

# Accounts of Materials & Surface Research

## Approximately 15% of *N*-glycans of trastuzumab without core fucose play a key role in ADCC activities.

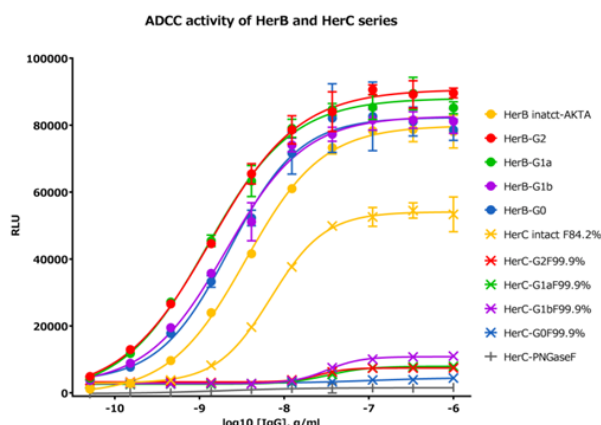
Takashi Shirai

The Noguchi Institute

1-9-7, Kaga, Itabashi, Tokyo, JAPAN

E-mail of corresponding author [shirai.tb@noguchi.or.jp]

To investigate the function of *N*-glycans on trastuzumab, we developed the rearrangement of *N*-glycans on trastuzumab. Trastuzumab is a recombinant anti-Her2 monoclonal antibodies, which recognizes Her2 (human epidermal growth factor receptor 2) molecules on the surface of breast cancer cell and induced ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity). *N*-Glycans of trastuzumab produced by Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are heterogeneous, approximately 85% of the *N*-glycan are core-fucosylated (GlcNAc  $\alpha$ 1-6 Fuc moiety), but remaining 15% are non-core fucosylated. We prepared the glycoengineered anti-Her2 antibodies which has homogeneous glycans and performed their binding assay for Fc $\gamma$ RIII a-V158 and ADCC-reporter gene assay. To remodel We used the hydrolysis and transglycosylation activities of various endo- $\beta$  -*N*-acetyl glucosaminidases( ENGases) to obtain the glycoengineered anti-Her2 antibody which have homogeneous *N*-glycans. We prepared anti-Her2 antibody with core-fucose, such as anti-Her2-(G2F,G2F) antibody, anti-Her2 antibody - (G1aF,G1aF), anti-Her2 antibody -(G1bF,G1bF), anti-Her2 antibody -(G0F,G0F), which named HerC-G2F, Her-C-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G0F from anti-Her2 antibodies (trastuzumab) produced by CHO cells (hereinafter, this is called "HerC"). And also we prepared anti-Her2 antibodies without core-fucose, To such as anti-Her2 antibody-(G2,G2), anti-Her2 antibody-(G1a,G1a), anti-Her2 antibody-(G1b,G1b), anti-Her2 antibody-(G0,G0), which named HerB-G2, HerB-G1a, HerB-G1b, HerB-G0 from anti-Her2 antibody produced in transgenic silkworm (*Bombyx mori*) cocoon (hereinafter, this is called "HerB"). From the ADCC assay, it was shown that HerB series have more higher activities than HerC series with core fucose.



**Keyword:** core-fucose; ADCC activities; trastuzumab ; glycoengineering ; ENGase

Takashi Shirai received his PhD degree from Kyoto University in 1990. He was retired from the Asahi-Kasei Corporation in 2011 and joined the Noguchi Institute as a managing director until 2015. He is currently the advisor of the Noguchi Institute. His research is oriented to glycotecology, such as the synthesis of *N*-glycans and the preparation of the glycoengineered monoclonal antibodies with homogeneous glycan using chemoenzymatic approach.



## 抗体医薬ハーセプチンの制癌活性は15%しか含まれていないコアフコース無しのN型糖鎖を持つ抗体が担っている

白井 孝

公益財団法人野口研究所・研究部

### 1. はじめに

近年、抗体医薬が数多く販売されており、医薬品世界売上ベスト10の中の半分程度を占めている<sup>1)</sup>。抗体医薬は動物細胞、主としてCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)から作られているモノクローナル抗体であり、分子クラスはIgG1抗体がメインである。IgG1抗体は2つの重鎖と2つの軽鎖から構築され、ターゲット細胞(例えば、癌細胞)の細胞表面に発現している特異抗原(例えば、癌抗原)と結合するFab部分と白血球やマクロファージ等の細胞表面に発現しているレセプター(Fc $\gamma$ R)と結合するFc部分を持っている。重鎖のFc部分の297番目のアスパラギン(Asn)にはN型糖鎖が付加しており、この糖鎖が様々な役割を果たす事が知られている。動物細胞で産生される糖タンパク質の糖鎖構造は一義的に構造が決まるのではなく、細胞内の複数の糖鎖転移酵素、糖加水分解酵素の作用等の複数の要因によって、タンパク質の部位特異的に付加される。その為、動物細胞での培養条件に依存して生産される糖タンパク質の糖鎖の不均一性は異なってくる。よって、抗体医薬品のCHO細胞で生産されている抗体はタンパク質の配列は同一である(例えば、Trastuzumabの場合、重鎖が451残基で軽鎖が214残基で構築されている)が、Fcに付加しているN型糖鎖に関しては、不均一であり、分子として混合物である。抗体医薬品は、1980年代頃より、その高いターゲット能と免疫システムを利用した副作用の少ない分子標的治療法として盛んに開発が行われており、現在、初期に開発された医薬品は、特許が切れる物が出て来ている。よって、これらの製品に関しては、他のメーカーからバイオシミラーとし

