に Lev 体 **4-18** を得た。



Scheme 4-21

単糖供与体 4-38 の合成について述べる (Scheme 4-22)。6位に遊離水酸基を有する 4-53¹²⁾に対 しジクロロメタン溶媒中 AZMBC1 (3.32 当量)と触媒量の DMAP を加えて、6位に AZMB 基の導入を行 い、収率 92%で AZMB 体 4-54 を得た。続いて、得られた 4-54 に対しアセトン、水混合溶媒中、NBS (1.2 当量)を加えることで、収率 76%でラクトール 4-55 を得た。最後に、ラクトール 4-55 に対しジクロ ロメタン溶媒中、トリクロロアセトニトリル (5.0 当量)と炭酸セシウム (0.1 当量)を加えることで、 収率 93%で単糖供与体 4-38 を得た。



References

- Adams, E. L.; Rice, P. J.; Graves, B.; Ensley, H. E.; Yu, H.; Brown, G. D.; Gordon, S.; Monteiro, M. A.; Papp-Szabo, E.; Lowman, D. W.; Power, T. D.; Wempe, M. F.; Williams, D. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, *325*, 115-123.
- 2) Mukaiyama, T.; Murai, Y.; Shoda, S. Chem. Lett. 1981, 431-432.
- a) Suzuki, K.; Maeta, H.; Matsumoto, T.; Tsuchihashi, G. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 3571-3574.
 - b) Suzuki, K.; Maeta, H.; Matsumoto, T. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4853-4856.
- 4) Crich, D.; Smith, M. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 9015-9020.
- 5) Wang, C.; Wang, H.; Huang, X.; Zhang, L.H.; Ye, X.S. Synlett 2006, 2846-2850.
- 6) Ennis, S. C.; Gridley, J. J.; Osborn, H. M. I.; Spackman, D. G. Synlett 2000, 1593-1596.
- 7) Premathilake, H. D.; Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. J. Org. Chem. 2010, 75, 1095-1100.
- 8) Wada, T.; Ohkubo, A.; Mochizuki, A.; Sekine, M. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 1069-1072.
- 9) Okada, Y.; Nagata, O.; Taira, M.; Yamada, H. Org. Lett. 2007, 9, 2755-2758.
- 10) Mayer, M.; Meyer, B. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 6108-6117.
- 11) Tanaka, H.; Kawai, T.; Adachi, Y.; Ohno, N.; Takahashi, T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8249-8251.
- 12) Takahashi, T.; Okano, A.; Amaya, T.; Tanaka, H.; Doi, T. Synlett 2002, 911-914.

Ethylthio 4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranoside (4-18)

To a stirred solution of ethylthio 4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranoside (4-21) (9.50 g, 30.4 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (60.8 mL) was added EDCI-HCl (12.8 g, 66.9 mmol, 2.20 eq.), levulinic acid (6.85 mL, 66.9 mmol, 2.20 eq.) and a catalytic amount of DMAP (371 mg, 3.04 mmol, 0.100 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed silica gel with 80:20 toluene:ethyl give ethylthio on acetate to 4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D- glucopyranoside (4-18) (15.4 g, 30.3 mmol, quant.).

 $[α]_D^{24} = -74.7$ (c = 1.20, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.45 (m, 2H, aromatic), 7.33-7.36 (m, 3H, aromatic), 5.50 (s, 1H, benzylidene), 5.36 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 5.06 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.56 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.36 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.77 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.68 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.55 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 2.52-2.87 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.17 (s, 3H, Lev), 2.13 (s, 3H, Lev), 1.26 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.3, 206.2, 171.8, 171.5, 136.8, 129.0, 128.2, 126.2, 101.4, 84.2, 78.4, 72.6, 70.8, 70.5, 68.5, 37.8 x 2, 29.7 x 2, 27.9, 24.3, 23.5, 14.9; IR (solid): 2971, 2873, 1746, 1718, 1369, 1208, 1152, 1080, 1026, 918, 753, 701, 544 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₅H₃₆NO₉S [M+NH₄]⁺ m/z = 526.2111, found: 526.2112.



4,6-O-Benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-D-glucopyranose (4-19)

To a stirred solution of ethylthio 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranoside (**4-18**) (102 mg, 0.201 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (2.01 mL) was added benzenesulfinyl morpholine (46.7 mg, 0.221 mmol, 1.10 eq.) and Tf₂O (40.6 µl, 0.241 mmol, 1.20 eq.) at -40 °C. After being stirred at the same temperature for 5 min, the reaction mixture was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in CH_2Cl_2 (2.00 mL) was added triethylamine (0.500 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was

concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 40:60 hexane:ethyl acetate to give 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-D-glucopyranose (**4-19**) (89.9 mg, 0.194 mmol, 2 steps 96%, $\alpha:\beta = 61:39$). The $\alpha:\beta$ ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.46 (m, 10H, aromaticαβ), 5.63 (dd, 1H, H-3α, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 5.50 (s, 2H, benzylideneαβ), 5.40 (br-d, 1H, H-1α, $J_{1,2} = 2.4$ Hz), 5.37 (dd, 1H, H-3β, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 4.89-4.93 (m, 2H, H-2α, H-2β), 4.82 (br-d, 1H, H-1β, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.37 (dd, 1H, H-6aβ, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.30 (dd, 1H, H-6aα, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.18 (ddd, 1H, H-5α, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 3.95 (br-s, 1H, OHβ), 3.52-3.83 (m, 6H, H-4α, H-4β, H-5β, H-6bα, H-6bβ, OHα), 2.50-2.84 (m, 16H, Levαβ), 2.14-2.19 (m, 12H, Levαβ); IR (solid): 3457, 2920, 2871, 1758, 1391, 974, 919, 769, 648, 509 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₃H₃₂NO₁₀ [M+NH₄]⁺ m/z = 482.2026, found: 482.2027.



O-(4,6-O-Benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (4-16)

To a stirred solution of 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-D-glucopyranose (**4-19**) (31.7 g, 68.3 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (68.3 mL) was added trichloroacetonitrile (20.5 mL, 205 mmol, 3.00 eq.) and a catalytic amount of Cs₂CO₃ (222 mg, 0.683 mmol, 0.0100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 60:40 hexane:ethyl acetate to give *O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (**4-16**) (39.7 g, 65.2 mmol, 96%, α : β = 50:50). The α : β ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H, NHβ), 8.67 (s, 1H, NHα), 7.35-7.47 (m, 10H, aromaticαβ), 6.50 (d, 1H, H-1α, $J_{1,2} = 3.9$ Hz), 5.96 (d, 1H, H-1β, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 5.69 (dd, 1H, H-3α, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 5.54 (s, 1H, benzylideneα), 5.52 (s, 1H, benzylideneβ), 5.42 (dd, 1H, H-3β, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 5.32 (dd, 1H, H-2β, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 5.19 (dd, 1H, H-2α, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz), 4.43 (dd, 1H, H-6αβ, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-6αα, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.12 (ddd, 1H, H-5α, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 3.70-3.85 (m, 5H, H-4α, H-4β, H-5β, H-6bα, H-6bβ), 2.49-2.84 (m, 16H, Levαβ), 2.14-2.16 (m, 12H, Levαβ); IR (solid): 3316, 2920, 1751, 1718, 1677, 1364, 1146, 921, 797, 648 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₅H₃₂N₂O₁₀ [M+NH₄]⁺ m/z = 625.1123, found: 625.1124.



Ethylthio

$4, 6-\textit{O}-benzylidene-3-\textit{O}-(4, 6-\textit{O}-benzylidene-2, 3-di-\textit{O}-levulinoyl-}\beta-D-glucopyranosyl)-}\beta-D-glucopyranoside (4-22)$

A mixture of ethylthio 4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranoside (4-21) (6.99 g, 22.4 mmol, 1.10 eq.), O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (4-16) (12.4 g, 20.4 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (20.0 g) in dry CH_2Cl_2 (407 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -40 °C. A catalytic amount of trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (0.369 mL, 2.04 mmol, 0.100 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 48:52 hexane:ethyl 4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-Dacetate to give ethylthio glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-22)(10.6)g, 14.0 mmol, 69%) and ethylthio 4,6-O-benzylidene-2-O -(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-24) (0.994 g, 1.31 mmol, 6%).

$\beta(1,3)$ isomer (4-22)

[α]_D²⁴ = -54.0 (c = 1.03, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.51 (m, 10H, aromatic), 5.55 (s, 1H, benzylidene), 5.44 (s, 1H, benzylidene), 5.33 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 5.10 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz), 4.85 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.47 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.36 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.28 (d, 1H, OH, $J_{A-2,OH} = 4.8$ Hz), 4.20 (dd, 1H, B-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.73-3.79 (m, 3H, A-3, A-6b, B-6b), 3.68 (dd, 1H, B-4, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.59-3.64 (m, 2H, A-2, A-4), 3.41-3.49 (m, 2H, A-5, B-5), 2.44-3.01 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.22 (s, 3H, Lev), 2.13 (s, 3H, Lev), 1.32 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 208.9, 206.3, 171.7 x 2, 137.4, 136.9, 129.1 x 2, 128.3, 128.2, 126.3, 126.1, 103.1, 101.5, 101.0, 87.0, 84.7, 79.2, 78.3, 72.8, 72.4, 71.9, 70.9, 68.7, 66.3, 37.8, 30.1, 29.8, 27.9, 27.7, 24.3, 15.1; IR (solid): 3488, 2868, 2457, 2272, 1719, 1387, 1147, 1106, 917, 693, 524 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₈H₅₀NO₁₄S [M+NH₄]⁺ m/z = 776.2952, found: 776.2944.



 $\beta(1,2)$ isomer (4-24)

[α]_D²⁶ = -65.8 (c = 1.14, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34-7.52 (m, 10H, aromatic), 5.53 (s, 1H, benzylidene), 5.49 (s, 1H, benzylidene), 5.35 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 5.04-5.11 (m, 2H, B-1, B-2), 4.52 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.31-4.38 (m, 2H, A-6a, B-6a), 3.93 (ddd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{3,0H} = 3.9$ Hz), 3.81-3.87 (m, 2H, B-6b, OH), 3.71-3.76 (m, 2H, B-4, A-6b), 3.65 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 3.48-3.54 (m, 2H, A-4, B-5), 3.44 (ddd, 1H, A-5, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 2.46-2.84 (m, 10H, Lev, SC*H*₂CH₃), 2.19 (s, 3H, Lev), 2.13 (s, 3H, Lev), 1.28 (t, 3H, SCH₂C*H*₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 208.0, 206.3, 171.8, 171.5, 137.2, 136.9, 129.2, 129.1, 128.3, 128.2, 126.4, 126.2, 101.8, 101.7, 101.5, 84.1, 80.4, 80.3, 78.2, 75.2, 72.7, 71.9, 70.3, 68.7, 68.5, 66.3, 37.8 x 2, 29.9, 29.8, 27.9, 24.4, 14.7; IR (solid): 3425, 2856, 2351, 1742, 1706, 1368, 1307, 1154, 1097, 971, 749, 698, 547 cm⁻¹.



Ethylthio

$\label{eq:2-0-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D$-glucopyranosyl})-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D$-glucopyranosyl}-β-D$-glucopyranosyl}-$\beta$-D}-glucopyranosyle-$\beta$-D}-glucopyran$

To a stirred solution of ethylthio 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-22**) (1.02 g, 1.34 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (6.70 mL) was added benzoyl chloride (0.471 mL, 4.02 mmol, 3.00 eq.) and a catalytic amount of DMAP (16.4 mg, 0.134 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at 120 °C for 4 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 97:3 toluene:acetone to give

ethylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl) -β-D-glucopyranoside (**4-23**) (1.11 g, 1.28 mmol, 96%).

 $[\alpha]_D^{24} = -42.7$ (c = 1.05, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.32-7.65 (m, 13H, aromatic), 5.57 (s, 1H, benzylidene), 5.38 (s, 1H, benzylidene), 5.31 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 5.08 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 5.01 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.70 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.60 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.38 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.24 (dd, 1H, B-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.24 (dd, 1H, B-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 3.75 (dd, 1H, A-4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.68 (dd, 1H, B-6b, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 3.63 (dd, 1H, B-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.56 (dd, 1H, A-5, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 3.37 (ddd, 1H, B-5, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.56 (ddd, 1H, A-5, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 2.08 (s, 6H, Lev), 1.20 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4 x 2, 171.8, 171.5, 165.1, 137.3, 136.9, 133.6, 129.9, 129.6, 129.2, 129.1, 128.8, 128.3, 128.2, 126.2, 126.1, 101.4, 101.2, 101.1, 84.4, 79.6, 78.9, 78.4, 72.2, 71.9, 71.8, 71.2, 68.6, 66.3, 37.9, 37.8, 29.7 x 2, 28.0, 27.5, 24.1, 14.8; IR (solid): 2972, 1753, 1717, 1401, 1364, 1149, 1095, 1015, 917, 751, 698, 540 cm⁻¹.



2-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-D-glu copyranose (4-52)

To a stirred solution of ethylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O* -levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-23**) (103 mg, 0.119 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (1.19 mL) was added benzenesulfinyl morpholine (27.8 mg, 0.131 mmol, 1.10 eq.) and Tf₂O (24.0 µl, 0.143 mmol, 1.20 eq.) at -50 °C. After being stirred at the same temperature for 5 min, the reaction mixture was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in CH_2Cl_2 (2.00 mL) was added triethylamine (0.500 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was

concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone to give 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)-D-glucop yranose (**4-52**) (84.2 mg, 0.103 mmol, 2 steps 86%, α : β = 66:34). The α : β ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04-8.07 (m, 4H, aromaticαβ), 7.31-7.64 (m, 26H, aromaticαβ), 5.55 (s, 1H, benzylideneα), 5.53 (s, 1H, benzylideneβ), 5.46 (br-s, 1H, A-1α), 5.37 (s, 1H, benzylideneα), 5.35 (s, 1H, benzylideneβ), 5.06-5.17 (m, 4H, A-2α, A-2β, B-3α, B-3β), 4.98-5.03 (m, 2H, B-2α, B-2β), 4.85 (d, 1H, B-1α, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.78 (dd, 1H, A-1β, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{1,OH} = 8.7$ Hz), 4.75 (d, 1H, B-1β, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.44 (dd, 1H, A-3α, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 4.34 (dd, 1H, A-6αβ, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.11-4.30 (m, 6H, A-3β, A-5α, A-6αα, B-6αβ, OHβ), 3.89 (d, 1H, OHα, $J_{1,OH} = 2.4$ Hz), 3.59-3.81 (m, 8H, A-4α, A-4β, B-4α, B-4β, A-6bα, A-6bβ, B-6bα, B-6bβ), 3.38-3.54 (m, 3H, A-5β, B-5α, B-5β), 2.01-2.71 (m, 28H, Levαβ); IR (solid): 3493, 2921, 2862, 2056, 1895, 1709, 1601, 1413, 1265, 975, 772, 672, 534 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₃H₅₀NO₁₆ [M+NH₄]⁺ m/z = 836.3130, found: 836.3127.