ての開発が進められているが、先に記述しているように、培養条件や細胞の品質を制御する事が困難な為、糖鎖構造並びに糖鎖分布を全く先発品と同じにする事はできていないのが現状である。最近、抗体の糖鎖構造をエンドグリコシダーゼというエンド酵素を利用して、糖鎖のトリミングと転移反応を行い、均一な糖鎖を持つ抗体の作製手法が開発され、抗体中の糖鎖の機能を調べられている<sup>2-3)</sup>。次に、糖鎖が関与していると言われる抗体の機能であるADCC活性(Antibody-dependent cellular cytotoxicity)について述べる。

抗体医薬のADCC活性とは、癌細胞や病原体の抗原に抗体がFab領域を介して結合した場合、免疫細胞(マクロファージ、NK細胞)表面にあるFc領域受容体(Fc $\gamma$ R)と抗体のFc領域が結合する事によって誘導される癌細胞や病原体の傷害活性の事である。Fc領域受容体には、いくつかの種類があり、中でも、その1種であるFc $\gamma$ RIIIaはN-結合型糖鎖の結合部位が5カ所(N-38,45,74,162,169)あり、そのうちのN-162に結合している糖鎖と抗体のFc領域のN-297に結合している糖鎖が糖鎖-糖鎖相互作用を介してFc $\gamma$ RIIIaと抗体の親和性を構築しており、この親和性がADCC活性に深く関与している<sup>4-5)</sup>。

抗体のN-297に付加しているN結合型糖鎖の還元末端にあるN-アセチルグルコサミンに結合するフコース(コアフコース)が欠落していると、Fc $\gamma$ RIIIaを介するADCC活性が高まる事が知られており、コアフコースがある抗体よりADCC活性が50倍になるとの報告もある<sup>6)</sup>。この知見よりADCC活性の高い、つまり、コアフコースを含有しない抗体医薬が開発され、モガムリズマブ(anti-CCR4 mAb,協和発酵キリ

ン), オビヌツズマブ (anti-CD20 mAb、Roche/Genentech)が販売されている。抗体医薬品の機能には、中和作用、ADCC 活性、CDC 活性の主に3つあるが、ADCC 活性が必要とされる抗体には、リツキシマブ(anti-CD20 mAb)、トラスツズマブ( anti-Her2 mAb)の抗癌剤がある。最近、我々のグループを含むいくつかのグループでそれぞれ、ADCC 活性の高い均一な糖鎖を持つ抗体をエンドグリコシダーゼを用いた糖鎖リモデリング法によって調製し、コアフコースのない均一糖鎖の機能を調べている<sup>2,3), 7), 8)</sup>。現在、市販されている抗体医薬であるリツキシマブの糖鎖は約 95%が、トラスツズマブの糖鎖は約 85%がコアフコース含有糖鎖である。これらの抗体のコアフコース含有糖鎖は、ADCC 活性においてどのくらい影響を及ぼしているだろうか。我々は、ほぼ100%のコアフコース含有均一糖鎖を持つモノクローナル抗体を作製し、その ADCC 活性を調べた。まず始めに、市販のトラスツズマブの糖鎖構造を調べた。抗体の糖鎖構造の解析は、抗体をトリプシン消化し、得られたペプチド断片を我々が開発した MALDI-TOF-MS 用の糖ペプチドの高感度標識試薬で標識 (benzoyl 標識) し<sup>9)</sup>、その後、HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography: 親水性相互作用クロマトグラフィー) を利用して、混合物より糖ペプチドを抽出し、MALDI-TOF-MS 測定を行った。その結果、CHO 細胞から産生したトラスツズマブ(HerC)は、G0F>G1aF or G1bF>G2F>G1a or G1b>G0>GN1F>G2>M5>G1GN1F>GN1の順に糖鎖の含有量を持っている不均一な物である事が分かった。従って、HerC を原料にエンドグリコシダーゼを用いた糖鎖リモデリングを行った場合、コアフコースを含む糖鎖と含まない糖鎖が生成し、糖鎖改変抗体としては、混合物になってしまう事が分かった。そこで、我々はエンドグリコシダーゼの基質特異性を利用して、抗体上のコアフコース含有糖鎖とコアフコースを含まない糖鎖を区別して、糖鎖の均一な糖鎖改変抗体の作製を考えた。