$O-(2-O-Benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(4, 6-O-benzylidene-2, 3-di-O-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-D-glucopyranosyl) trichloroacetimidate (4-25)$

To a stirred solution of 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose (**4-52**) (4.34 mg, 5.30 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (26.5 mL) was added trichloroacetonitrile (2.66 mL, 26.5 mmol, 5.00 eq.) and a catalytic amount of Cs₂CO₃ (173 mg, 0.530 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 94:6 toluene:acetone to give *O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (**4-25**) (4.86 g, 5.06 mmol, 96%, α : β = 84:16). The α : β ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 1H, NHβ), 8.57 (s, 1H, NHα), 7.99-8.03 (m, 4H, aromaticαβ), 7.33-7.64 (m, 26H, aromaticαβ), 6.61 (d, 1H, A-1α, $J_{1,2} = 4.3$ Hz), 6.05 (d, 1H, A-1β, $J_{1,2} = 7.2$ Hz), 5.62 (s, 1H, benzylideneα), 5.60 (s, 1H, benzylideneβ), 5.56 (dd, 1H, A-2β, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 7.7$ Hz), 5.37-5.40 (m,

3H, A-2 α , benzylidene $\alpha\beta$), 5.13-5.18 (m, 2H, B-3 α , B-3 β), 5.02-5.08 (m, 2H, B-2 α , B-2 β), 4.84 (d, 1H, B-1 α , $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.77 (d, 1H, B-1 β , $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.44-4.48 (m, 2H, A-3 α , A-6 $\alpha\beta$), 4.37 (dd, 1H, A-6 $\alpha\alpha$, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.22-4.26 (m, 2H, A-3 β , B-6 $\alpha\beta$), 4.11 (ddd, 1H, A-5 α , $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.1$ Hz), 3.96 (dd, 1H, A-4 β , $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.63-3.88 (m, 8H, A-4 α , B-4 α , B-4 β , A-5 β , A-6 $b\alpha$, A-6 $b\beta$, B-6 $b\alpha$, B-6 $b\beta$), 3.51 (ddd, 1H, B-5 α , $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.6$ Hz), 3.20 (dd, 1H, B-5 α , $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.42 (ddd, 1H, B-5 β , $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 10.6$ Hz), 2.06-2.75 (m, 28H, Lev $\alpha\beta$); IR (solid): 2886, 1720, 1368, 1142, 959, 793, 664, 530 cm⁻¹.



Ethylthio

2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-26)

To a stirred solution of ethylthio 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-23**) (4.03 g, 4.67 mmol, 1.00 eq.) in THF (50.0 mL) was added acetic acid (5.00 mL) and hydrazine monohydrate (2.00 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 89:11 toluene:acetone to give ethylthio 2-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-26**) (3.09 g, 4.63 mmol, 99%).

[α]_D²⁴ = -49.6 (c = 1.05, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.31-7.61 (m, 13H, aromatic), 5.61 (s, 1H, benzylidene), 5.41 (s, 1H, benzylidene), 5.35 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.72 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.46 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.42 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 4.20 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.77-3.86 (m, 3H, A-4, B-6a, A-6b), 3.57-3.63 (m, 2H, B-3, A-5), 3.42-3.47 (m, 3H, B-2, B-4, B-6b), 3.28 (ddd, 1H, B-5, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 2.92 (d, 1H, OH, $J_{B-2,OH} = 2.4$ Hz), 2.66-2.80 (m, 2H, SCH₂CH₃), 2.54 (d, 1H, OH, $J_{B-3,OH} = 1.0$ Hz), 1.25 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.9, 137.0, 136.7, 133.6, 130.0, 129.7, 129.5, 129.3, 128.6, 128.4, 128.3, 126.4, 126.2, 103.1, 101.9, 101.7, 84.4, 80.3, 79.4, 79.1, 73.5, 72.8, 72.0, 71.0, 68.6, 68.4, 66.7, 24.2, 14.9; IR (solid): 3488, 2980, 2868, 1721, 1452, 1388, 1287, 1183,

1071, 971, 922, 751, 710, 572 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{35}H_{42}NO_{11}S [M+NH_4]^+ m/z = 684.2479$, found: 684.2487.



Ethylthio

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-b-glucopyrano$

2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-А mixture of ethylthio glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-26) (46.8 mg, 0.0702 mmol, 1.17 eg.), O-(2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-D-glucopyranosyl)trichloroa cetimidate (4-25) (56.1 mg, 0.0600 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (120 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.40 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -50 °C. A catalytic amount of trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (1.09 µL, 6.00 µmol, 0.100 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 94:6 toluene: acetone to give ethylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzoylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-27) (79.2 mg, 0.0540 mmol, 90%).

[α]_D²⁴ = -32.8 (c = 1.11, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00-8.02 (m, 4H, aromatic), 7.20-7.64 (m, 26H, aromatic), 5.56 (s, 1H, benzylidene), 5.44 (s, 1H, benzylidene), 5.42 (s, 1H, benzylidene), 5.23-5.29 (m, 2H, A-2, D-3), 5.11 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2}$ = 4.8 Hz, $J_{2,3}$ = 4.3 Hz), 5.06 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz), 5.01 (d, 1H, C-1, $J_{1,2}$ = 4.8 Hz), 4.88 (d, 1H, D-1, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz), 4.85 (s, 1H, benzylidene), 4.66 (d, 1H, A-1, $J_{1,2}$ = 9.7 Hz), 4.39-4.41 (m, 2H, B-1, A-6a), 4.23 (dd, 1H, D-6a, $J_{5,6a}$ = 4.8 Hz, J_{gem} = 10.1 Hz), 4.18 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3}$ = 9.2 Hz, $J_{3,4}$ = 8.7 Hz), 4.03-4.08 (m, 2H, C-4, C-6a), 3.93 (dd, 1H, C-3, $J_{2,3}$ = 4.3 Hz, $J_{3,4}$ = 8.2 Hz), 3.39-3.86 (m, 13H, B-2, B-3, A-4, B-4, D-4, A-5, C-5, D-5, A-6b, B-6a, B-6b, C-6b, D-6b), 3.25 (ddd, 1H, B-5, $J_{4,5}$ = 9.2 Hz, $J_{5,6a}$ = 4.8 Hz, $J_{5,6b}$ = 10.1 Hz), 3.07 (d, 1H, OH, $J_{B-2,OH}$ = 3.4 Hz), 2.49-2.80 (m, 10H,

Lev, SCH₂CH₃), 2.14 (s, 3H, Lev), 2.12 (s, 3H, Lev), 1.23 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 207.0, 206.4, 171.9, 171.3, 165.7, 165.2, 137.5, 137.3, 137.0, 136.7, 133.6, 133.4, 129.9, 129.8, 129.6, 129.4, 129.1, 128.9, 128.7, 128.5, 128.3 x 3, 128.0, 126.4, 126.2, 126.1, 126.0, 103.1, 101.9, 101.6, 101.5, 100.5 x 2, 99.2, 84.4, 79.1, 78.9, 78.4, 77.7, 77.2, 74.2, 73.9, 72.0, 70.8, 68.8, 68.6 x 2, 68.5, 66.9, 66.3, 65.5, 37.9 x 2, 29.8 x 3, 29.7, 28.1, 27.8, 24.3, 14.9; IR (solid): 3523, 2923, 2853, 2362, 1720, 1380, 1069, 917, 734, 672, 507 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₇₈H₈₆NO₂₆S [M+NH₄]⁺ m/z = 1484.5159, found: 1484.5149.



Ethylthio

 $\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranoside (4-28)$

To a stirred solution of ethylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-27**) (3.53 g, 2.40 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (12.0 mL) was added acetic anhydride (2.25 mL, 24.0 mmol, 10.0 eq.) and a catalytic amount of DMAP (29.3 mg, 0.240 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 95:5 toluene:acetone to give ethylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyr

 $[\alpha]_D^{24} = -33.5$ (c = 1.13, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.98 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.29-7.68 (m, 25H, aromatic), 7.21 (t, 1H, aromatic, J = 7.2 Hz), 5.53 (s, 1H, benzylidene), 5.38 (s, 1H, benzylidene), 5.17-5.21 (m, 2H, H-2', benzylidene), 5.11 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 4.99 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.93 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.90 (s, 1H, benzylidene), 4.88 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 6.8$ Hz), 4.83 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 5.3$ Hz, $J_{2,3} = 5.8$

Hz), 4.70 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.64 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 5.3$ Hz), 4.50 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.34 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.09-4.18 (m, 3H, A-3, H-6a, H-6a'), 4.05 (dd, 1H, H-3', $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 3.90 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.84 (dd, 1H, H-4', $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.54-3.77 (m, 6H, H-3, D-4, A-6b, D-6b, H-6b, H-6b'), 3.32-3.50 (m, 5H, A-4, A-5, D-5, H-5, H-5'), 2.34-2.72 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.09 (s, 3H, Lev), 2.05 (s, 3H, Lev), 1.73 (s, 3H, Ac), 1.20 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) & 206.5, 206.4, 171.8, 171.4, 169.2, 164.9, 164.8, 137.4, 137.3, 137.2, 136.9, 133.8, 133.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.3, 129.1, 129.0, 128.9, 128.6, 128.3, 128.2 x 2, 126.3 x 2, 126.2, 126.1, 101.6, 101.4, 101.1, 100.9, 100.7, 99.0, 98.4, 84.4, 78.6, 78.4 x 2, 78.1, 76.7, 76.2, 73.9, 72.8, 72.5, 71.8 x 2, 71.2, 68.8, 68.6 x 2, 66.2, 66.1, 65.7, 37.9, 37.8, 29.7 x 2, 28.0, 27.6, 24.3, 20.5, 14.8; IR (solid): 2983, 2884, 1753 1719, 1374, 1267, 1095, 1006, 746, 696, 515 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₈₀H₈₈NO₂₇S [M+NH₄]⁺ m/z = 1526.5264, found: 1526.5272.



6-(((4-Methylphenyl)sulfonyl)oxy)hexyl

 $\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranoside (4-43)$

A mixture of 1,6-hexanediol mono-*p*-toluenesulfonate (21.7 mg, 79.5 μ mol, 1.20 eq.), ethylthio 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosy

a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 92:8 toluene:acetone to give 6-(((4-methylphenyl)sulfonyl)oxy)hexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -

[α]_D²⁴ = -31.9 (c = 0.290, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (d, 2H, aromatic, J = 8.2 Hz), 7.97 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.76 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.24-7.64 (m, 28H, aromatic), 5.51 (s, 1H, benzylidene), 5.38 (s, 1H, benzylidene), 5.09-5.18 (m, 3H, H-2', D-3, benzylidene), 4.94-5.01 (m, 3H, A-2, D-2, benzylidene), 4.87 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 6.3$ Hz), 4.84 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, $J_{2,3} = 6.3$ Hz), 4.70 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.62 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 6.3$ Hz), 4.47 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.32 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.01-4.14 (m, 3H, A-3, H-3', H-6a'), 3.57-3.87 (m, 11H, H-3, D-4, H-4, H-4', A-6b, D-6b, H-6b', CH₂OTs, OCH*a*HbCH₂), 3.32-3.47 (m, 6H, A-4, A-5, D-5, H-5, H-5', OCH*a*HbCH₂), 2.38-2.76 (m, 11H, Lev, SO₂PhCH₃), 2.09 (s, 3H, Lev), 2.05 (s, 3H, Lev), 1.70 (s, 3H, Ac), 1.07-1.56 (m, 8H, aliphatic); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5, 206.4, 171.9, 171.5, 169.1, 164.8, 144.7, 137.4, 137.3, 133.7, 133.5, 133.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.3, 129.2, 129.1, 128.9, 128.7, 128.3, 128.2 x 2, 127.9, 126.3, 126.2, 126.1, 101.7, 101.5, 101.4, 101.3, 100.8, 100.7, 99.4, 98.6, 78.7 x 2, 78.4 x 2, 77.7, 76.3, 76.1, 74.3, 73.9, 72.6, 71.8 x 2, 70.5, 69.8, 68.8, 68.7 x 2, 68.6, 66.7, 66.3, 66.1, 65.9, 38.0, 37.8, 29.8, 29.7, 29.2, 28.7, 28.0, 27.6, 25.3, 25.0, 21.7, 20.5; IR (solid): 2873, 2350, 2111, 1720, 1450, 1366, 1266, 1084, 916, 752, 634, 494 cm⁻¹.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-\beta-D-glucopyranosyl-b-gluco$

To a stirred solution of 6-(((4-methylphenyl)sulfonyl)oxy)hexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-

O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-le vulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-43**) (52.2 mg, 30.4 μ mol, 1.00 eq.) in DMF (1.52 mL) was added sodium azido (3.95 mg, 60.7 μ mol, 2.00 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into water. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in THF (1.00 mL) was added acetic acid (0.300 mL) and hydrazine monohydrate (0.100 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene:acetone to give 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4-7**) (31.0 mg, 22.2 µmol, 2 steps 73%).

[α]_D²⁴ = -34.6 (c = 1.10, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (d, 2H, aromatic, J = 8.2 Hz), 8.00 (d, 2H, aromatic, J = 8.2 Hz), 7.25-7.62 (m, 26H, aromatic), 5.51 (s, 1H, benzylidene), 5.42 (s, 1H, benzylidene), 5.27 (s, 1H, benzylidene), 5.23 (dd, 1H, H-2', $J_{1,2} = 6.3$ Hz, $J_{2,3} = 6.3$ Hz), 5.06 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.02 (d, 1H, H-1', $J_{1,2} = 6.3$ Hz), 4.96 (s, 1H, benzylidene), 4.90 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 5.3$ Hz, $J_{2,3} = 5.8$ Hz), 4.69 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 5.3$ Hz), 4.53 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.50 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 8.2$ Hz), 4.32 (dd, 1H, A-6a, $J_{5,6a} = 3.4$ Hz, $J_{gem} = 9.7$ Hz), 4.05-4.17 (m, 4H, A-3, H-3', H-6a, H-6a'), 3.35-3.92 (m, 17H, D-2, D-3, H-3, A-4, D-4, H-4, H-4', A-5, H-5', D-6a, A-6b, D-6b, H-6b, H-6b', OCH₂CH₂), 3.31 (ddd, 1H, D-5, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{5,6b} = 9.7$ Hz), 3.03-3.06 (m, 3H, OH, CH_2N_3), 2.60 (br-s, 1H, OH), 1.74 (s, 3H, Ac), 1.14-1.50 (m, 8H, aliphatic); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 208.3, 169.5, 165.5, 164.8, 137.3, 137.2, 137.1, 136.9, 133.7, 133.4, 130.0, 129.8, 129.7, 129.6, 129.3 x 2, 128.8, 128.7, 128.3 x 2, 126.4 x 2, 126.3, 126.1, 102.5, 101.9, 101.6, 101.4 x 2, 101.3, 99.1, 98.4, 80.3, 78.8, 78.7, 78.6, 78.5, 78.2, 76.1, 74.4, 73.7, 73.5, 72.9, 72.3, 69.9, 68.8, 68.7 x 2, 68.5, 66.7, 65.8, 65.6, 51.3, 29.3, 28.6, 26.3, 25.4, 20.5; IR (solid): 3625, 2974, 2884, 2831, 2089, 1760, 1719, 1380, 1275, 1220, 1095, 765, 697, 515 cm⁻¹.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-gl$

A mixture of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3- $O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D$ -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-7) (631 mg, 0.453 mmol, 1.00 eq.), ethylthio 2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0ene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosi de (4-28) (752 mg, 0.498 mmol, 1.10 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (906 mg) in dry CH₂Cl₂ (18.1 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. N-iodosuccinimide (135 mg, 0.598 mmol, 1.32 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (20.0 µL, 0.227 mmol, 0.500 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 92:8 toluene: acetone and further purified gel by permeation chromatography (GPC) 6-azidohexyl to give 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-

4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl

 $[\alpha]_D^{24} = -28.3$ (c = 0.840, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.03 (m, 8H), 7.18-7.63 (m, 52H), 5.50 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.85-5.21 (m, 16H), 4.71-4.74 (m, 2H), 4.67 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.52 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.32-4.37 (m, 2H), 3.22-4.24 (m, 41H), 3.05 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.35-2.74 (m, 9H, Lev, OH), 2.09 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.10-1.50 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.9, 171.4, 169.6, 169.0, 165.5, 165.2, 164.8 x 3, 137.4 x 3, 137.3 x 2, 137.1, 137.0, 136.9, 133.9, 133.8, 133.6, 133.5, 130.0, 129.9, 129.8 x 2, 129.7 x 2, 129.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2 x 2, 129.1,

129.0, 128.9, 128.7 x 2, 128.3 x 2, 128.2 x 2, 126.4, 126.3 x 2, 126.2, 126.1, 126.0, 102.9, 101.7, 101.6 x 2, 101.5, 101.4, 101.3, 101.1, 101.0, 100.8, 100.6, 99.8, 99.6, 98.9, 98.7, 98.6, 78.8, 78.7, 78.6 x 2, 78.5, 78.4, 78.3, 78.0, 77.8, 77.7, 77.6, 76.6, 76.5, 76.4, 76.2, 74.5, 74.4, 74.3 x 2, 73.9, 73.8, 72.6, 72.4, 71.8 x 2, 69.9, 68.8 x 2, 68.7 x 2, 68.6 x 2, 68.5 x 2, 66.8, 66.7, 66.2, 66.1, 65.9 x 2, 65.8, 65.7 x 2, 51.3, 38.0, 37.8, 29.8, 29.7, 29.3, 28.6, 28.0, 27.6, 26.3, 25.4, 20.8, 20.5; IR (solid): 2989, 2883, 2822, 2267, 1725, 1386, 1262, 1091, 675, 517 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{152}H_{161}N_4O_{51}$ [M+NH₄]⁺ *m*/*z* = 2858.0128, found: 2858.0181.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopy$