## 2. 実験及び結果

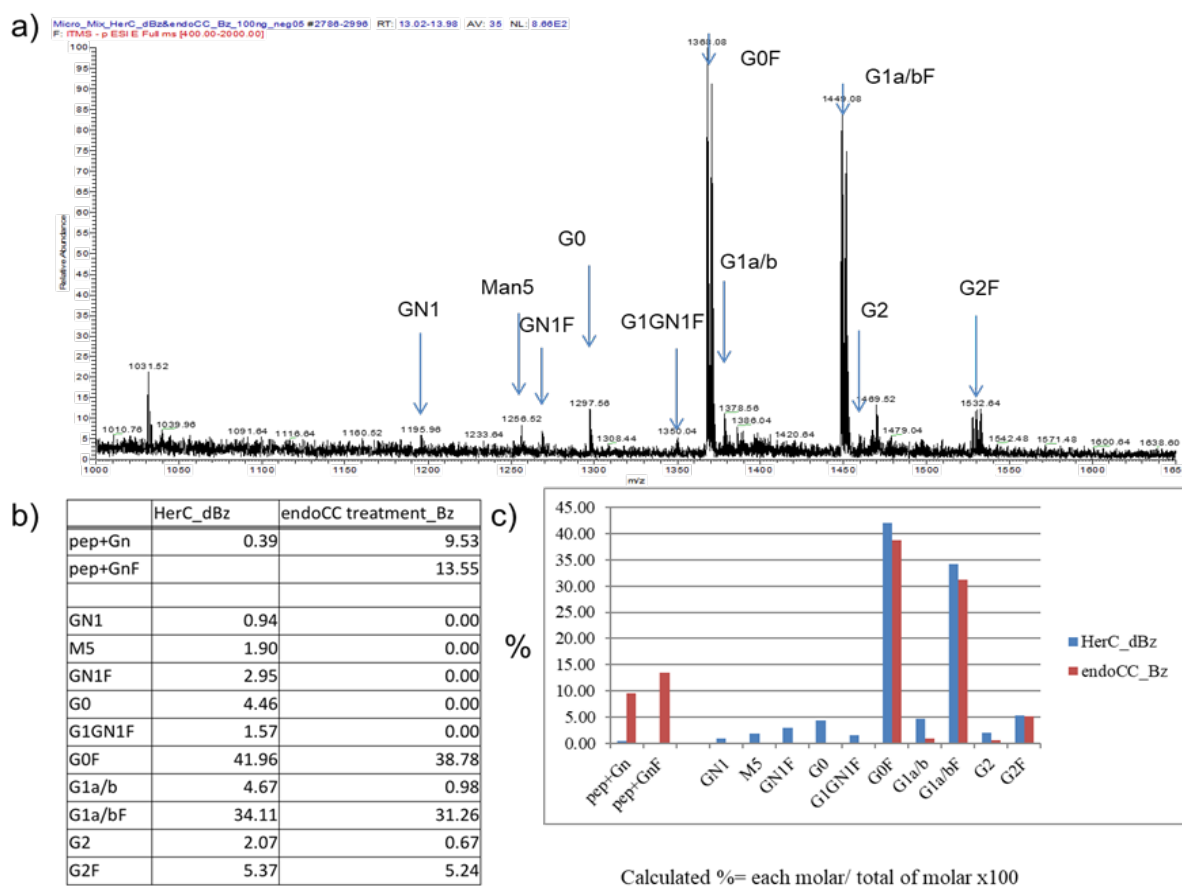
### 1. HerC の糖鎖解析並びに Endo-CC の基質特異性の解析

始めに、九州大の竹川先生が発見した Coprinopsis cinerea 由来 Endo-CC<sup>10)</sup>を利用して、HerC 上のコアフコース含有糖鎖と含まない糖鎖を区別して切断できるかどうかの検討を行った。このエンドグリコシダーゼの糖鎖切断の比較を行う為に先に記述した糖ペプチドの安定同位体標識試薬を用いた。今回は、エンド酵素によって、切断されたペプチド部分 (pep+Gn, pep+GnF)も解析する為に、前述した HILIC による抽出操作を行わないで、LC-MS 装置で解析を行った。10種類の糖ペプチドと2種類のペプチド鎖を定量的に分析する為に酵素処理していない抗体から調製した dBz 標識(重同位体標識)糖ペプチド混合物と Endo-CC 処理した HerC から調製した Bz 標識(軽同位体標識)糖ペプチド混合物を 1:1 で混ぜ合わせて、LC-MS 装置を用いて分析した。

Fig.1 から HerC の糖鎖は、G0F が42%、G1aF もしくは G1bF が34%、G2F が5.4%、G1a もしくは G1b が4.7%、G0 が4.5%、GN1F が3.0%、G2が2.1%、M5が1.9%、G1GN1Fが1.6%、GN1が0.9%であった。また、Endo-CC 処理した HerC の定量的な糖鎖解析から GN1, M5, GN1F, G0, G1GN1F のすべての糖鎖量、またコアフコースのない G1a もしくは G1b, G2 の一部の糖鎖量が減少している事を確認できた。これによって、Endo-CC の酵素が HerC 上のコアフコースのない糖鎖を優先的に切断する事が分かり、この酵素の基質特異性を利用する事によって、前述した HerC を原料とした時の糖鎖リモデリングにおける混合物が生成する問題点を解決する手段として考えた。

### 2. コアフコース含有糖鎖改変 HerC の調製

Fig.2 のフローに従って、市販トラスツズマブ (HerC)を、そのキトビオース部分の GlcNAc  $\beta$ 1-4GlcNAcの  $\beta$ 1-4を切断するエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)



**Figure 1.** a:ESI-MS spectra of an equimolar mixture of Bz- glycopeptide(trastuzumab) after Endo-CC treatment and d-Bz-labelled glycopeptide(trastuzumab)  
 b:Glycan analysis of trastuzumab and Endo-CC treated trastuzumab.  
 c:Hitogram of glycans analysis of trastuzumab and Endo-CC treated trastuzumab

を用いて抗体のFc領域のN-297に付加している糖鎖を切断し、GlcNAc(±α1-6Fuc)が付加した抗体を糖鎖改変抗体の糖鎖リモデリング法のアクセプターとして調製した。糖鎖を切断する際に用いた酵素は、抗体の糖鎖を特異的に切断できる *Streptococcus pyogenes* 由来の Endo-S 酵素<sup>11)</sup> 及び基質特異性の高い *Streptococcus pneumoniae* 由来 Endo-D 酵素<sup>12)</sup> を同時に使用した。

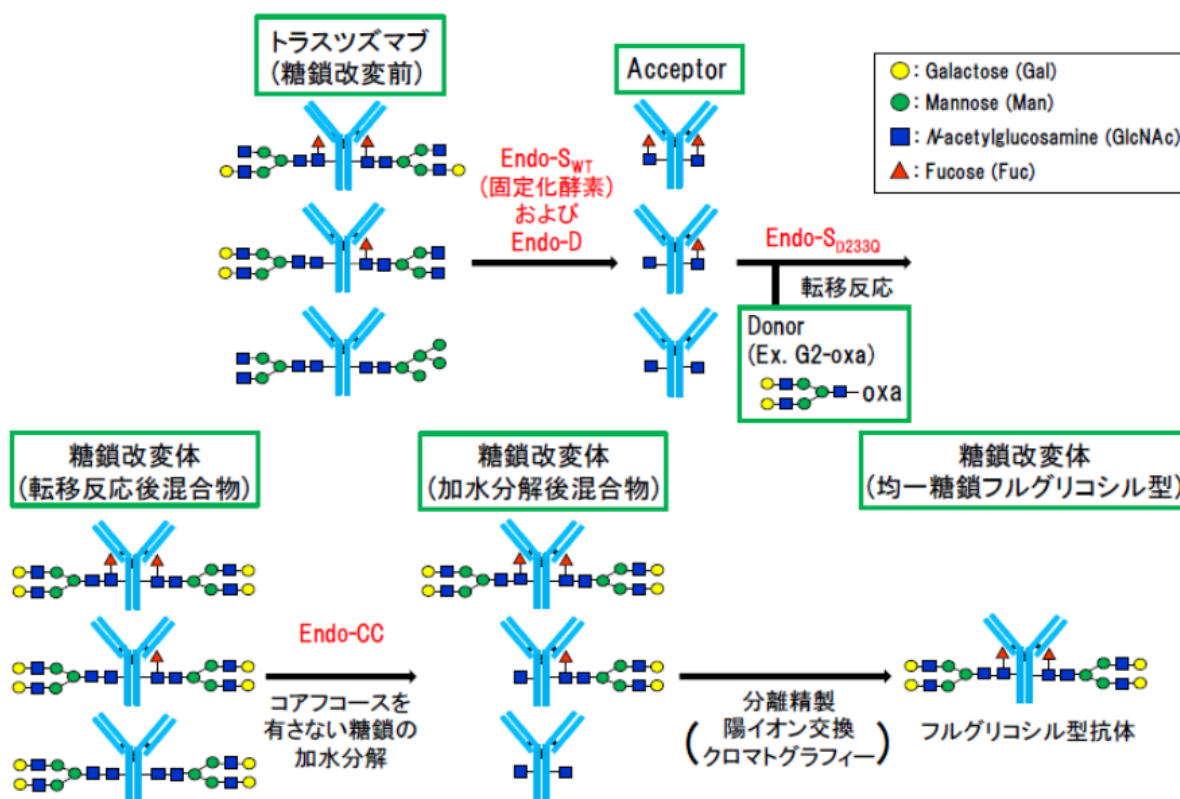
糖鎖改変抗体の糖鎖リモデリング法のドナーの調製は卵黄から抽出されるシアリル糖ペプチド(SGP)(伏見製薬所から提供)を原料として用いた。SGPの末端のシアリル酸は塩酸にて加水分解し、さらに Endo-S で切断する事により、G2-OH を取得した。G1a, G1b はそれぞれ one pot で取得する為に、SGP の2つのシアリル酸を部分分解する事で A1(1, 6)P, A1(1,

3)P を取得し、それぞれ one pot で β-galactosidase, Neuraminidase, Endo-S で反応する事により、A1(1, 6)P からは G1a-OH が A1(1, 3)P からは G1b-OH が取得できた。G0-OH は G2-OH を β-galactosidase で処理する事により、取得した (Fig.3)。

こうしてSGPから調製したドナーは正田らの方法<sup>13)</sup>でオキサゾリン体とし、Wangらの方法<sup>2)</sup>で Endo-S(D233Q) を用いて HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F を調製した。前述したように、上記のコアフコース含有糖鎖改変トラスツズマブの調製は、HerC由来のコアフコースを含有しない糖鎖が15%程度含まれており、コアフコース有無の糖鎖の混合物となっている。

ENGaseの基質特異性の特徴を生かして、





**Figure 2.** Protocol of chemoenzymatic synthesis of fully core-fucosylated HerC (G2F, G2F) using ENG'ase (Endo-S, Endo-D), Glycosynthase (Endo-S (D233Q)) and ENG'ase (Endo-CC)