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-2,3 -di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-gluc

To a stirred solution of the residue in THF (1.00 mL) was added acetic acid (0.300 mL) and hydrazine monohydrate (0.100 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene:acetone to give 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-

O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-β-D-g lucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-P

 $[\alpha]_{D}^{23} = -23.8$ (c = 1.04, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96-8.06 (m, 8H), 7.17-7.63 (m, 52H), 5.52 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.26 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, 6.8 Hz), 5.12 (s, 2H), 5.06 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 4.94-5.00 (m, 3H), 4.76-4.88 (m, 8H), 4.70 (d, 1H, J = 5.3 Hz), 4.63 (br-d, 2H, J = 5.3 Hz), 4.48-4.52 (m, 2H), 4.33 (dd, 1H, J = 4.3 Hz, 10.1 Hz), 3.25-4.19 (m, 42H), 3.06 (br-s, 1H), 3.05 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.71 (br-s, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.14-1.48 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.2, 169.0, 168.9, 165.5, 164.8, 164.6 x 2, 137.8, 137.2, 137.0, 136.8, 133.9, 133.8, 133.5, 133.3, 129.8, 129.7 x 2, 129.6, 129.5 x 2, 129.4, 129.3, 129.2 x 2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4 x 2, 128.2 x 2, 128.1 x 2, 128.0 x 2, 127.8, 126.3, 126.2, 126.1, 126.0, 125.3, 102.5, 101.7, 101.6, 101.5, 101.4 x 2, 101.3 x 2, 101.0, 100.9, 100.8, 99.1, 98.2 x 2, 98.0, 97.8, 80.2, 78.7, 78.5, 78.2 x 2, 78.0, 77.9, 75.9, 75.7 x 2, 75.4, 75.2, 74.2, 74.1, 73.4, 73.3, 72.7, 72.2, 72.0 x 2, 71.9 x 2, 69.7, 68.6, 68.5, 68.4 x 2, 68.3, 66.5, 65.9, 65.7, 65.5, 65.3, 51.1, 29.1, 28.5, 26.1, 25.3, 21.4, 20.5 x 2, 20.3; IR (solid): 3046, 2883, 2320, 1732, 1373, 1266, 1097, 997, 700, 517 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₄₄H₁₅₁N₄O₄₈ [M+NH₄]⁺ m/z = 2703.9498, found: 2703.9475.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-2,3-0-(2-0-benzoyl-3-0-(2-0-benzoyl)-3-0-glucopyranosyl)-3-0-glucopyran$

A mixture of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene- β -D-g lucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-gl

ucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-45) (125 mg, 46.6 μmol, 1.00 eq.), ethylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3 -O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)β-D-glucopyranoside (4-28) (84.3 mg, 55.9 μmol, 1.20 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (279 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.79 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. N-iodosuccinimide (15.1 mg, 67.0 µmol, 1.44 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (2.10 µL, 23.3 µmol, 0.500 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO3 and 10% aq. Na2S2O3, and brine, dried over MgSO4, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone and further purified gel permeation chromatography (GPC) 6-azidohexyl by to give 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-

benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4, 6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-b

 $[\alpha]_{D}^{16} = -24.6 (c = 0.950, CHCl_3); {}^{1}H NMR (400 MHz, CDCl_3) \delta 7.97-8.03 (m, 12H), 7.16-7.62 (m, 78H), 5.51 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.10-5.21 (m, 6H), 4.91-5.04 (m, 11H), 4.78-4.88 (m, 9H), 4.68-4.72 (m, 3H), 4.63 (br-d, 2H,$ *J*= 6.3 Hz), 4.48 (d, 1H,*J*= 7.7 Hz), 4.31-4.37 (m, 2H), 3.22-4.24 (m, 61H), 3.05 (t, 2H,*J* $= 7.2 Hz), 2.35-2.75 (m, 9H, Lev, OH), 2.09 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.10-1.43 (m, 8H); {}^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) \delta 206.5, 206.4, 171.8, 171.4, 169.6, 169.1, 169.0 x 2, 165.5, 165.1, 164.9, 164.8 x 2, 164.7, 137.4, 137.3, 137.2, 137.0, 136.9, 134.0, 133.9, 133.7, 133.6, 133.4, 129.9, 129.8 x 3, 129.7 x 2, 129.6, 129.5 x 2, 129.4, 129.3 x 2, 129.2 x 2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8 x 2, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2 x 3, 128.1, 126.3 x 2, 126.2, 126.1, 126.0, 102.9, 101.7, 101.6, 101.5, 101.4 x 2, 101.3, 101.2, 101.1, 100.9, 100.8, 100.6, 99.9, 99.2, 98.8, 98.5, 98.4, 98.2, 97.9, 78.7, 78.6 x 2, 78.5, 78.4, 78.2, 78.1, 78.0, 76.3, 76.1, 75.9 x 2, 75.7, 75.5, 74.5, 74.4 x 2, 74.2, 74.1, 73.8 x 2, 72.5, 72.4, 72.2, 71.8, 71.7, 69.9, 68.8, 68.7, 68.6, 68.5, 66.8, 66.7, 66.2, 66.0 x 2, 65.8, 65.7, 51.2, 37.9, 37.7, 29.7 x 2, 29.3, 28.6, 28.0, 27.6, 26.3, 25.4, 20.7 x 3, 20.5; IR (solid): 3492, 2971, 2877, 2417, 2097, 1732, 1602, 1452, 1373, 1262, 1222, 1096, 996, 765, 697, 508 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₂₂H₂₂₉N₄O₇₅ [M+NH₄]⁺$ *m/z*=

4150.4228, found: 4150.4053.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta$

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl)-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyranosyl]-β-D-glucopyran

To a stirred solution of the residue in THF (1.00 mL) was added acetic acid (0.300 mL) and hydrazine monohydrate (0.100 mL) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 20 min, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 88:12 toluene:acetone to give 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-

enzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glu

 $[\alpha]_{D}^{16} = -24.2$ (c = 1.43, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96-8.06 (m, 12H), 7.17-7.62 (m, 78H), 5.52 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.26 (dd, 1H, *J* = 6.8 Hz, 7.2 Hz), 5.16 (s, 2H), 5.13 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 5.06 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.94-4.98 (m, 3H), 4.77-4.88 (m, 16H), 4.71 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz), 4.63-4.64 (m, 4H), 4.47-4.52 (m, 2H), 4.33 (dd, 1H, *J* = 4.3 Hz, 10.1 Hz), 3.18-4.19 (m, 62H), 3.03-3.08 (m, 3H), 2.65 (br-s, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.76 (br-s, 6H), 1.72 (s, 3H), 1.14-1.46 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 169.1 x 3, 165.6, 164.9 x 2, 164.8 x 2, 137.4 x 3, 137.3 x 2, 137.1, 136.9, 134.0 x 2, 133.6, 129.9, 129.8 x 2, 129.7, 129.6, 129.5, 129.3 x 4, 129.2 x 2, 129.1 x 5, 129.0 x 3, 128.9, 128.8 x 2, 128.6 x 2, 128.4, 128.3 x 3, 128.2 x 4, 128.1 x 2, 126.4 x 2, 126.3, 126.2, 102.7, 101.9, 101.7, 101.6 x 3, 101.5, 101.4, 101.2, 101.1, 101.0 x 2, 98.5, 98.4, 98.3 x 3, 97.9, 78.9, 78.7, 78.4, 78.3 x 3, 78.2 x 3, 78.1, 76.6, 75.9, 75.8, 75.7, 74.4, 74.3 x 2, 74.2 x 3, 73.6, 72.8, 72.1 x 3, 69.9, 68.8, 68.7, 68.6 x 4, 68.4, 66.7, 66.1, 66.0 x 2, 65.8, 65.6, 51.3, 29.8, 29.3, 28.6, 26.3, 25.4, 20.7, 20.6 x 2, 20.5; IR (solid): 2971, 2877, 2825, 1733, 1374, 1262, 1222, 1091, 695, 505 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₂₁₄H₂₁₉N₄O₇₂ [M+NH₄]⁺ *m/z* = 3996.3598, found: 3996.3635.



6-Azidohexyl

 $\begin{aligned} 2-O-benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopy$

A mixture of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O- dene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-be nzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl copyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl copyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-47) (20.4 mg, 5.12 μmol, 1.00 eq.), ethylthio 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-28) (9.30 mg, 6.15 μmol, 1.20 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (51.2 mg) in dry CH₂Cl₂ (0.512 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. N-iodosuccinimide (1.70 mg, 7.37 µmol, 1.44 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (0.317 μ L, 3.58 μ mol, 0.700 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3 -O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,0-acety e-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzyl idene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-O-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-O-benzylidena-3-0-(4,6-0-benzylidena-3-0-(4,6-0-benzylidena-3-0-(4,6-0-benzyl O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyrano syl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyrano syl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyrano syl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-48) (22.8 mg, 4.20 μmol, 82%).

 $[\alpha]_D^{24} = -17.6$ (c = 2.02, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97-8.03 (m, 16H), 7.14-7.62 (m, 104H), 5.51 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.63-5.21 (m, 43H), 4.48 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.31-4.37 (m, 2H), 3.17-4.24 (m, 81H), 3.05 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.35-2.70 (m, 9H, Lev, OH), 2.08 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.76 (s, 9H), 1.71 (s, 3H), 1.08-1.50 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5 x 2, 171.8, 171.4, 169.6, 169.1 x 3, 169.0, 165.6 165.2, 164.9 x 2, 164.8 x 3, 137.4, 137.3, 137.2, 137.1, 137.0, 136.9, 134.1 x 2, 134.0 x 3, 133.9 x 3, 133.7, 133.6, 133.4, 129.9, 129.8 x 2, 129.7 x 2, 129.6, 129.5 x 2, 129.4, 129.3 x 2, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8 x 2, 128.7, 128.6, 128.3 x 2, 128.2 x 3, 128.1, 128.0, 126.4, 126.3 x 3, 126.2, 126.1, 126.0, 125.4, 102.9, 102.8, 101.7, 101.6, 101.5 x 2, 101.4, 101.3 x 2, 101.2 x 2, 101.1 x 3, 101.0, 100.9, 100.8, 100.6, 99.9, 99.2, 98.8, 98.4 x 2, 98.2, 98.0 x 2, 97.8 x 2, 78.7 x 3, 78.6, 128.3 x 2, 129.2, 129.1 x 3, 128.1 x 2, 128.2 x 3, 128.1 x 3, 180.0 x 3, 100.6, 99.9, 99.2, 98.8, 98.4 x 2, 98.2, 98.0 x 2, 97.8 x 2, 78.7 x 3, 78.6, 128.3 x 2, 128.7 x 3, 78.6 x 3,

78.5 x 2, 78.4, 78.2 x 2, 78.1, 78.0 x 3, 77.9, 77.8, 77.7, 76.6 x 2, 76.4, 76.3 x 2, 76.0, 75.9, 75.8, 75.7 x 2, 75.6 x 3, 75.4, 75.3, 74.5 x 2, 74.4 x 2, 74.3 x 2, 74.2 x 2, 74.1, 73.9, 73.8, 72.5, 72.3, 72.2 x 2, 72.1 x 2, 71.8 x 2, 71.7, 69.9, 68.9 x 3, 68.8, 68.7, 68.6, 68.5, 68.4 x 2, 68.2, 66.8, 66.7, 66.2, 66.1, 66.0 x 2, 65.9, 65.8, 65.7, 65.6, 51.2, 38.8, 37.9, 37.7, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6 x 3, 29.5 x 2, 29.4, 29.3, 29.0, 28.6, 28.0, 27.6, 26.3, 25.4, 23.0, 22.7, 21.5, 20.7 x 2, 20.6, 20.5; IR (solid): 3536, 2926, 2093, 1720, 1369, 1256, 1093, 909, 647, 496 cm⁻¹.



6-Aminohexyl

$3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl$

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-2,3 -di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-gl

 $[\alpha]_{D}^{24} = -33.7$ (c = 0.255, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.70-4.76 (m, 7H, anomericH x 7), 4.44 (d, 1H, anomericH, *J* = 7.7 Hz), 3.88-3.91 (m, 9H), 3.70-3.85 (m, 16H), 3.33-3.56 (m, 27H), 2.99 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.59-1.68 (m, 4H), 1.37-1.40 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.7, 103.6, 103.5, 103.4, 102.8, 85.5 x 2, 85.4, 85.3, 85.2 x 2, 85.0, 76.8, 76.6, 76.5, 76.4, 74.3, 74.2, 74.1, 74.0, 73.7, 71.2, 70.4, 69.0, 68.9, 61.5, 40.5, 29.3, 28.7, 26.2, 25.4; IR (solid): 3307, 2897, 2341, 1591, 1438, 1307, 1154, 1042, 669, 525 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₅₄H₉₆NO₄₁ [M+H]⁺ *m*/*z* = 1414.5458, found: 1414.5460.



6-Aminohexyl

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylid 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidene-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-O-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-benzylidena-3-0-(4,0-a-0-(4,0-a-0-10-3-0-(4,0-a-0-10-3-3-0-(4,0-a-0-10-3-3-3 zylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O -benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-gl ucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl ucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (4-47) (30.8 mg, 7.45 µmol, 1.00 eq.) in NH₃/THF/EtOH (8.50 mL/1.00 mL/0.500 mL) was added a large amount of lithium (100 mg) at -78 °C. After being stirred under reflux for 1.5 h, the reaction mixture was added methanol (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by size exclusion column chromatography on Sephadex LH-20 eluted with water and further purified by revese-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with $(\beta$ -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl $-\beta$ -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl) -β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-2) (13.8 mg, 6.69 μmol, 90%).

 $[\alpha]_{D}^{24} = -13.9$ (c = 0.315, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.70-4.76 (m, 11H, anomericH x 11), 4.44 (d, 1H, anomericH, *J* = 8.2 Hz), 3.88-3.91 (m, 13H), 3.63-3.81 (m, 24H), 3.32-3.56 (m, 37H), 2.77 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.49-1.63 (m, 4H), 1.28-1.36 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.6, 103.4, 102.8, 85.5, 85.2, 85.0, 76.8, 76.5, 76.4, 74.3, 74.1, 73.7, 71.2, 70.4, 69.0, 68.9, 61.5, 40.4, 30.9, 30.7, 30.5, 30.3, 30.1, 29.9, 29.7, 29.3, 28.1, 26.1, 25.4; IR (solid): 3341, 2912, 2352, 2014, 1836, 1592, 1439, 1309, 1154, 1077, 1044, 911, 671, 526 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₇₈H₁₃₆NO₆₁ [M+H]⁺ *m/z* = 2062.7571, found: 2062.7598.



6-Aminohexyl

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O--4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylid zoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-gluc opyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl opyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl opyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl opyranoside (4-48) (50.7 mg, 9.34 µmol, 1.00 eq.) in NH₃/THF/EtOH (8.50 mL/1.00 mL/0.500 mL) was added a large amount of lithium (100 mg) at -78 °C. After being stirred under reflux for 1.5 h, the reaction mixture was added methanol (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was purified by size exclusion column chromatography on Sephadex LH-20 eluted with water and further purified by revese-phase column chromatography (Bond (3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl -glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-1) (20.2 mg, 7.45 μmol, 80%).

 $[α]_D^{23} = -22.5$ (c = 0.130, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.71-4.77 (m, 14H, anomericH x 14), 4.58 (d, 1H, anomericH, *J* = 7.7 Hz), 3.88-3.92 (m, 17H), 3.67-3.78 (m, 32H), 3.32-3.56 (m, 49H), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz), 1.57-1.63 (m, 4H), 1.38 (br-s, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.4, 85.1, 76.5, 74.1, 70.4, 69.0, 61.5; IR (solid): 3341, 2898, 2327, 2155, 1597, 1458, 1313, 1154, 1072, 1042, 806, 670, 526 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₀₂H₁₇₆NO₈₁ [M+H]⁺ *m*/*z* = 2710.9684, found: 2710.9724.



Ethylthio

$6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-3-O-tert-butyldimethylsilyl-\beta-D-glucopyranoside (4-54)$

To a stirred solution of ethylthio 2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (4-53) (778 mg, 1.46 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (7.26 mL) was added 2-(azidomethyl)benzoyl chloride (4.84 mmol, 3.32 eq.) and DMAP (1.48 g, 12.1 mmol, 8.29 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 90:10 hexane:ethyl acetate to give ethylthio 6-*O*-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranoside (4-54) (927 mg, 1.34 mmol, 92%).

 $[α]_D^{20} = +24.6$ (c = 0.855, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01-8.06 (m, 3H, aromatic), 7.30-7.61 (m, 11H, aromatic), 5.25 (dd, 1H, H-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.89 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.80 (s, 2H, N₃CH₂), 4.63 (dd, 1H, H-6a, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.58 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.56 (d, 1H, H-1, $J_{1,2} = 9.7$ Hz), 4.35 (dd, 1H, H-6b, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.01 (dd, 1H, H-4, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.74 (ddd, 1H, H-5, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz), 3.63 (dd, 1H, H-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 2.60-2.78 (m, 2H, SC H_2 CH₃), 1.18 (t, 3H, SC H_2 C H_3 , J = 7.2 Hz), 0.80 (s, 9H, TBS), 0.04 (s, 3H, TBS), -0.13 (s, 3H, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 165.6, 137.6, 137.5, 133.2, 133.0, 121.4, 130.3, 130.0, 129.8, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.8, 83.7, 78.8, 77.0, 75.4, 72.9, 63.9, 53.1, 25.9, 25.7, 23.9, 17.9, 14.9, -3.9, -4.1; IR (solid): 2959, 2928, 2856, 2104, 1724, 1452, 1262, 1070, 838, 711, 519 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{36}H_{49}N_4O_7$ SiS [M+NH₄]⁺ m/z = 709.3091, found: 709.3082.



6-*O*-(2-(Azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-D-glucopyranose (4-55)

To a stirred solution of ethylthio 6-*O*-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tertbutyldimethylsilyl-β-D-glucopyranoside (**4-54**) (682 mg, 0.986 mmol, 1.00 eq.) in acetone (4.93 mL) and water (49.3 µL) was added *N*-bromosuccinimide (211 mg, 1.18 mmol, 1.20 eq.) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 10 min, the reaction mixture was added triethylamine (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 85:15 hexane:ethyl acetate to give 6-*O*-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-D-glucopyranose (**4-55**) (488 mg, 0.753 mmol, 76%, $\alpha:\beta = 77:23$). The $\alpha:\beta$ ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00-8.10 (m, 6H, aromaticαβ), 7.22-7.66 (m, 22H, aromaticαβ), 5.41 (br-s, 1H, H-1α), 5.14 (dd, 1H, H-2α, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 5.10 (dd, 1H, H-2β, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.88-4.93 (m, 2H, PhC H_2), 4.73-4.83 (m, 5H, H-1β, N₃CH₂αβ), 4.57-4.65 (m, 4H, H-6aα, H-6aβ, PhC H_2), 4.37-4.42 (m, 3H, H-3α, H-6bα, H-6bβ), 4.30 (ddd, 1H, H-5α, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, $J_{5,6b} = 4.3$ Hz), 4.06 (dd, 1H, H-3β, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.77 (ddd, 1H, H-5β, $J_{4,5} = 9.7$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6b} = 4.3$ Hz), 3.58-3.67 (m, 2H, H-4α, H-4β), 3.34 (d, 1H, OHβ, $J_{1,OH} = 9.7$ Hz), 2.97 (br-s, 1H, OHα), 0.79 (s, 18H, TBSαβ), -0.05-0.08 (m, 12H, TBSαβ); IR (solid): 3427, 2928, 2856, 2411, 2101, 1724, 1453, 1264, 1097, 838, 713, 520 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₃₄H₄₅N₄O₈Si [M+NH₄]⁺ m/z = 665.3007, found: 665.3002.



O-(6-*O*-(2-(Azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-D-glucopyranos yl)trichloroacetimidate (4-38)

To a stirred solution of 6-*O*-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*-benzyl-3-*O*-tertbutyldimethylsilyl-D-glucopyranose (**4-55**) (960 mg, 1.48 mmol, 1.00 eq.) in CH₂Cl₂ (2.96 mL) was added trichloroacetonitrile (0.742 mL, 7.40 mmol, 5.00 eq.) and a catalytic amount of Cs₂CO₃ (48.0 mg, 0.148 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 90:10 hexane:ethyl acetate to give *O*-(6-*O*-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-*O*-benzoyl-4-*O*benzyl-3-*O*-tert-butyldimethylsilyl-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (**4-38**) (1.09 g, 1.38 mmol, 93%, $\alpha:\beta = 59:41$). The $\alpha:\beta$ ratio was determined by ¹H NMR analysis.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (s, 1H, NHβ), 8.51 (s, 1H, NHα), 8.00-8.05 (m, 6H, aromaticαβ), 7.22-7.61 (m, 22H, aromaticαβ), 6.55 (d, 1H, H-1α, $J_{1,2} = 3.4$ Hz), 5.97 (d, 1H, H-1β, $J_{1,2} = 7.2$ Hz), 5.51 (dd, 1H, H-2β, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.2$ Hz), 5.40 (dd, 1H, H-2α, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz), 4.93 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.89 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.74-4.83 (m, 4H, N₃CH₂αβ), 4.56-4.65 (m, 4H, H-6aα, H-6aβ, PhC H_2), 4.38-4.49 (m, 3H, H-3α, H-6bα, H-6bβ), 4.25 (ddd, 1H, H-5α, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, $J_{5,6b} = 3.4$ Hz), 4.12 (dd, 1H, H-3β, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.96 (ddd, 1H, H-5β, $J_{4,5} = 9.2$ Hz, $J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $J_{5,6b} = 4.8$ Hz), 3.72-3.79 (m, 2H, H-4α, H-4β), 0.80-0.83 (m, 18H, TBSαβ), -0.08-0.11 (m, 12H, TBSαβ); IR (solid): 2959, 2855, 2105, 1725, 1672, 1452, 1255, 1070, 712, 519 cm⁻¹.



Ethylthio

A mixture of ethylthio 4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranoside (4-21) (5.64 g, 18.1 mmol, 1.20 eq.),

O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-3-O-tert-butyldimethylsilyl-D-glucopyranosyl) trichloroacetimidate (**4-38**) (11.9 g, 15.1 mmol, 1.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (15.1 g) in dry CH₂Cl₂ (151 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -15 °C. A catalytic amount of trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (0.544 mL, 3.01 mmol, 0.200 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 90:10 hexane:ethyl acetate to give ethylthio 3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-3-O-tert-butyldimethylsilyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranoside (**4-39**) (13.3 g, 14.2 mmol, 94%).

 $[\alpha]_D^{19} = -3.94$ (c = 1.05, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.97 (d, 1H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.15-7.60 (m, 16H, aromatic), 5.48 (s, 1H, benzylidene), 5.23 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.93 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.83 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.74 (d, 1H, N₃CH₂, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 4.67 (d, 1H, N₃CH₂, $J_{gem} = 14.5$ Hz), 4.50 (d, 1H, PhC H_2 , $J_{gem} = 11.1$ Hz), 4.46 (dd,
1H, B-6a, $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz), 4.25-4.31 (m, 3H, A-1, A-6a, B-6b), 4.00 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 3.79 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 8.7$ Hz), 3.54-3.72 (m, 4H, A-4, B-4, B-5, A-6b), 3.31-3.42 (m, 2H, A-2, A-5), 2.48-2.64 (m, 2H, SCH₂CH₃), 2.42 (d, 1H, OH, $J_{A-2,OH} = 1.9$ Hz), 1.18 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz), 0.79 (s, 9H, TBS), 0.03 (s, 3H, TBS), -0.11 (s, 3H, TBS); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.3, 165.9, 137.5, 137.3, 137.1, 133.3, 132.8, 131.6, 130.2, 129.9, 129.7, 129.0, 128.6, 128.5 x 2, 128.2 x 2, 127.9, 127.8, 126.0, 101.4, 101.3, 86.2, 81.8, 79.2, 78.7, 75.4, 75.3, 72.9, 72.8, 71.0, 68.6, 63.7, 53.1, 25.7, 24.0, 17.9, 15.2, -4.0, -4.2; IR (solid): 3478, 2928, 2855, 2102, 1724, 1600, 1452, 1264, 1071, 985, 837, 700, 518 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₄₉H₆₃N₄O₁₂S [M+NH₄]⁺ *m*/*z* = 959.3932, found: 959.3979.



Ethylthio

To a stirred solution of ethylthio 3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-3- $O-tert-butyldimethylsilyl-<math>\beta$ -D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**4-39**) (3.05 g, 3.23 mmol, 1.00 eq.) in pyridine (16.2 mL) was added benzoyl chloride (1.14 mL, 9.69 mmol, 3.00 eq.) and a catalytic amount of DMAP (39.5 mg, 0.323 mmol, 0.100 eq.) at room temperature. After being stirred at 120 °C for 7 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was used for the next reaction without further purification.

To a stirred solution of the residue in pyridine (16.2 mL) was added HF/ pyridine (1.62 mL) at room temperature. After being stirred at 100 °C for 12 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with 1 M HCl, saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 78:22 hexane:ethyl acetate to give ethylthio $3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-2-O-benzoyl-4,6-O-benz$

ylidene- β -D-glucopyranoside (4-33) (2.53 g, 2.72 mmol, 2 steps 84%).

[α]_D¹⁸ = -8.44 (c = 1.07, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (d, 1H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.83 (d, 2H, aromatic, J = 8.2 Hz), 7.73 (d, 2H, aromatic, J = 8.2 Hz), 7.21-7.59 (m, 19H, aromatic), 5.55 (s, 1H, benzylidene), 5.30 (dd, 1H, A-2, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.01 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.2$ Hz), 4.86 (d, 1H, B-1, $J_{1,2} = 7.2$ Hz), 4.65-4.78 (m, 3H, PhC H_2 , N₃CH₂), 4.50-4.60 (m, 3H, A-1, B-6a, PhC H_2), 4.32-4.37 (m, 2H, A-6a, B-6b), 4.27 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 3.49-3.55 (m, 2H, A-5, B-5), 2.61-2.68 (m, 2H, A-6b), 3.62 (dd, 1H, B-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 8.7$ Hz), 3.49-3.55 (m, 2H, A-5, B-5), 2.61-2.68 (m, 2H, SC H_2 CH₃), 2.57 (d, 1H, OH, $J_{B-3,OH} = 4.8$ Hz), 1.16 (t, 3H, SC H_2 C H_3 , J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.4, 164.8, 137.6, 137.2, 137.1, 133.2, 132.9, 131.6, 130.1, 130.0, 129.8, 129.5, 129.2 x 2, 128.7, 128.6 x 2, 128.5, 128.3 x 3, 128.1, 126.1, 101.6, 99.9, 84.3, 79.4, 78.7, 77.8, 76.5, 75.3, 74.9, 72.8, 72.2, 71.1, 68.7, 63.7, 53.1, 24.1, 14.8; IR (solid): 3499, 2967, 2875, 2105, 1732, 1602, 1452, 1273, 1096, 913, 712, 542 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₅₀H₅₃N₄O₁₃S [M+NH₄]⁺ m/z = 949.3330, found: 949.3322.



Ethylthio

A mixture of ethylthio $3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-4-O-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-\beta-D-glucopyranoside ($ **4-33**) (521 mg, 0.559 mmol, 1.00 eq.),

O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-D-glu copyranosyl)trichloroacetimidate (**4-25**) (592 mg, 0.615 mmol, 1.10 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (280 mg) in dry CH₂Cl₂ (2.80 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -50 °C. A catalytic amount of trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (10.1 µL, 55.9 µmol, 0.100 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was neutralized with

triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 85:15 toluene:ethyl acetate and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give ethylthio $3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyr anosyl)-4-O-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-<math>\beta$ -D-glucopyranoside (**4-40**) (573 mg, 0.330 mmol, 59%).

[α]_D¹⁸ = -17.0 (c = 1.19, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (d, 1H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.92 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.81 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.14-7.72 (m, 34H, aromatic), 5.52 (s, 1H, benzylidene), 5.49 (s, 1H, benzylidene), 5.37 (s, 1H, benzylidene), 5.25 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 4.93-5.06 (m, 4H, C-1, B-2, D-2, D-3), 4.69-4.81 (m, 4H, B-1, A-2, N₃CH₂), 4.63 (d, 1H, PhCH₂, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.55 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.37-4.44 (m, 3H, A-1, B-6a, B-6b), 4.16-4.32 (m, 4H, A-3, A-6a, C-6a, D-6a), 4.02 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 5.8$ Hz, $J_{3,4} = 7.2$ Hz), 3.93-3.98 (m, 2H, C-3, PhCH₂), 3.77 (dd, 1H, B-4, $J_{3,4} = 7.2$ Hz, $J_{4,5} = 10.1$ Hz), 3.62-3.70 (m, 5H, C-4, B-5, A-6b, C-6b, D-6b), 3.58 (dd, 1H, D-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz, $J_{4,5} = 9.7$ Hz), 3.36-3.44 (m, 2H, A-5, C-5), 3.25-3.32 (m, 2H, A-4, D-5), 2.14-2.71 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.08 (s, 3H, Lev), 2.03 (s, 3H, Lev), 1.14 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4, 206.3, 171.8, 171.4, 166.5, 165.0, 164.8, 164.5, 138.0, 137.3, 137.2, 137.1, 136.9, 133.8, 133.3, 133.2, 132.8, 131.7, 130.0, 129.9, 129.8, 129.6 x 2, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 126.5, 126.2, 126.0, 102.0, 101.3, 101.2, 101.0, 99.5, 98.0, 84.3, 79.9, 79.2, 78.8, 78.4 x 2, 76.0, 75.4, 74.3, 73.5, 73.3, 72.9, 72.0, 71.8, 71.6, 70.9, 68.7, 68.6, 66.6, 66.2, 64.6, 53.1, 37.9, 37.7, 29.8, 29.7, 27.9, 27.4, 24.4, 14.8; IR (solid): 2881, 2101, 1716, 1367, 1261, 1096, 994, 879, 702, 517 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₉₃H₉₇N₄O₂₈S [M+NH₄]⁺ m/z = 1749.6010, found: 1749.6022.



Ethylthio

 $2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-level vulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-level vulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3,6-O-benzylidene-2,3-di-O-level vulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3,6-O-benzylidene-2,3-di-O-level vulinoyl-3,6-O-benzyl-3,6-O-benzyl-3,6-O-benzylidene-2,3-di-O-level vulinoyl-3,6-O-benzyl-3,6$

-β-D-glucopyranoside (4-41)

To a stirred solution of ethylthio $3-O-(6-O-(2-(azidomethyl)benzoyl)-2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-<math>\beta$ -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyr anosyl)-4-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl)-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**4-40**) (251 mg, 0.145 mmol, 1.00 eq.) in THF (1.45 mL) was added water (13.1 µL, 0.725 mmol, 5.00 eq.) and "Bu₃P (0.109 mL, 0.435 mmol, 3.00 eq.) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was poured into saturated aq. NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with saturated aq. NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene:acetone to give ethylthio 2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzyl- β -D-glucopyranoside (**4-41**) (212 mg, 0.134 mmol, 93%).