コアフコースを含有しない糖鎖を優先的に加水分解してコアフコース含有糖鎖は加水分解しない酵素を選択して、上記で調製した HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F 中に含まれるコアフコース無しの糖鎖を選択的に切断すれば、たとえば、HerC-(G2F, G2) は HerC-(G2F, GlcNAc) のヘミ体、あるいは HerC-(G2, G2) は HerC-(GlcNAc, GlcNAc) となり、報告され<sup>14, 15)</sup>ている陽イオン交換クロマトグラフィー分析によって、アグリコン型、ヘミグリコシル型、フルグリコシル型を分離する事が出来る (Fig.4)。

Fig.4は市販のトラスツズマブを上記のクロマトグラフィー分析したものである。陽イオン交換クロマトグラフィーは AKTA FPLC システム (GE healthcare 社) において、Mono S カラムを用いて実施した。

上記の操作で得られた糖鎖改変抗体のグリコシル化率 (糖転移率) とフコシル化率は、前述した安定同位体標識を用いた LC-MS 装置

での糖ペプチドの定量的解析で行った。たとえば、AKTA 精製後の HerC-G1aF から調製した糖ペプチド混合物を Bz 標識 (軽安定同位体) し、一方精製前の HerC-G1aF から調製した糖ペプチド混合物を dBz 標識 (重安定同位体) して、1対1で混合し、LC-ESI-MS 装置で定量的に糖ペプチドとペプチド鎖を解析した。その結果 (Fig.5)、AKTA 精製後の HerC-G1aF のグリコシル化率100%、フコシル化100%となり、均一な糖鎖改変抗体が取得出来ている事を確認した。同様の解析を他のコアフコース含有糖鎖改変 HerC でも行った。グリコシル化率、フコシル化率いずれもほぼ100%になった。

### 3. コアフコース不含糖鎖改変 HerB の調製

コアフコース不含の糖鎖改変トラスツズマブのアクセプター調製は遺伝子組み換えカイコから産生したトラスツズマブ (HerB) を原料として用いた<sup>7)</sup>。遺伝子組み換えカイコの絹糸腺か

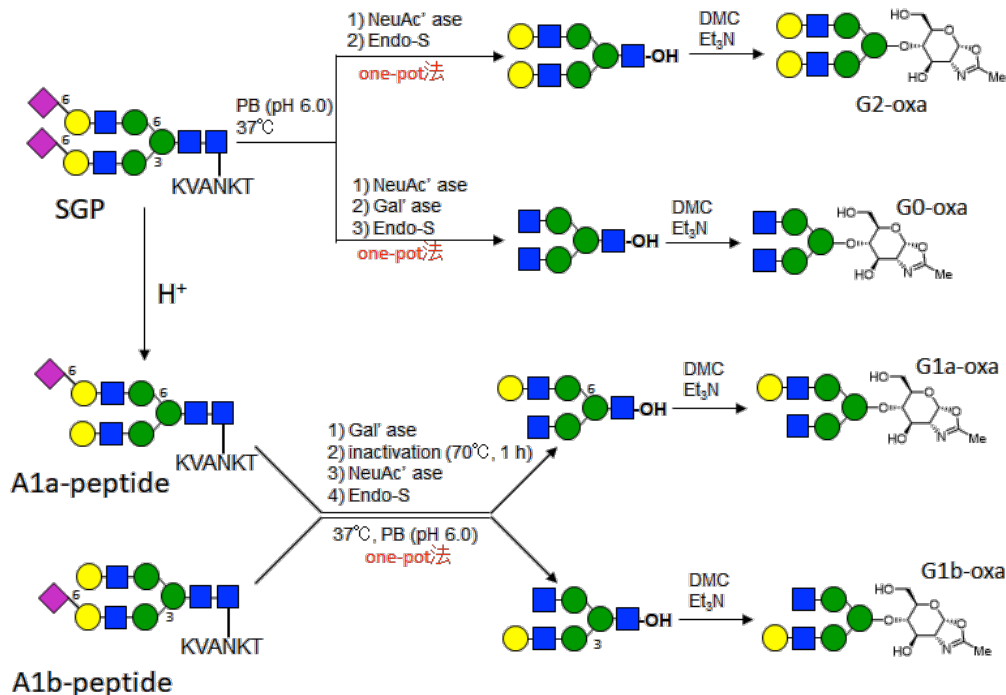


Figure 3. Preparation of donor oxazoline derivatives by one pot reaction from SGP

ら調製された HerB の糖鎖はハイマンノース型、パウチマンノース型、複合型の3つのタイプが存在している。HerB の糖鎖を切断するのに使用した ENGase は、前述の Endo-S, Endo-D と、我々が Lactococcus lactice からクローニングした Endo-LL を加えた3つの Endo 酵素を同時に用いた。糖鎖改変抗体の糖鎖リモデリング法のドナーの調製は上記と同じく、Endo-S(D233Q)でHerBから調製したアクセプターに対して、糖鎖を転移させ HerB-G0, HerB-G1a, HerB-G1b, HerB-G2 を調製し、同様に陽イオン交換クロマトグラフィー分析によって、アグリコン型、ヘミグリコシル型、フルグリコシル型を分離した<sup>7)</sup>。

4.調製したコアフコース含有均一糖鎖構造を持つ HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F とコアフコース不含均一糖鎖構造を持つ HerB-G0, HerB-G1a, HerB-G1b, HerB-G2 の Fc  $\gamma$  R IIIa との親和性