 $[\alpha]_D^{17} = -13.1$ (c = 1.04, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.73 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.22-7.69 (m, 31H, aromatic), 5.47 (s, 2H, benzylidene), 5.37 (s, 1H, benzylidene), 5.21 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.01 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz), 4.88-4.96 (m, 3H, A-2, B-2, D-2), 4.86 (d, 1H, C-1, J_{1,2} = 7.7 Hz), 4.67-4.71 (m, 2H, B-1, PhCH₂), 4.52 (d, 1H, D-1, J_{1,2} = 7.7 Hz), 4.46 (d, 1H, A-1, $J_{1,2} = 10.1$ Hz), 4.32 (dd, 1H, A-6a, $J_{5.6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.24 (dd, 1H, C-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.18 (dd, 1H, D-6a, $J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 10.6$ Hz), 4.12 (d, 1H, PhCH₂, $J_{\text{gem}} = 10.6 \text{ Hz}$, 4.09 (dd, 1H, A-3, $J_{2,3} = 9.2 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 9.2 \text{ Hz}$), 4.01 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 6.8 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 7.7 \text{ Hz}$), 3.88 (dd, 1H, C-3, J_{2.3} = 8.7 Hz, J_{3.4} = 9.2 Hz), 3.54-3.70 (m, 7H, B-4, C-4, D-4, B-6a, A-6b, C-6b, D-6b), 3.33-3.51 (m, 5H, A-4, A-5, B-5, C-5, B-6b), 3.26 (ddd, 1H, D-5, *J*_{4,5} = 9.7 Hz, *J*_{5,6a} = 4.8 Hz, *J*_{5,6b} = 9.7 Hz), 2.17-2.67 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.07 (s, 3H, Lev), 2.03 (s, 3H, Lev), 1.93 (br-s, 1H, OH), 1.14 (t, 3H, SCH_2CH_3 , J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4, 206.3, 171.8, 171.7, 171.4, 165.0, 164.6, 164.2, 143.7, 138.2, 137.1, 136.8, 133.6, 133.2, 133.1, 132.1, 131.8, 129.9, 129.8, 129.7, 129.5, 129.4, 129.2 x 2, 129.0, 128.8, 128.4, 128.3, 128.2 x 3, 128.0, 127.8, 126.3, 126.1, 126.0, 123.8, 123.2, 102.0, 101.3, 101.0, 100.9, 99.7, 98.8, 84.4, 79.5, 79.0, 78.8, 78.4, 78.3, 75.6, 74.5, 74.2, 73.6, 73.4, 72.4, 71.6 x 2, 71.0, 68.6, 68.5, 66.5, 66.1, 63.7, 62.3, 45.6, 37.8, 37.6, 29.7, 29.6, 28.1, 27.9, 27.3, 27.2, 24.3, 24.1 x 2, 24.0 x 2, 18.9, 14.7, 13.7, 13.6; IR (solid): 3531, 2875, 1737, 1602, 1452, 1376, 1264, 984, 750, 703, 484 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for $C_{85}H_{89}O_{27}S[M+H]^+ m/z = 1573.5312$, found: 1573.5287.



Ethylthio

 $\label{eq:2-0-benzoyl-3-0-(2-0-benzoyl-6-0-(2-0-benzoyl-3,4,6-tri-0-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3-0-(2-0-benzyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranoside (4-42)$

A mixture of ethylthio 2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-*O*-benzyl-β-D-glucopy ranosyl)-4,6-O-benzylidene-B-D-glucopyranoside (4-41) (212 mg, 0.134 mmol, 1.00 eq.), O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-D-glucopyranosyl)trichloroacetimidate (4-13) (188 mg, 0.269 mmol, 2.00 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (134 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.34 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -10 °C. A catalytic amount of trimethylsilyltrifluoromethanesulfonate (2.43 µL, 13.4 µmol, 0.100 eq.) was added to the reaction mixture. After being stirred at 0 °C for 3 h, the reaction mixture was neutralized with triethylamine, filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The residue chromatographed on silica gel with 94:6 toluene:acetone ethylthio was to give 2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-

6-*O*-(2-*O*-benzoyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-*O*-benzyl-β-D-glucopyrano syl)-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranoside (**4-42**) (259 mg, 0.123 mmol, 91%).

[α]_D¹⁷ = -10.4 (c = 1.19, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.84 (d, 2H, aromatic, J = 7.7 Hz), 7.69 (d, 2H, aromatic, J = 7.2 Hz), 7.10-7.67 (m, 49H, aromatic), 5.47 (s, 1H, benzylidene), 5.41 (s, 1H, benzylidene), 5.36 (s, 1H, benzylidene), 5.26 (dd, 1H, B-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.15 (dd, 1H, C-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 8.7$ Hz), 5.00 (dd, 1H, D-3, $J_{2,3} = 9.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 4.93 (dd, 1H, D-2, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.2$ Hz), 4.88 (dd, 1H, E-2, $J_{1,2} = 6.3$ Hz, $J_{2,3} = 6.3$ Hz), 4.73-4.80 (m, 4H, C-1, A-2, PhCH₂), 4.54-4.66 (m, 6H, B-1, E-1, PhCH₂), 4.51 (d, 1H, D-1, $J_{1,2} = 7.7$ Hz), 4.46 (d, 1H, PhCH₂, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 4.13-4.26 (m, 4H, A-1, A-6a, C-6a, D-6a), 4.05 (d, 1H, PhCH₂, $J_{gem} = 12.1$ Hz), 3.85-3.96 (m, 4H, A-3, C-3, E-3, B-6a), 3.78 (dd, 1H, B-3, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 3.69 (dd, 1H, A-6b, $J_{5,6a} = 10.1$ Hz, $J_{gem} = 10.1$ Hz), 3.45-3.65 (m, 9H, C-4, D-4, B-5, E-5, E-6a, B-6b, C-6b, D-6b, E-6b), 3.40 (dd, 1H, E-4, $J_{3,4} = 9.2$ Hz), 4.40 (dd, 1

7.7 Hz, $J_{4,5} = 9.2$ Hz), 3.15-3.32 (m, 5H, A-4, B-4, A-5, C-5, D-5), 2.22-2.68 (m, 10H, Lev, SCH₂CH₃), 2.07 (s, 3H, Lev), 2.02 (s, 3H, Lev), 1.15 (t, 3H, SCH₂CH₃, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4 x 2, 171.8, 171.4, 165.4, 165.0, 164.7, 164.2, 138.3, 138.2, 137.9, 137.4, 137.1, 136.8, 133.5, 133.1, 133.0, 130.2, 129.9 x 2, 129.8, 129.6 x 2, 129.2, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6 x 2, 128.4, 128.3 x 2, 128.2 x 3, 128.0 x 2, 127.9, 127.8 x 2, 127.7, 127.6 x 2, 126.6, 126.1, 126.0, 125.4, 101.6, 101.3, 101.0, 100.9, 100.8, 99.4, 98.2, 84.0, 82.7, 79.3 x 2, 79.0, 78.9, 78.4, 78.3, 78.1, 75.7, 75.1, 75.0, 74.8, 74.3, 74.0, 73.8, 73.6, 73.5, 73.4, 72.3, 71.7, 71.6, 71.0, 68.6, 68.5 x 2, 68.4, 66.4, 66.1, 37.9, 37.7, 29.7, 29.6, 27.9, 27.4, 24.1, 14.8; IR (solid): 2967, 2318, 1955, 1730, 1602, 1451, 1265, 1096, 772, 702, 527 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₁₉H₁₂₄NO₃₃S [M+NH₄]⁺ m/z = 2126.7776, found: 2126.7778.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-3,4,6-tri-0-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-3-d-glucopyranosyl)-3-d-glucopyranosyl-3-d-glucopyranosyl-3-d-glucopyranosyl-3-d-glucopyranosyl-3-d-gluco$

A mixture of 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -*O*-benzoyl-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-6-*O*-(2-*O*-benzoyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-4-*O*-benzylidene -3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)-4-*O*-benzyl- β -D-gl ucopyranosyl)-4,6-*O*-benzylidene- β -D-glucopyranoside (**4-42**) (158 mg, 74.9 mmol, 1.20 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (374 mg) in dry CH₂Cl₂ (3.74 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. *N*-iodosuccinimide (20.2 mg, 89.9 µmol, 1.44 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (1.66 µL, 18.7 µmol, 0.300 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene:acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give 6-azidohexyl 2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(2-*O*-benzoyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2 -*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl

 $[\alpha]_{D}^{21} = -5.37$ (c = 0.980, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98-8.01 (m, 4H), 7.91 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.81 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.76 (d, 2H, J = 7.7 Hz), 7.63 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.03-7.61 (m, 73H), 5.48 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.25 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, 8.7 Hz), 5.09-5.17 (m, 2H), 4.88-5.05 (m, 8H), 4.76-4.84 (m, 5H), 4.64-4.69 (m, 3H), 4.54-4.61 (m, 3H), 4.50 (br-d, 2H, J = 7.7 Hz), 4.40-4.46 (m, 2H), 4.29-4.34 (m, 2H), 4.05-4.23 (m, 7H), 3.98 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, 10.1 Hz), 3.20-3.94 (m, 36H), 3.14 (ddd, 1H, J = 4.8 Hz, 9.7 Hz, 10.1 Hz), 3.01-3.06 (m, 3H), 2.25-2.72 (m, 10H, Lev, H-2, OH), 2.07 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 1.10-1.48 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.3 x 2, 171.7, 171.3, 169.3, 165.4, 165.2, 165.1, 164.8, 164.7, 163.9, 138.7, 138.4, 138.3, 138.0, 137.6, 137.2 x 2, 136.9, 136.8, 133.7, 133.4, 133.3, 133.2 x 2, 133.0 x 2, 129.8 x 2, 129.7, 129.6, 129.5 x 2, 129.2 x 3, 129.1 x 2, 129.0, 128.9, 128.8 x 2, 128.7, 128.6, 128.5 x 2, 128.4, 128.3, 128.2 x 2, 128.1 x 2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5 x 2, 127.4, 126.4, 126.3, 126.2 x 2, 126.1, 126.0 x 2, 102.6, 101.6 x 2, 101.5, 101.4, 101.3, 101.2, 101.0, 100.9, 100.8, 100.6, 99.9, 99.2, 98.7, 98.5, 97.7, 82.8, 79.5, 78.8, 78.6, 78.5, 78.4, 78.3, 78.0, 77.8, 76.3, 76.0, 75.9, 75.7, 75.2, 74.8, 74.3 x 2, 74.1 x 2, 74.0, 73.9, 73.8, 73.4, 73.3, 72.1, 71.6, 69.8, 69.2, 68.7 x 3, 68.6 x 2, 68.5 x 2, 68.4 x 3, 68.3, 66.6 x 2, 66.3, 66.1, 65.9, 65.6, 65.2, 51.2, 37.8, 37.6, 29.6 x 2, 29.2, 28.5, 27.9, 27.3, 26.2, 25.3, 20.4; IR (solid): 3513, 2869, 2092, 1734, 1451, 1374, 1264, 1069, 752, 696, $654, 501 \text{ cm}^{-1}$.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-3,0-(2-0-benzoyl-3-0-(2-0-benzoyl-3-0-(2-0-benzoyl-3,4,6-tri-0-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(4,6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)-4-0-benzyl-\beta-D-glucopyranosyl)-4,6-0-benzylidene-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopy$

A mixture of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylide ne-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-g $|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl)-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|ucopyranosyl]-\beta-D-g|uco$ ucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-45) (73.0 mg, 27.2 μmol, 1.00 eq.), ethylthio 2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzo yl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-(4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosy l)-4-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranoside (4-42) (86.0 mg, 40.8 μmol, 1.50 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (163 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.63 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. N-iodosuccinimide (11.0 mg, 48.9 µmol, 1.80 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (1.20 µL, 13.6 mmol, 0.500 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. $NaHCO_3$ and 10% aq. $Na_2S_2O_3$ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated *in vacuo*. The residue was chromatographed on silica gel with 91:9 toluene: acetone and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-6 enzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-B-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylide ne-2,3-di-O-levulinovl-B-D-glucopyranosyl)-B-D-glucopyranosyl)-4.6-O-b enzylidene- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl ranoside (4-50) (102 mg, 21.5 µmol, 79%).

 $[\alpha]_{D}^{21} = -9.17$ (c = 0.960, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96-8.00 (m, 8H), 7.90 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.81 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 7.75 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 6.99-7.63 (m, 101H), 5.51 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.24 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, 8.7 Hz), 5.11-5.16 (m, 4H), 4.76-5.02 (m, 21H), $4.54-4.70 \text{ (m, 8H)}, 4.49 \text{ (d, 1H, } J = 6.8 \text{ Hz)}, 4.48 \text{ (d, 1H, } J = 7.7 \text{ Hz)}, 4.40-4.45 \text{ (m, 2H)}, 4.31-4.34 \text{ (m, 2H)}, 4.40-4.45 \text{ (m, 2H$ 3.22-4.22 (m, 64H), 3.14 (ddd, 1H, J = 4.8 Hz, 8.7 Hz, 9.2 Hz), 3.00-3.07 (m, 3H), 2.22-2.67 (m, 10H, Lev, H-2, OH), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.10-1.48 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 208.1, 206.4, 171.8, 171.4, 169.3, 169.1, 169.0, 165.3, 165.1, 164.9, 164.8 x 2, 138.7, 138.4, 138.3, 138.0, 137.7, 137.4, 137.3 x 3, 137.0, 136.9, 133.4 x 2, 133.3 x 2, 133.2, 133.1, 130.0 x 2, 129.8 x 2, 129.7 x 2, 129.6 x 2, 129.5 x 2, 129.4, 129.3 x 2, 129.2 x 3, 129.1 x 2, 129.0 x 2, 128.9 x 2, 128.8, 128.7, 128.6 x 2, 128.5 x 2, 128.3, 128.2 x 2, 128.1 x 2, 128.0, 127.9 x 2, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 126.5, 126.4, 126.3, 126.2, 126.1 x 3, 102.7, 101.8, 101.7, 101.6 x 2, 101.5 x 2, 101.4, 101.3, 101.2 x 2, 101.1 x 2, 101.0, 100.8, 100.6, 100.0, 99.2, 98.6 x 2, 98.5 x 2, 98.2, 98.0, 97.8, 82.9, 78.8, 78.7, 78.5 x 2, 78.4, 78.3, 78.2 x 2, 78.0, 77.9, 76.5, 76.1, 76.0, 75.9 x 2, 75.7, 75.2, 74.9, 74.4, 74.3, 74.2 x 2, 74.1, 73.9 x 2, 73.8, 73.5, 73.4, 72.4, 72.1, 71.6, 69.9, 68.8, 68.7 x 3, 68.6 x 3, 68.5, 68.4 x 2, 66.7, 66.6, 66.4, 66.1 x 2, 66.0 x 2, 65.8, 65.6 x 2, 65.2, 53.5, 51.2, 37.9, 37.7, 29.7, 29.6, 29.3, 28.6, 28.0, 27.4, 26.3, 25.4, 20.6 x 2, 20.5; IR (solid): 3631, 2964, 2093, 1734, 1412, 1258, 1089, 773, 696, 500 cm⁻¹.



6-Azidohexyl

 $\label{eq:2-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-acetyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-4,6-0-benzylidene-3-0-(2-0-benzoyl-3,4,6-tri-0-benzyl-3-D-glucopyranosyl)-3-0-(2-0-benzoyl-4, 6-0-benzylidene-2,3-di-0-levulinoyl-\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-gluc$

A mixture of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benz

ne-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzyli dene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-be nzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl copyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl copyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-47) (70.0 mg, 17.6 μmol, 1.00 eq.), ethylthio 2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-B-Dglucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-B-D-glu copyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosid e (4-42) (55.7 mg, 26.4 mol, 1.50 eq.) (azeotroped twice with dry toluene) and pulverized activated MS-4A (176 mg) in dry CH₂Cl₂ (1.76 mL) was stirred at room temperature for 30 min under argon to remove a trace amount of water. Then the reaction mixture was cooled to -35 °C. N-iodosuccinimide (7.13 mg, 31.7 μmol, 1.80 eq.) and a catalytic amount of trifluoromethanesulfonic acid (0.467 μL, 5.28 μmol, 0.300 eq.) were added to the reaction mixture. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was neutralized with triethylamine and filtered through a pad of Celite. The filtrate was poured into a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃ with cooling. The aqueous layer was extracted with two portions of ethyl acetate. The combined extract was washed with a mixture of saturated aq. NaHCO₃ and 10% aq. Na₂S₂O₃, and brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with 85:15 toluene:ethyl acetate and further purified by gel permeation chromatography (GPC) to give 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3 zoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O -acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2 -O-benzoyl-4.6-O-benzoylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-ben zyl-B-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinovl -β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucop yranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyr anosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyr anosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (4-51) (87.0 mg, 14.4 μ mol, 82%).

 $[\alpha]_D^{21} = -10.6 (c = 2.16, CHCl_3);$ ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96-8.01 (m, 14H), 7.90 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 7.81 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 7.74 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 6.99-7.63 (m, 125H), 5.52 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.25 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, 8.7 Hz), 5.09-5.17 (m, 6H), 4.76-5.03 (m, 29H), 4.54-4.70 (m, 10H), 4.48 (br-d, 2H, *J* = 7.7 Hz), 4.40-4.45 (m, 2H), 4.31-4.35 (m, 2H), 3.12-4.22 (m, 85H), 3.00-3.07 (m, 3H), 2.17-2.67 (m, 10H, Lev, H-2, OH), 2.07 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.76 (s, 12H), 1.72 (s, 3H), 1.10-1.48 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4 x 2, 171.8, 171.4, 169.3, 169.1 x 2, 165.7 x 3, 165.3, 165.1, 165.0, 164.9 x 2, 164.8, 164.0, 138.7, 138.5, 138.4, 138.1, 137.7, 137.5 x 2, 137.4, 137.3 x 2, 137.1,

136.9, 134.1, 134.0 x 3, 133.7, 133.6, 133.4 x 2, 133.3 x 3, 133.2, 133.1 x 2, 130.3, 130.2 x 2, 130.1, 129.8 x 2, 129.7, 129.6, 129.5 x 2, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6 x 2, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2 x 2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6 x 2, 127.4, 126.6 x 3, 126.4 x 2, 126.3, 126.2, 126.1, 102.7 x 2, 102.5, 101.8 x 3, 101.7 x 2, 101.6 x 2, 101.5 x 3, 101.4 x 3, 101.3 x 2, 101.2 x 2, 101.1 x 3, 101.0, 100.9, 100.7 x 2, 100.1, 100.0, 99.2, 98.7, 98.6, 98.5, 98.4 x 3, 98.3 x 2, 98.2, 98.1, 98.0 x 3, 97.9 x 2, 82.9, 79.6, 79.5, 79.0, 78.9, 78.8, 78.7, 78.5, 78.4, 78.3, 78.2, 78.1, 77.9, 77.8 x 2, 77.7 x 3, 76.5 x 2, 76.4, 76.0 x 3, 75.9, 75.8, 75.7, 75.6 x 2, 75.5 x 2, 75.3 x 2, 75.2 x 2, 74.9, 74.4 x 2, 74.2 x 3, 73.9 x 2, 73.8, 73.5, 73.4, 72.4, 72.1, 71.7, 70.6, 69.9, 68.9, 68.7, 68.6 x 2, 68.4, 66.7, 66.6, 66.4, 66.1 x 2, 66.0, 65.8, 65.7, 65.6, 51.3, 37.9, 37.7, 29.7, 29.6, 29.3, 28.6, 28.0, 27.4, 26.3, 25.4, 20.7, 20.6, 20.5; IR (solid): 3729, 2863, 2344, 2138, 1968, 1734, 1496, 1368, 1218, 1023, 876, 770, 654, 508 cm⁻¹.



6-Aminohexyl

$\label{eq:solution} \begin{array}{l} 3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-3-O-(3-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl$

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-6-O zoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benz ylidene-β-D-glucopyranosyl)-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyran osyl)-β-D-glucopyranoside (4-49) (33.9 mg, 9.85 μmol, 1.00 eq.) in NH₃/THF/EtOH (8.50 mL/1.00 mL/0.500 mL) was added a large amount of lithium (100 mg) at -78 °C. After being stirred under reflux for 1.5 h, the reaction mixture was added methanol (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was purified by size exclusion column chromatography on Sephadex LH-20 eluted with water and further purified by revese-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with 90:10 water:methanol to give 6-aminohexyl $3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(3-O-(6-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-3-O-(3-O-(\beta-D-glucopyranosyl)-\beta-D-glucopyranosyl)$ $-\beta$ -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl) - β -D-glucopyranoside (**4-6**) (15.5 mg, 9.83 μ mol, quant.).

 $[\alpha]_{D}^{24} = -24.2$ (c = 0.335, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.70-4.80 (m, 7H, anomericH x 7), 4.49 (d, 1H,

anomericH, J = 7.7 Hz), 4.44 (d, 1H, anomericH, J = 7.7 Hz), 4.18 (br-d, 1H, J = 10.6 Hz), 3.27-3.91 (m, 55H), 2.80 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 1.51-1.63 (m, 4H), 1.35-1.36 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.6 x 2, 103.4 x 2, 102.7, 85.7, 85.5, 85.2, 85.1, 84.8, 76.8, 76.7, 76.5, 76.4, 75.4, 74.3, 74.1, 74.0 x 2, 73.9, 73.8, 73.7, 71.2, 70.4, 69.6, 69.0 x 2, 68.9, 61.5, 40.5, 29.3, 28.5, 26.2, 25.4; IR (solid): 3481, 2884, 1846, 1669, 1438, 1314, 1153, 1032, 855, 664, 526 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₆₀H₁₀₆NO₄₆ [M+H]⁺ m/z = 1576.5986, found: 1576.5981.



6-Aminohexyl

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-benzy 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidenabenzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-B-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4, 6-O-benzylidene-3-O-(4,6-O-benzylidene-2,3-di-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyran $osyl)-\beta-D-glucopyranosyl$ osyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (4-50) (16.1 mg, 3.40 μmol, 1.00 eq.) in NH₃/THF/EtOH (8.50 mL/1.00 mL/0.500 mL) was added a large amount of lithium (100 mg) at -78 °C. After being stirred under reflux for 1.5 h, the reaction mixture was added methanol (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by size exclusion column chromatography on Sephadex LH-20 eluted with water and further purified by revese-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with 80:20 water:methanol to give 6-aminohexyl 3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(3-*O*-(6-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-3-*O*-(3-*O*-(β-D-glucopyranosyl) $-\beta$ -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl -β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl) -β-D-glucopyranoside (**4-5**) (6.10 mg, 2.74 μmol, 81%).

 $[\alpha]_{D}^{24} = -22.9$ (c = 0.135, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.70-4.76 (m, 11H, anomericH x 11), 4.49 (d, 1H, anomericH, *J* = 7.7 Hz), 4.45 (d, 1H, anomericH, *J* = 8.7 Hz), 4.18 (br-d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 3.27-3.91 (m, 79H), 2.79 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 1.52-1.63 (m, 4H), 1.35-1.37 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.6, 103.4 x 2, 102.5, 85.1, 76.5, 76.4, 74.1, 74.0, 70.4, 69.0, 68.9, 61.5, 40.6, 29.3, 29.0, 26.2, 25.4; IR (solid): 3413, 2885, 1821, 1648, 1591, 1368, 1154, 1077, 1042, 652, 519 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₈₄H₁₄₆NO₆₆ [M+H]⁺ *m/z* = 2224.8099, found: 2224.8054.



6-Aminohexyl

To a stirred solution of 6-azidohexyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-Obenzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzy 6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-0-benzylidena-3-0-benzylidena-3-0-0-benzylidena -4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-(2-O-acetyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidene-3-O-benzylidene-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-O-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0-(2-O-benzylidena-3-0 zoyl-4,6-O-benzylidene-3-O-(3-O-(2-O-benzoyl-3-O-(2-O-benzoyl-6-O-(2-O-benzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-3-O-(2-O-benzoyl-4.6-O-benzylidene-3-O-(4.6-O-benzylidene-2.3-di-O-levulinovl-B-D-g lucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-4-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-4,6-O-benzylidene-β-D-glucopyranos yl)-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl) - β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (4-51) (40.7 mg, 6.75 μ mol, 1.00 eq.) in NH₃/THF/EtOH (8.50 mL/1.00 mL/0.500 mL) was added a large amount of lithium (100 mg) at -78 °C. After being stirred under reflux for 1.5 h, the reaction mixture was added methanol (1.00 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was purified by size exclusion column chromatography on Sephadex LH-20 eluted with water and further purified by revese-phase column chromatography (Bond Elut-C18) with 70:30 water:methanol to give 6-aminohexyl glucopyranosyl)-3-*O*-(3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyran osyl)-β-D-glucopyranosyl

osyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside (**4-4**) (9.80 mg, 3.41 μ mol, 51%).

 $[α]_D^{24}$ = -31.9 (c = 0.125, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.70-4.76 (m, 15H, anomericH x 15), 4.49 (d, 1H, anomericH, *J* = 7.7 Hz), 4.44 (d, 1H, anomericH, *J* = 7.7 Hz), 4.18 (br-d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 3.26-3.95 (m, 103H), 2.82 (br-s, 1H), 2.50 (br-s, 1H), 1.55-1.64 (m, 4H), 1.36 (br-s, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 103.6, 103.3, 85.1, 85.0 x 2, 76.5, 74.2, 74.1, 74.0 x 2, 70.4, 69.3, 68.9, 61.6, 61.5, 20.9; IR (solid): 3308, 2897, 1982, 1811, 1656, 1373, 1043, 891, 649, 526 cm⁻¹; HRMS (ESI-TOF) calcd for C₁₀₈H₁₈₆NO₈₆ [M+H]⁺ *m/z* = 2873.0212, found: 2873.0244.



STD-NMR Experiments

¹H-NMR spectra were recorded with 500 MHz and 600 MHz spectrometer (DRX-500, DRX-600, Bruker) equipped with either triple resonance inverse cryogenic (cryo-TXI) probe or a triple resonance inverse (TXI) probe. Dectin-1 (10 μ M, 500 μ L) in PBS (8.1 mM Na₂HPO₄and 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM, and KH₂PO₄ (pH 7.4)) was prepared for NMR experiments, and 10% D₂O was added to obtain lock signal. β -Glucans were added to the corresponding NMR samples.

In saturation transfer difference (STD)-NMR experiments, the protein signal at 7.5 ppm was saturated with Gaussian 25 Hz pulse train with 60 times (on-resonance). Reference spectra were obtained by the irradiation of 40 ppm (off-resonance). The on-resonance and off-resonance spectra were collected in each scans to be as a set, and accumulated in different raw. Water suppression was achieved using WATERGATE pulse program with p3919 pulse train, and probe temperature was set at 5 °C. Either 512 scans or 1024 scans with 4 times loops were required to obtain good signal to noise ratio (S/N). Protein signal was partially suppressed using T2_{σ} filter. Chemical shifts indicated with parts per million (ppm) were calibrated based on the outer standards of the chemical shift of 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) at 0 ppm. NMR data were treated with XWIN-NMR (ver.3.5) and displayed using XWIN-PLOT (ver.3.5).



Millions

3.2

3.3 X : parts per Million : 1H 3.1

3.0



2.9

2.8

2.7

mp_s. 10 acq_durv angle domain Lfreq L offact K points X preacs X preacs X resolu X resolu X resolu Tri90 Tri, noi

= 16384 = 1 = 5.5[us] = 0.40325539[Hz] = 7.93765637[XHz] = 10[us] = WALTZ



















HO-

-0

30.0

OHO

OH

HO

Ō

OHO

ОН

HO-

-0

OHO

юн

HO

 \cdot

O HO

он

HO-

HO-HO


































第5章

βグルカン糖鎖固定化微粒子の開発

5-1 はじめに

4章の結果から、アミノアルキル基を有する16糖および17糖はデクチン1と強い結合を示し、 さらに、微弱ながらもデクチン1を介した自然免疫活性化作用を示した。これらはデクチン1を介 した生物プロセスの過程を解析するための有用なケミカルプローブになると期待できる。本章では、 4章で合成したβグルカン糖鎖を微粒子上に束ねた糖鎖固定化微粒子の開発を行う。多価相互作用 が期待できるこれらの微粒子は、高い自然免疫活性化作用を示すだけでなく、蛍光標識化された微 粒子を用いることにより細胞への作用を追跡することが可能になる。すなわち、自然免疫活性化プ ロセス研究のための優れたケミカルプローブになると期待した。本研究では、粒径の異なる微粒子 への糖鎖の固定化とその機能評価を行う(Figure 5-1)。



Figure 5-1

5-2 合成計画

糖鎖とタンパク質の相互作用は一般的にはそれほど大きなものではない。そこで、糖鎖を微粒子 に集積化することで、より強い相互作用を発揮する多価効果を期待した。糖鎖固定化微粒子を設計 するにあたり、前章で開発したデクチン1結合性かつ免疫活性化作用を示したアミノアルキル基を 有する16糖を用いる。微粒子としては、蛍光標識された均一サイズのビーズを用いて固定化を行 う。このような糖鎖蛍光微粒子を開発することで、粒子サイズに依存する白血球細胞における異物 の取り込み(エンドサイトーシス)や、エンドサイトーシスと免疫活性化の関係を明らかにできる 分子プローブになると期待できる(Figure 5-2)。



Figure 5-2

第一部 「BioAct gelを固相担体として用いる糖鎖固定化微粒子の合成とその機能評価」

まず、BioAct gelを固相担体として選択し、糖鎖固定化微粒子の合成を計画した。BioAct gel AMI は、ポリヒドロキシメタクリレートで構成される粒径 20~40 μm の微粒子であり、表面に13炭素 のアルキル鎖をスペーサーとする一級アミノ基を有している。主に、標的探索用アフィニティー微 粒子として用いられるため、タンパク質の非特異的吸着が少ない。さらに、有機溶媒耐性を有して いるために、基質を固定化するために様々な有機反応が適応可能である。しかしながら、蛍光標識 化されてはいない。アミノ基を有する糖鎖を固定化するために、固相上のアミノ基をイソチオシア ネート基に変換した微粒子 5-2 の合成を計画した。イソチオシアネート基は安定な置換基であり、 弱塩基性条件下、アミノ基を有する化合物と特異的に結合し、チオウレアを形成する。他の結合反 応と比べて反応性は高いものではないが、水溶媒中においても安定であり、有用である。インチオ シアネートビーズ 5-2 はアミノビーズ 5-1 から変換する (Figure 5-3)。





5-3 精鎖固定化微粒子の合成法の確立と機能評価

微粒子 BioAct gel AMI(粒径 20~40 µm)を用いて4章において合成した糖鎖(直鎖8、12、 16糖と分岐9、13、17糖)の担持を行い、機能評価を行う。アミノ基を有する微粒子のイソ チオシアネート化および、糖鎖のチオウレア化を伴う担持について検討する。

5-3-1 微粒子に対する糖鎖担持の検討

BioAct gel アミノ体 5-5 のイソチオシアネート化の検討を行った(Scheme 5-1、Table 5-1)。反応の進行はカイザーテストによって残存アミンを検出することで確認した。まず、アミンの簡便な イソチオシアネート化の方法として塩基性条件下、アミノ体 5-5 に対しチオホスゲンを作用させた

(Entry 1~4)。アミノ体 5-5 を水/ジオキサン混合溶媒中、無機塩基とチオホスゲンを加えて反応を行った。24 時間反応後、洗浄により後処理を行った。しかしながら、種々無機塩基を用いるも、アミノ基の消失は見られなかった。固相上では反応性が低いこと、また、チオホスゲンが不安定な試薬であることから、反応が進行する前に試薬が分解してしまったものと考えられる。そこで、より安定なイソチオシアネート化試薬である di-2-pyridyl thionocarbonate (以下 DPT)¹⁾を用いて反応を行った(Entry 5)。アミノ体 5-5 を DMF 溶媒中、DPT (0.1 M)を加えることで反応を行った。24 時間反応後、洗浄により後処理を行った。カイザーテストを行ったところ、アミノ基の消失が確認された。以上により、微粒子上のアミノ基を全てイソチオシアネート化することに成功した。