ー 1. ELISA での測定

上記のコアフコース含有均一糖鎖構造を持つ各種トラスツズマブと市販トラスツズマブ (HerC) の Fc  $\gamma$  R IIIa-V158 に対する ELISA 測定を行った (Fig. 6)

その結果、コアフコース含有均一糖鎖構造を持つトラスツズマブはいずれも Fc  $\gamma$  R IIIa-V158 に対する結合能は欠如していた。

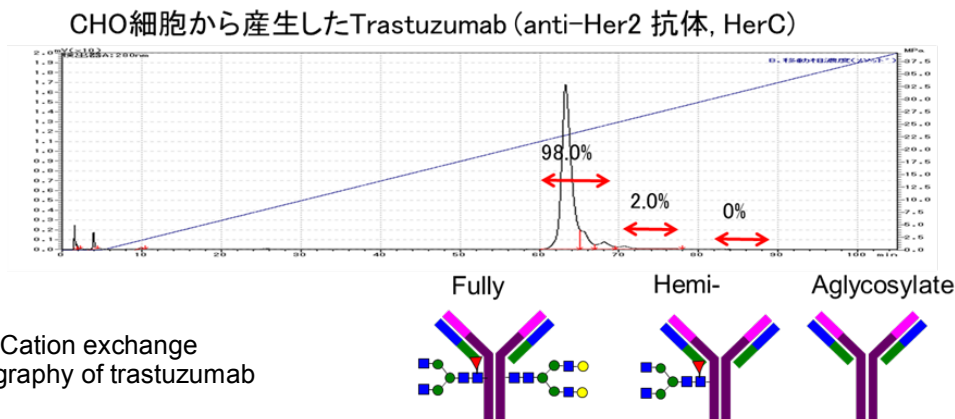
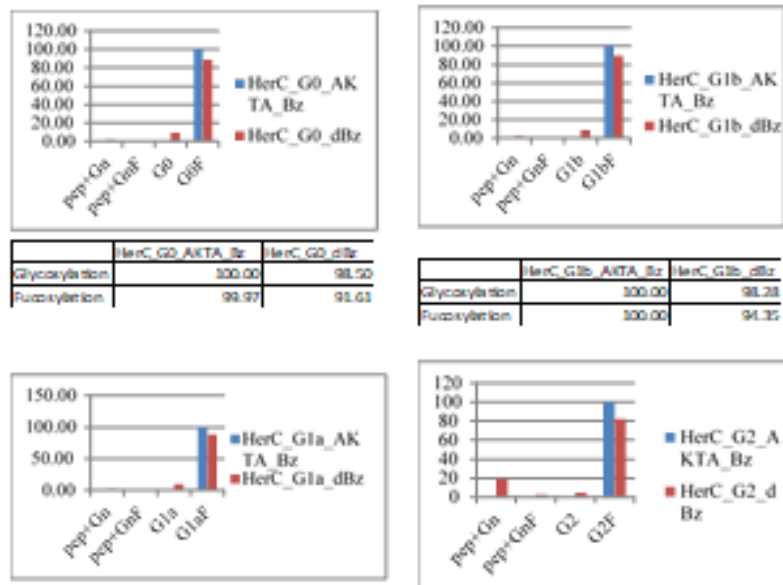


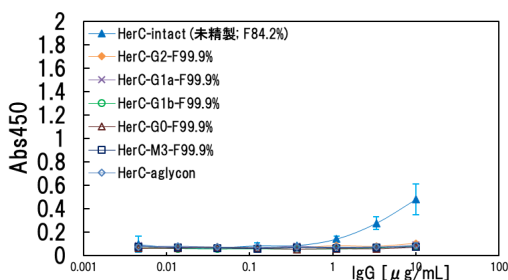
Figure 4. Cation exchange chromatography of trastuzumab



**Figure 5.** Histogram of before purifying HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F and after purification of HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F

ー2. SPR による測定

Biacore X100(GE healthcare 社製)を用いて、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) 法により、FcγRIIIa-V158 と糖鎖改変トラスツズマブの親和性を測定した (Table 1)。コアフコース含有均一糖鎖構造を持つ HerC はコアフコース不含均一糖鎖構造を持つ各種 HerB に対し、平衡状態での解離定数が 1 桁大きく、相互作用が弱い事が確認された。



**Figure 6** Binding activity for FcγRIIIa of the fully core-fucosylated glycoengineered

5.ADCC リポーターアッセイ

Promega 社製の ADCC reporter Bioassay キット<sup>16)</sup>を用いてADCC活性を測定した。ターゲット細胞はHER2高発現株であるヒト乳癌細胞SK-BR-3細胞、エフェクター細胞は遺

伝子組み換えJurkat細胞を用いた。このJurkat細胞は FcγRIIIa-V158 を安定的に発現し、ルシフェラーゼの発現を司るNFAT(Nuclear factor of activated T cells)応答配列を安定に保持するものである。前述の糖鎖改変トラスツズマブと、コントロールとして、市販品トラスツズマブ(HerC)を測定した (Fig.7)。