Scheme 5-1

Entry	Reagent	Base	Solvent	kaiser test
1	thiophosgene	NaOH	H ₂ O/Dioxane (1/1)	(+)
2	thiophosgene	Na ₂ CO ₃	H ₂ O/Dioxane (1/1)	(+)
3	thiophosgene	NaHCO ₃	H ₂ O/Dioxane (1/1)	(+)
4	thiophosgene	phosphate buffer (pH 8.0)	H ₂ O/Dioxane (1/1)	(+)
5	DPT	none	DMF	(-)

Table 5-	1
----------	---

続いて、単糖アミノ体 5-7 を用いて糖鎖の担持の検討を行った(Scheme 5-2)。この際の糖鎖の 検出方法としてフェノール硫酸法²⁾を用いた。この手法は硫酸によって糖鎖を分解してフェノール 付加体とし、分光光度計(490 nm)にて糖鎖量を大まかに比色定量するものである。イソチオシア ネートビーズ 5-6 を 0.1 M 重曹水溶液溶媒中、単糖アミノ体 5-7 を加えて担持を行った。24 時間反 応後、洗浄により後処理を行った。得られたビーズ 5-8 は、フェノール硫酸法により糖鎖が担持さ れていることを確認した(糖鎖量 1.8 mg/g-beads)。



Scheme 5-2

単糖の担持に成功したので、4 章において合成した糖鎖(直鎖8、12、16糖と分岐9、13、 17糖)の担持を行った(Scheme 5-3)。イソチオシアネートビーズ 5-6 を 0.1 M 重曹水溶液溶媒 中、それぞれの糖鎖アミノ体(5-9~14)を加えて担持を行った。24時間反応後、洗浄により後処 理を行った。得られたビーズ 5-15~20 は、フェノール硫酸法により糖鎖の担持量を確認した(糖 鎖量 5-15(1.1 mg/g)、5-16(2.3 mg/g)、5-17(3.4 mg/g)、5-18(2.5 mg/g)、5-19(3.1 mg/g)、5-20 (2.7 mg/g))。このことから、それぞれ均一な糖鎖を担持した微粒子の合成を達成した。以上によ り、チオウレア形成を伴う糖鎖担持の方法が16糖などの大きな糖鎖を用いる際に有用であること が分かった。



Scheme 5-3

5-3-2 BioAct gelを用いた糖鎖固定化微粒子の機能評価

BioAct gel を用いた糖鎖固定化微粒子とデクチン1との結合試験を 行った。糖鎖固定化微粒子に対して1次抗体を有するデクチン1を作用 させ、その後、蛍光剤 (FITC)を有する2次抗体を作用させてデクチン 1に結合させた (Figure 5-4)。フローサイトメトリーを用いて、微粒 子に対する蛍光強度の測定を行った。この際、デクチン1が微粒子に結 合するほど、蛍光強度の強い微粒子が多く見られるはずである。結果を Figure 5-5 に示す。横軸は蛍光強度であり、縦軸は微粒子数を表す。ま た、黒線は糖鎖固定化微粒子のみを測定したものであり、緑線は糖鎖固 定化微粒子にデクチン1を作用させて行ったものである。この比較を行 うことで結合の有無を検討する。



Figure 5-4



Figure 5-5

この結果より、16糖微粒子 5-17 と17糖微粒子 5-20のみ微粒子の蛍光強度が増加し、デクチン1と結合していることがわかった。しかしながら、主鎖を12糖とする糖鎖固定化微粒子以下はデクチン1との結合が確認できなかった。この結果より、糖鎖のクラスター効果は主鎖12糖以下の糖鎖では期待できないと考えられる。

続いて、免疫活性化試験を行った。BioAct gel を用いた糖鎖固定化微粒子(直鎖 8 糖 5-15、1 6 糖 5-17、分岐1 7 糖 5-20 および)の、デクチン1およびそのシグナルシステムを導入した細胞 を用いる NF-κB の活性化について検証した。測定結果を Figure 5-6 に示す。横軸はイソチオシア ネート微粒子 5-6 と種々糖鎖固定化微粒子(2.5 mg/ml)、および、天然βグルカン(SPG、2.5 µg/ml) であり、縦軸は NF-κB にアシストされるホタルルシフェラーゼとチミジンキナーゼ(TK)プロモー ターにアシストされるウミシイタケルシフェラーゼ(バックグラウンド)の比である。糖鎖を加え ないで測定したもの(Nii)を 1.0 としている。測定結果より、結合作用が見られた1 6 糖微粒子 5-17、1 7 糖微粒子 5-20 には、天然物と比較すると微弱ではあるが、デクチン1を介した免疫活 性化作用を有することを見出した。微粒子自体(5-6)は免疫活性化に影響がなく、微粒子の糖鎖 が免疫活性化に寄与している結果である。



NF-kB activation by dectin-1/293T stimulated with BA-oligo

```
Figure 5-6
```

5-3-3 まとめ

取り扱い容易なビーズである BioAct gel をモデルとして用いて糖鎖の担持を行い、デクチン1 との結合評価、および、免疫活性化評価を行った。その結果、糖鎖アミンと微粒子イソチオシアネ ートを用いるチオウレアを形成する結合によって、糖鎖固定化微粒子を得ることに成功した。また、 得られた微粒子はデクチン1と結合することが分かり、結合した糖鎖固定化微粒子は免疫活性化を することを確認した。しかしながら、多価相互作用を利用する強力な生物活性を有する微粒子が合 成できたとは言い難い。

第二部「蛍光微粒子 Fluoresbrite[®]を用いる糖鎖固定化微粒子の合成とその機能評価」

自然界における自然免疫の活性化プロセスでは、真菌等の病原性細菌を貪食細胞が貪食すること によって、破壊する。貪食のプロセスには、対象細菌の大きさが重要であることが知られている。 そこで、本研究では、より小さい貪食される可能性のある微粒子に糖鎖を固定化することにより、 より強い自然免疫活性化作用を示す微粒子の合成を目指した。また、その際、蛍光微粒子を用いる ことにより貪食作用そのものをイメージングできる微粒子の創製に繋がると期待した。

蛍光微粒子 Fluoresbrite[®]は、表面にカルボン酸を有する微粒子として市販されている。そこで、 本研究では、カルボン酸を直接活性化することによる糖鎖の固定化法を用いることとした(Figure 5-7)。Fluoresbrite[®]は、ポリスチレンで構成され表面処理された微粒子であり、非常に小さい粒 径の微粒子、かつ、均一性が高い(<15%)。また、有機溶媒によってビーズが損壊するため、水溶 媒のみ使用可能である。水溶媒中において16糖とのカップリングが進行する条件で反応を行わな くてはならない。



0.1, 0.5, 2, 4.5, 10 μ m FITC (λ_{ex} = 441.53, λ_{em} = 485.56)

Figure 5-7

5-4 精鎖固定化蛍光微粒子の合成法の確立と機能評価

蛍光微粒子 Fluoresbrite[®](粒径 0.1、0.5、2.0、4.5、10 μm)を用いて直鎖16糖 5-11 の担 持を行い、機能評価を行う。水溶媒中、カルボン酸を有する微粒子のアミド化を伴う担持について 検討する。

5-4-1 微粒子に対する糖鎖担持の検討

まず、水溶媒中でカルボン酸とアミンの縮合反応が進行するかどうかの検討を行った。この際、 水溶性の縮合剤として EDCI-HC1 および 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-y1)-4-methyl morpholinium chloride(以下 DMT-MM)³⁾を用いた。EDCI-HC1 はアフィニティービーズ上にタンパク 質を担持する試薬として広く使用されている。また、DMT-MM はアルコール溶媒および水溶媒中にお いて、アミンとカルボン酸の縮合が選択的に行われると報告されている試薬である。まず、ベンジ ルアミン 5-21 およびペンテン酸 5-22 を用いて液相の検討を行った(Scheme 5-4、Table 5-2)。ペ ンテン酸 5-22(1.5 当量)を 0.1 M 重曹水溶液溶媒中、縮合剤(0.1 M) およびベンジルアミン 5-21 (1.0 当量)を加えて反応を行った。比較的濃度を高く縮合剤(0.1 M)を用いたものの、EDCI-HC1 を用いた反応では早い段階で反応が停止し、低収率(29%)となった(Entry 2)。これは、カルボン 酸とカルボジイミドの縮合剤により生成する活性化エステルが非常に不安定であり、塩基性条件下 容易に分解してしまうためだと考えられる。これに対し、比較的安定な活性化エステルを生成する DMT-MM は(ジメトキシトリアジンエステル)、反応の進行は遅いものの、高収率(79%)で目的の縮 合反応が進行した(Entry 1)。



Scheme 5-4



Table 5-2

嵩高い16糖の微粒子へのカップリングは反応性が低いと考えられるため、不安定な EDCI-HC1 ではなく、DMT-MM を用いることにした。

蛍光微粒子への担持を行った (Scheme 5-5)。様々なサイズのカルボン酸ビーズ (5-24(0.1 μm)、 5-25(0.5 μm)、5-26(2 μm)、5-27(4.5 μm)、5-28(10 μm))を 0.1 M 重曹水溶液溶媒中、16糖ア ミノ体 5-11 と DMT-MM (0.5 M)を加えて担持を行った。24 時間反応後、微粒子上に残ったカルボ ン酸に対しエタノールアミン (0.5 M)を加えて縮合することでキャッピングし、遠心分離機によ る洗浄により後処理を行った。得られたビーズ 5-29~33 は、490 nm 付近に蛍光を有する為にフェ ノール硫酸法による担持量の決定が行えない。糖鎖の担持の有無についてはデクチン1との結合試 験により決定する。



5-29(0.1 μm), 5-30(0.5 μm), 5-31(2 μm), 5-32(4.5 μm), 5-33(10 μm)

Scheme 5-5

5-4-2 糖鎖固定化蛍光微粒子の形状の評価

得られた糖鎖固定化蛍光微粒子の形状の評価を SEM 測定によって行った。反応および後処理において微粒子が損壊する可能性が考えられる。構造が均一でなければサイズ依存の生物評価の検討は難しい。本測定は、東京工業大学冨田育義准教授の指導のもと行なった。結果を以下に示す (Figure 5-8)。

SEM 画像の結果から、5-25(0.5 µm)と5-26(2 µm)、5-27(4.5 µm)、5-28(10 µm)のビーズは損壊 が見られず、均一な球体であることが分かった。また、5-24(0.1 µm)のビーズは検出限界以下であ り、測定できなかった。



糖鎖固定化蛍光ビーズの SEM 画像(左上 0.5 μm、右上 2 μm、左下 4.5 μm、右下 10 μm ビーズ) Figure 5-8

以上の結果から 0.1 µm の微粒子を除く4種の糖鎖固定化微粒子が均一な球体であることが分かり、損壊は見られなかった。

5-4-3 糖鎖固定化蛍光微粒子の機能評価

糖鎖固定化蛍光微粒子とデクチン1との結合試験を行った。結果を Figure 5-9 に示す。黒線は 糖鎖固定化蛍光微粒子のみを測定したものであり、緑線は糖鎖固定化蛍光微粒子にデクチン1を作 用させて行ったものである。この比較を行うことで結合の有無を検討する。この結果より、5-26(2 μ m)と 5-27(4.5 μ m)、5-28(10 μ m)のビーズはデクチン 1 との結合が確認された。しかしながら 5-24(0.1 μ m) と 5-25(0.5 μ m)のビーズの検出は困難であり、それらのデクチン1 結合の有無は評 価できなかった。



Figure 5-9

以上により、2、4.5、10 µm の蛍光微粒子には16糖の担持が行われていると考えられ、目的と する糖鎖固定化蛍光微粒子の開発に成功した。

5-4-4 まとめ

蛍光微粒子 Fluoresbrite[®](粒径 0.1、0.5、2.0、4.5、10 μm)を用いて糖鎖の担持を行い、微 粒子の形状の評価、および、デクチン1との結合評価を行った。その結果、水溶媒中で反応が行え る縮合剤 DMT-MM を用いた、16糖アミンと微粒子カルボン酸のアミドを形成する結合によって、 16糖微粒子の合成を試みた。得られた微粒子のうち、0.5と2.0、4.5、10 μm のものは SEM 測定 からビーズの損壊は確認できなかった。また、デクチン1との結合試験により 2.0 と 4.5、10 μm のものは結合が確認され、16糖の担持が行われているものと考えている。今回合成した糖鎖固定 化蛍光微粒子は、先の BioAct gel の糖鎖微粒子(20~40 μm)よりもかなり小さく、貪食細胞に対 する免疫活性化向上の期待ができ、貪食作用そのもののイメージングも期待できる。

5-5 まとめ

4章の結果から、アミノアルキル基を有する16糖および17糖はデクチン1と強い結合を示し たが、デクチン1を介した自然免疫活性化作用は結合に見合うほどの強さを示さなかった。そこで、 多価相互作用を利用した高い自然免疫活性化作用を期待する、糖鎖固定化微粒子の開発を行った。 まず始めに、BioAct gelを固相担体として選択し、糖鎖固定化微粒子の合成を行った。BioAct gel アミノ体をイソチオシアネート体に変換し、糖鎖アミンとのチオウレア化によって糖鎖担持を行っ た。得られた糖鎖固定化微粒子のうち、直鎖16糖および分岐17糖微粒子はデクチン1と直接結 合することが分かり、さらに、免疫活性化することが分かった。しかしながら、天然のβグルカン と比較すると強い相互作用が確認できたとは言い難い。今回用いた BioAct gel は粒径 20~40 µm の微粒子であり、免疫細胞(数um)と比べると非常に大きな微粒子である。そこで、より小さい食 食される可能性のある糖鎖固定化微粒子を合成することにより、より強い自然免疫活性化作用を示 す微粒子の合成を目指した。その際、蛍光微粒子を用いることにより貪食作用そのものをイメージ ングできる微粒子の創製に繋がると期待した。そこで、蛍光微粒子 Fluoresbrite[®] (粒径 0.1、0.5、 2.0、4.5、10 µm)を用いて糖鎖の担持を行った。水溶媒中で反応が行える縮合剤 DMT-MM を用いた、 16糖アミンと微粒子カルボン酸のアミドを形成する結合によって、16糖微粒子の合成を試みた。 微粒子の形状の評価、および、デクチン1との結合評価を行ったところ、2.0 と 4.5、10 µm のも のはビーズの損壊なしに16糖の担持が行われていた。他の0.1および0.5 µmの微粒子に関して も、測定機器の検出限界で糖鎖の担持や形状が確認できなかったが、糖鎖微粒子ができているもの と考えている。これらの微粒子は、デクチン1を介した生物プロセスの過程を解析するための有用 なケミカルプローブになると期待できる。

References

1) a) Kim, S.; Yi, K. Y. Tetrahedron Lett. 1985, 26, 1661-1664.

- b) Kim, S. Organic Preparations and Procedures Inc. 1988, 20, 145-172.
- c) Kilburn, J. P.; Lau, J.; Jones, R. C. F. *Tetrahedron* 2002, *58*, 1739-1743.
- d) Kiburn, J. P.; Lau, J.; Jones, R. C. F. Tetrahedron Lett. 2002, 43, 3309-3311.
- e) Severinsen, R.; Kilburn, J. P.; Lau, J. F. Tetrahedron 2005, 61, 5565-5575.
- f) Mays, J. R.; Roska, R. L. W.; Sarfaraz, S.; Mukhtar, H.; Rajski, S. R. *ChemBioChem* 2008, *9*, 729-747.
- 2) Hodge, J. E.; Hofreiter, B. T. Method in Carbohydrate Chemistry 1962, 1, 338.
- 3) a) Kaminski, Z. J.; Paneth, P.; Rudzinski, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4248-4255.
 - b) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Iwasaki, F.; Terao, K.; Tani, S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5327-5330.

c) Kunishima, M.; Kawachi, C.; Hioki, K.; Terao, K.; Tani, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1551-1558.

Experimental Section

1. Bioactgel

Isocyanide gel (5-6)

To a suspension of the BioActgel (5-5) (118 mg) (0.246 mmol/g) in DMF (1.00 mL) was added DPT (23.2 mg) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was filtered. The gel was washed three times each with DMF (3.00 mL), MeOH (3.00 mL) and acetone (3.00 mL). The resin was dried *in vacuo* to give the isocyanide gel (5-6). A small amount of gel was used to perform a Kaiser test (negative : yellow color).



Synthesis of Saccharide supported gels (5-8, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

General procedure

To a suspension of the <u>isocyanide gel (5-6)</u> in <u>0.1 M aq. NaHCO₃</u> was added <u>amino saccharide</u> at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was filtered. The gel was washed three times each with water (3.00 mL) and acetone (3.00 mL). The gel was dried *in vacuo* to give the <u>saccharide supported gel (5-X)</u>.

General Procedure for phenol-sulfuric acid assay

5.00 mg of sugar-supported gel was dissolved in 0.500 mL of distilled water. To the solution of sugar-supported gel in tube were added 2.50 mL of sulfuric acid and 0.500 mL of 5% (w/v) aq. phenol solution. The mixture was stirred for 5 min, followed by incubation at room temperature for 5 min. Then the absorbance of each solution was read at 490 nm.

Monosaccharide-supported gel (5-8) isocyanide gel (5-6) (10.1 mg) 0.1 M aq. NaHCO₃ (1.00 mL) amino saccharide monogulcose (5-7) (18.0 mg) Monosaccharide-supported gel (5-8) (1.8 mg/g)



Oligosaccharide supported gel (5-15) isocyanide gel (5-6) (22.0 mg) 0.1 M aq. NaHCO₃ (1.00 mL) amino saccharide Oligogulcose (5-9) (16.7 mg) Oligosaccharide supported gel (5-15) (1.1 mg/g)



Oligosaccharide supported gel (5-16) <u>isocyanide gel (5-6)</u> (31.2 mg) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.400 mL) amino saccharide</u> Oligogulcose (5-10) (4.60 mg) <u>Oligosaccharide supported gel (5-16)</u> (2.3 mg/g)



Oligosaccharide supported gel (5-17) <u>isocyanide gel (5-6)</u> (7.5 mg) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (1.00 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-11) (10.1 mg) <u>Oligosaccharide supported gel (5-17) (3.4 mg/g)</u>



Oligosaccharide supported gel (5-18) <u>isocyanide gel (5-6)</u> (34.5 mg) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.600 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-12) (5.70 mg)

Experimental Section

Oligosaccharide supported gel (5-18) (2.5 mg/g)



Oligosaccharide supported gel (5-19) <u>isocyanide gel (5-6)</u> (35.9 mg) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.200 mL) amino saccharide</u> Oligogulcose (5-13) (2.03 mg) Oligosaccharide supported gel (5-19) (3.1 mg/g)



Oligosaccharide supported gel (5-20) isocyanide gel (5-6) (34.2 mg) 0.1 M aq. NaHCO₃ (0.500 mL) amino saccharide Oligogulcose (5-14) (4.90 mg) Oligosaccharide supported gel (5-20) (2.7 mg/g)



2. Fluoresbrite

Synthesis of Saccharide supported gels (5-29, 30, 31, 32, 33)

General procedure

To a suspension of the <u>Fluoresbrite (5-24, 25, 26, 27, 28)</u> in <u>0.1 M aq. NaHCO₃</u> was added <u>amino saccharide (5-11)</u> and <u>DMT-MM</u> at room temperature. After being stirred at same temperature for 24 h, the reaction mixture was added ethanolamine. After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was spined. The gel was washed using centrifugation three times with water (1.00 mL). The gel was resuspended in water to give the **Saccharide supported gels (5-29, 30, 31, 32, 33)**.

Oligosaccharide supported gel (5-29) <u>Fluoresbrite (5-24)</u> (300 μL) (2.6% Solids-Latex) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.333 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-11) (13.1 mg) <u>DMT-MM</u> (46.1 mg) <u>ethanolamine</u> (10.1 μL)



Oligosaccharide supported gel (5-30) <u>Fluoresbrite (5-25)</u> (1.00 mL) (2.56% Solids-Latex) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.333 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-11) (10.0 mg) <u>DMT-MM</u> (46.1 mg) <u>ethanolamine</u> (10.1 μL)



Oligosaccharide supported gel (5-31)

Fluoresbrite (5-26) (300 μ L) (2.62% Solids-Latex) **0.1 M aq. NaHCO₃** (0.333 mL) **amino saccharide** Oligogulcose (**5-11**) (13.1 mg) **DMT-MM** (46.1 mg) **ethanolamine** (10.3 μ L)



Oligosaccharide supported gel (5-32) <u>Fluoresbrite (5-27)</u> (1.00 mL) (2.73% Solids-Latex) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.333 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-11) (10.0 mg) <u>DMT-MM</u> (46.1 mg) <u>ethanolamine</u> (10.1 μL)



Oligosaccharide supported gel (5-33) <u>Fluoresbrite (5-28)</u> (300 μL) (2.67% Solids-Latex) <u>0.1 M aq. NaHCO₃ (0.333 mL)</u> <u>amino saccharide</u> Oligogulcose (5-11) (13.1 mg) <u>DMT-MM</u> (46.1 mg) <u>ethanolamine</u> (10.3 μL)



第6章 結論

本論文は、多糖の有する特異的な免疫調整機能に着目し、βグルカン多糖類縁オリゴ糖鎖誘導体 の合成とその機能評価について述べたものである。その際、繰り返し構造からなる多糖の部分構造 の効率合成法の開発を行なった。さらに、合成した化合物の機能評価を行なうことにより、βグル カン認識タンパク質であるデクチン1のリガンドおよびアゴニストとして働くオリゴ糖誘導体を 見出した。

第1章「序論」では、まず、免疫と糖鎖の関連について概観し、さらに、βグルカンとそのレセ プターであるデクチン1との関連を研究することの有用性を述べた。続いて、機能解明研究におけ る化学合成による糖鎖供給の有用性と近年の糖鎖合成技術の発展について説明した。さらに、βグ ルカンオリゴ糖の合成上の問題点と過去の合成手法について述べた。また、脱保護における問題点 とその解決方法の提案を行なった。さらに、細胞表層糖鎖の生物活性発現におけるクラスター効果 の重要性を挙げ、人工クラスター分子について述べることにより、解決すべき課題を明確にし、本 論文の意義と目的を明らかにした。

第2章「デクチン1の低分子リガンド探索を目的とする糖鎖合成」では、デクチン1に対する低 分子リガンドの発見を期待し、高度に分岐した β グルカン関連オリゴ糖鎖ライブラリーの機能評価 を行なった。まず、本研究室保有の分岐 β グルカン関連オリゴ糖鎖の、SPGのデクチン1への結合 に対する結合阻害作用を検討した(Figure 6-1、6-2)。その結果、TTK9-01、TTK16-01、TTK14-01 が、その順で強くデクチン1と相互作用していることを見出した(Figure 6-2)。



Figure 6-1



Figure 6-2

続いて、生物活性の確認とアノマー位の構造結合相関を明らかにするために、分岐オリゴ糖 TTK9-02、メチルグリコシドTTK18-01と還元体TTK19-01の再合成とその評価を行った(Figure 6-3)。 しかしながら、再合成化合物には生物活性は確認できなかった。そこで、過去の合成手法と同一の 手法で TTK9 を合成した。得られた化合物の再評価を行ったところ、最終精製化合物 TTK9-04 に生 物活性は見られなかった(Figure 6-4)。しかしながら、水素添加反応による脱保護における粗精製 物 TTK9-03 には、阻害作用が確認された。このことより、TTK9 本体ではなく、ごく微量に含まれて いるパラジウムなどの無機物や糖以外の非水溶性化合物が活性に影響を与えているものだと結論 付けた。



第3章「 β (1,3) グルカン糖鎖の合成法の開発」では、 β (1,3) グルカン合成法の開発

とそのデクチン1との結合評価を行なった。まず、デクチン1とリガンドとして働く最大のオリゴ 糖部の大きさは、デクチン1の大きさよりも小さいという仮定のもとに、分子力場計算を用いて得 られたβグルカン糖鎖の構造と X 線結晶構造解析より得られているデクチン1の構造を比較した。 その結果、16糖の糖鎖がデクチン1と同程度の長さを有することを明らかにし、主鎖16糖の糖 鎖を合成標的化合物とした(Figure 6-5)。



Figure 6-5

第一部では、単糖糖供与体を用いる直線的合成法によるβグルカン糖鎖の合成を検討した。本手 法は、反応性が高く合成容易な単糖糖供与体を用いることができるため、反応性が低下している比 較的大きなオリゴ糖鎖に対するグリコシル化においても十分な転嫁率にて行うことができると期 待した。4、6ベンジリデン位に、3位に化学選択的に脱保護可能な保護基を有する単糖糖供与体 を用いて糖鎖合成を検討した。しかしながら、本手法では、6糖保護体合成にて分離困難な副生成 物が現れた(Figure 6-6)。これは2章において得られた2位のベンゾイル基が3位に転位した化合 物だと考えている。この結果より、直線的合成戦略に基づく糖鎖合成は断念し、収束的合成法の開 発を検討した。



Figure 6-6

第二部では、収束的合成法について検討した。オリゴ糖同士のカップリング反応を基軸とする収 束的合成法では、合成の総工程数を低減することができ、また、糖受容体や糖供与体と生成物との 物性が大きく異なることが予想されるため、基質と生成物の分離が容易に可能であることが予想で きる。しかしながら、一般に糖受容体や糖供与体が大きくなった場合には、それぞれのグリコシル 化反応に対する反応性が低下することが知られているため、十分な転嫁率で目的物へと導くために は、適切な分子設計が必要である。そこで、本研究では、まず、高い反応性を有する糖受容体部と して、ジオール型の糖受容体を設計した。2,3および3,4ジオール型の糖受容体に対する位置 選択的なグリコシル化反応を検討したところ、2,3ジオール型が3位選択的グリコシル化反応を 行うための優れた糖受容体として働くことを見出した。そこで、2,3ジオール型糖受容体を用い て16糖の合成を検討したところ、16糖を高収率で得ることに成功した(69%)(Figure 6-7)。 さらに、流通系水素添加反応装置および、固相脱保護法を用いる脱保護を検討した。流通系反応装 置では、6糖程度のオリゴ糖の脱保護は有効であったが、8糖の脱保護を行なうことができなかっ た。一方、固相脱保護は、16糖の脱保護に適応できた。しかしながら、固相への固定化の効率に 問題が残った。得られた単糖から6糖、および、8糖、12糖、16糖のSPGのデクチン1への結 合に対する競合阻害試験を行った。しかしながら、いずれの糖鎖も、SPG とデクチン1の結合を阻 害する結果が得られなかった。本結果から、単分子の糖鎖では結合力が弱く、SPG を用いる競合阻 害試験においては結合を確認出来るほど強くないと考えた。そこで、より強い結合のためには糖鎖 微粒子などの多価効果を期待する複合糖鎖の開発が必要であると結論付けた。



Figure 6-7

第4章「βグルカン関連オリゴ糖鎖の合成法の開発」では、微粒子への固定化を目的としたオリ ゴ糖鎖の設計とその類縁体合成法の開発を行い、その生物評価を行った。合成戦略は、直鎖の4糖 チオ糖 6-2 または、分岐の5糖チオ糖 6-3 順次グリコシル化することにより糖鎖を伸張していくも のである。まず、3章にて問題になった化学選択的グリコシル化に基づく2糖および4糖合成では、 糖供与体としてブロモ糖よりもイミダート糖を用いた場合により高収率で目的とする糖鎖がえら れることを明らかにした(Figure 6-8)。4糖および5糖ブロックを用いる16および17糖合成は 効率的に進行し、目的とする直鎖8糖、12糖、16糖、および、分岐9糖、13糖、17糖を合 成することに成功した(Figure 6-9)。本手法を用いて、16糖保護体約1gの合成を達成した。



Figure 6-8



Figure 6-9

続いて、合成βグルカンオリゴ糖の、SPGとデクチン1との結合に対する競合阻害試験を行った (Figure 6-10)。その結果、直鎖16糖および分岐17糖に強い阻害作用を見出した。デクチン1 のリガンドを開発することができたので、アミノアルキル基を有する直鎖16糖とデクチン1との 結合様式を STD-NMR を用いて解析した(Figure 6-11)。その結果、糖鎖部位でデクチン1と結合し ていることが分かり、特に3位のプロトンと強く相互作用していることが明らかとなった。このこ とから、天然のβグルカンの結合様式を解明する上でも非常に有用なプローブとなることが明ら かになった。さらに、免疫活性化試験を行ったところ、結合作用を示した直鎖16糖と分岐17糖 が、デクチン1を介して免疫活性化することを示した(Figure 6-12)。さらに直鎖16糖は他の受 容体タンパク質 TLR4を介する免疫活性化に影響を与えなかった(Figure 6-13)。以上から、直鎖1 6糖はデクチン1特異的に活性を誘導する可能性を示し、デクチン1を介した生物プロセスの過程 を解析するための有用なケミカルプローブになると期待できる。



Figure 6-12

Figure 6-13

第5章「 β グルカン糖鎖固定化微粒子の開発」では、4章の結果から、アミノアルキル基を有す る16糖および17糖はデクチン1と強い結合を示したが、デクチン1を介した自然免疫活性化作 用は結合に見合うほどの強さを示さなかった。そこで、多価相互作用を利用した高い自然免疫活性 化作用を期待する、糖鎖固定化微粒子の開発を行った。まず始めに、BioAct gel を固相担体として 選択し、糖鎖固定化微粒子の合成を行った。BioAct gel アミノ体をイソチオシアネート体に変換 し、糖鎖アミンとのチオウレア化によって糖鎖担持を行った(Figure 6-14)。得られた糖鎖固定化 微粒子のうち、直鎖16糖および分岐17糖微粒子はデクチン1と直接結合することが分かり、さ らに、免疫活性化することが分かった。しかしながら、天然の β グルカンと比較すると強い相互作 用が確認できたとは言い難い。今回用いた BioAct gel は粒径 20~40 µm の微粒子であり、免疫細 胞(数µm)と比べると非常に大きな微粒子である。そこで、より小さく、貪食される可能性のある 糖鎖固定化微粒子を合成することにより、より強い自然免疫活性化作用を示す微粒子の合成を目指 した。その際、蛍光微粒子を用いることにより貪食作用そのものをイメージングできる微粒子の創 製に繋がると期待した。そこで、蛍光微粒子Fluoresbrite[®](粒径 0.1、0.5、2.0、4.5、10 µm) を用いて糖鎖の担持を行った。水溶媒中で反応が行える縮合剤 DMT-MM を用いた、16糖アミンと 微粒子カルボン酸のアミドを形成する結合によって、16糖微粒子の合成を試みた(Figure 6-15)。 微粒子の形状の評価、および、デクチン1との結合評価を行ったところ、2.0 と 4.5、10 µm のも のはビーズの損壊なしに16糖の担持が行われていた。他の 0.1 および 0.5 µm の微粒子に関して も、測定機器の検出限界で糖鎖の担持や形状が確認できなかったが、糖鎖微粒子ができているもの と考えている。これらの微粒子は、デクチン1を介した生物プロセスの過程を解析するための有用 なケミカルプローブになると期待できる。



Figure 6-14



Figure 6-15

第6章 「結論」では本論文を総括した。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、御鞭撻いただきました高橋孝志教授に深く感謝いたします。 本研究を行うにあたり、御助言、御指導をいただきました東北大学薬学研究科土井隆行教授に心 より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、常に励まし有益な御助言くださいました田中浩士准教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、叱咤激励してくださいました布施新一郎助教に深く感謝いたします。 本研究を行うにあたり、ご指導してくださいました飯島悠介助教に深く感謝いたします。

日常の研究が円滑に行えるよう取りはからって頂きました田能村有香さんに心より感謝いたします。

共同研究として糖鎖のデクチン1に対する結合試験および免疫活性化試験を行なって頂きました、 東京薬科大学の大野尚仁教授、安達禎之准教授に深く感謝いたします。

共同研究として糖鎖のデクチン1に対する結合解析を行なって頂きました、理化学研究所の山口 芳樹博士、花島慎弥博士に深く感謝いたします。

糖鎖微粒子の走査型電子顕微鏡解析を行なって頂きました、東京工業大学の冨田育義准教授に深 く感謝いたします。

最後に、今まで私を支えてくれた家族、友人達に心より感謝いたします。

以上

平成23年5月