**Table 1.** Dissociation constant of core-fucosylated trastuzumabs

平衡時の各種HerCの解離定数K <sub>D</sub>		
抗体		解離定数K <sub>D</sub> steady [M]
HerC-intact-F	84.2%	(2.90 ± 0.49) x 10 <sup>-7</sup>
HerC-G2F	99%以上	(5.36 ± 0.29) x 10 <sup>-7</sup>
HerC-G1aF	99%以上	(6.37 ± 0.17) x 10 <sup>-7</sup>
HerC-G1bF	99%以上	(3.69 ± 0.18) x 10 <sup>-7</sup>
HerC-G0F	99%以上	(3.83 ± 0.09) x 10 <sup>-7</sup>

コアフコース不含の均一糖鎖構造を持つ HerB-G0, HerB-G1a, HerB-G1b, HerB-G2 はいずれも HerC より、はるかに強い活性を示すが、コアフコース含有均一糖鎖構造を持つ HerC-G0F, HerC-G1aF, HerC-G1bF, HerC-G2F はほとんどADCC活性を示さなかった。Fig. 7からコアフコース不含の糖鎖構

造を持つ HerC をできるだけ除外した純度の高いコアフコース含有糖鎖を持つトラスツズマブを調製できた事により、コアフコースの有無だけで劇的に ADCC 活性が変化する事が初めて判明した。

### 3. まとめ

ADCC活性を上昇させる為に、コアフコース不含の均一糖鎖を持つ抗体を作成し、糖鎖と活性がどのように働いているか、リツキシマブ、トラスツズマブの抗体医薬品を中心に研究が進められている。現在、製剤として市販されている抗体医薬品は、一般的な動物細胞を使用して作製している為、抗体のN結合型糖鎖は、不均一であり、85%から95%の糖鎖にはコアフコースが含まれている。コアフコース含有糖鎖の機能、すなわち、これらコアフコース含有糖鎖を持つ抗体のADCC活性を調べる為、我々はコアフコース含有均一糖鎖を持つトラスツズマブを作成した。市販製剤トラスツズ

マブ(HerC)の糖鎖構造は、含有量が多い順にG0F, G1aF, G1bF, G2Fであり、その比較対象としてのコアフコース不含のG0, G1a, G1b, G2の計8種の均一糖鎖構造を持つ糖鎖改変トラスツズマブを作成した。ポイントは、コアフコース不含の糖鎖を持つ抗体と比較してコアフコース含有糖鎖を持つ抗体のADCC活性は1/50であるという報告もある為、今回作製するコアフコース含有均一糖鎖を持つトラスツズマブは、混合物としてのコアフコース不含均一糖鎖の含有量をできるだけ、少なくとも1%以下にした抗体の調製が必要であった。

我々は市販トラスツズマブ(HerC)を原料として用いて、糖鎖リモデリング法でコアフコース含有均一糖鎖を持つトラスツズマブを作成した。ただ、こうして作成したコアフコース含有均一糖鎖を持つトラスツズマブには元々含まれているコアフコース不含の均一糖鎖を持つトラスツズマブも15%程度含まれている。これらのコアフコース不含の糖鎖のみを加水分解

コアフコースを含まない均一糖鎖トラスツズマブとコアフコースを含む均一糖鎖トラスツズマブのADCC活性

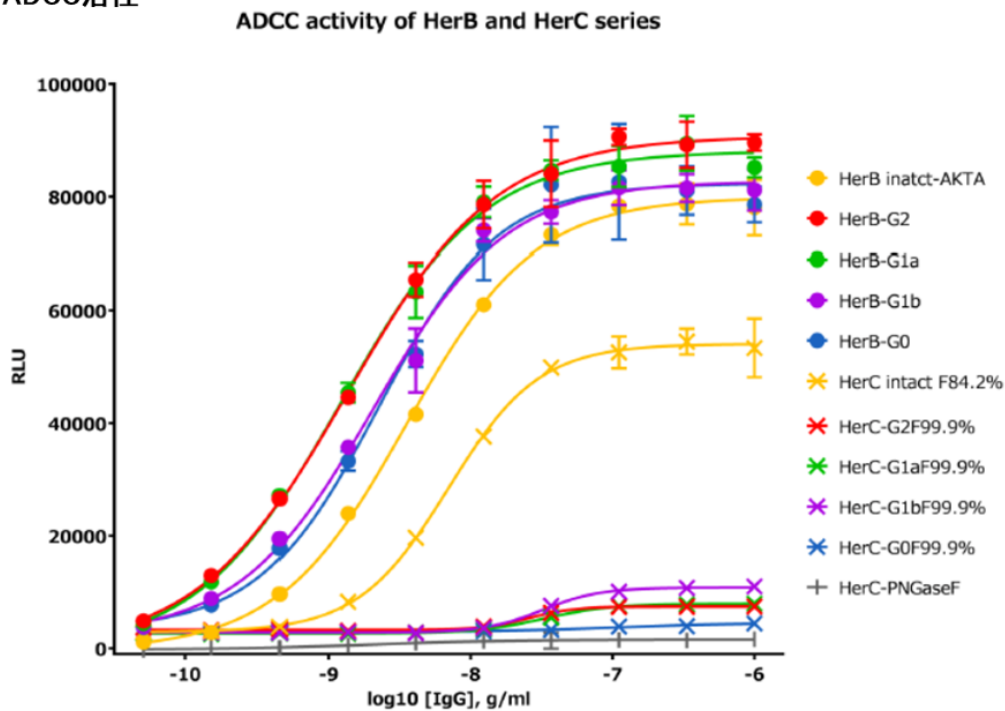


Figure 7 ADCC activities of homogeneous core-fucosylated trastuzumabs and of homogeneous core-afucosylated trastuzumabs



する ENGase、ここでは Endo-CC を用いて、fully-glycosylated 体から hemi-glycosylated 体、aglycosylated 体として、陽イオン交換カラムにて、コアフコース含有 fully-glycosylated 体のみを分取した。

作製した糖鎖改変抗体の糖鎖定量分析は、我々が開発した安定同位体標識を用いる糖ペプチドの LC-ESI-MS 解析によって行い、糖ペプチドのみならず糖が切断されたペプチド鎖も定量的に解析する事によって少なくとも99%以上のグリコシル化率並びにフコシル化率を持つコアフコース含有均一糖鎖を持つ糖鎖改変抗体を調製できた事を確認した。

コアフコース含有均一糖鎖を持つトラスツズマブは Fc $\gamma$ R IIIa-V158 に対する ELISA 測定では結合を全く示さず、SPR では平衡状態での解離定数がコアフコース不含均一糖鎖トラスツズマブに対し、1桁大きい事が確認された。

ADCC 活性は Fig. 7 からコアフコースの有無で劇的に変化、つまり、コアフコースの存在によって、ADCC 活性がほとんど失われる事が判明した。これらの結果から、現在、市販されているトラスツズマブでは15%、リツキシマブでは5%程度しか含まれていないコアフコース不含糖鎖構造を持つ抗体が ADCC 活性の機能を担っている事が示唆された。今後、これらのバイオシミラー開発あるいはこれら市販されているトラスツズマブ、リツキシマブにおいてもコアフコースの含量の定量的管理が非常に重要になってくる。

#### 4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をいただいた公益財団法人野口研究所稲田勉前理事長、松田昭生常務理事及び実際に実験に携わっていただいた研究員の皆様方、また、カイコでのトラスツズマブ作成に関して免疫生物研究所富田正浩博士、新規 ENGase をご提供いただきました、九州大学竹川薫教授に感謝致します。

#### 参考文献

- 1) 永江研太郎, 新ファルマ・フューチャー 2016年6-7月号 ランキング特集特別号 2016
- 2) W. Huang, J. Giddens, SQ.Fan, C.Toonstra, LX. Wang, *J Am Chem Soc.* **2012**, *134*, 12308–12318.
- 3) JJ. Goodfellow, K. Baruah, Yamamoto, C. Bonomelli, B. Krishna, DJ, Harvey, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8030–8033.
- 4) C. Ferrara, S. Grau, C. Jäger, P. Sondermann, P. Brünker, I. Waldhauer, M. Hennig, A. Ruf, AC. Rufer, M. Stihle, P. Umaña, J. Benz, *Proc Natl Acad Sci. USA*, **2011**, *108*, 12669-12674.
- 5) T. Mizushima, H.Yagi, E. Takemoto, M. Shibata-Koyama, Y. Isoda, S. Iida, K. Masuda, M. Satoh, K. Kato, *Genes Cells.* **2011**, *16*, 1071-1080.
- 6) T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, et al. *J Biol Chem.* **2003**, *278*, 3466-3473
- 7) M. Kurogochi, M. Mori, K. Osumi, M. Tojino, S. Sugawara, S. Takashima, Y. Hirose, W. Tsukimura, M. Mizuno, J. Amano, A. Matsuda, M. Tomita, A. Takayanagi, S. Shoda, T. Shirai *PLOS ONE* **2015**, *10*(7)e0132848
- 8) C. Lin, M. Tsai, S. Li, T. Tsai, K. Chu, Y. Liu, M. Lai, C. Wu, Y. Tseng, S. Shivatare, C. Wang, P. Chao, S. Wang, H. Shih, Y. Zeng, T. You, J. Liao, Y. Tu, Y. Lin, H. Chuang, C. Chen, C. Tsai, C. Huang, N. Lin, C. Ma, C. Wu, C. Wong. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **2015**, *112*, 10611-10616.
- 9) M. Kurogochi, J. Amano, *Molecules* **2014**, *19*, 9944–9961.
- 10) Y. Eshima, Y. Higuchi, T. Kinoshita, S. Nakakita, K. Kitagawa, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0132859
- 11) M. Collin, A. Olsen, *EMBO J*, **2001**, *20*,

3056-3055

- 12) T. Muramatsu, *J Biol Chem*, **1971**, *246*, 5535-5537
- 13) M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, *J Org Chem*, **2009**, *74*, 2210–2212.
- 14) S. Wang, R. Ionescu, N. Peekhaus, JY. Leung, S. Ha, J. Vlasak, *J Chromatogr A*, **2010**, *1217*, 6496-6502.
- 15) S. Ha, Y. Ou, J. Vlasak, Y. Li, S. Wang, K. Vo, Y. Du, A. Mach, Y. Fang, N. Zhang, *Glycobiology*, **2011**, *21*, 1087-1096.
- 16) BS. Parekh, E. Berger, S. Sibley, S. Cahya, L. Xiao, MA. LaCerte, P. Vaillancourt, S. Wooden, D. Gately, *MAbs*, **2012**, *4*, 310-318.