Rapid Synthesis of Oligosaccharides Based on One-Pot Glycosylation

ワンポットグリコシル化反応を基盤とする糖鎖迅速合成法の開発

Tanaka, Hiroshi; Yamada, Haruo; and Takahashi, Takashi

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1
Ookayama, Meguro, Tokyo 152-8552, Japan
FAX: +81-3-5734-2884, E-mail: thiroshi@apc.titech.ac.jp

Key Words: *combinatorial chemistry, labo automation, parallel synthesis, glycosylation*

Abstract

In this study, biologically active oligosaccharides were synthesized based on one-pot glycosylation. One-pot glycosylation enables direct coupling of multi-saccharide building blocks via sequential chemo- and regio-selective glycosylations in a single vessel. A di-branched heptasaccharide was synthesized by one-pot glycosylation using seven independent building blocks. The glycosyl amino acids containing sialic acids were covered by the one-pot glycosylation, in which sialylation was achieved with *N*-Troc-protected thiosialoside. Combinatorial oligosaccharide libraries were synthesized by one-pot glycosylation using parallel and automated synthesizers. This study also developed a polymer-assisted strategy for deprotection of protected oligosaccharides.

要 約

本総説では、当研究室にて、研究してきたワンポットグリコシル化反応を利用した生物活性糖鎖の合成研究について述べる。ワンポットグリコシル化反応は、連続的な化学および、位置選択的なグリコシル化反応を同一反応容器内で行なうことにより、多種類の糖鎖合成ユニットより、オリゴ糖を一挙に合成する手法である。本手法を利用することにより、7つの独立な糖鎖ユニット利用した分岐7糖のワンポット合成が可能である。また、シアル酸を含む糖アミノ酸の合成も可能である。シアル酸含有糖鎖の合成では、シアル酸の5位のアセトアミド基を *N*-Troc 基で置換したシアル酸糖供与体を利用した。また、ワンポットグリコシル化反応と並列液相自動合成装置を利用することにより、糖鎖のコンビナトリアルライブラリーの自動合成を達成した。さらに、得られた保護糖鎖の効率的な脱保護法として、固相脱保護法についても合わせて報告する。

A. Introduction

Oligosaccharides play important roles in cell surface events via carbohydrate-protein and carbohydrate-carbohydrate interactions (1). The ability to chemically synthesize structurally defined oligosaccharides for structure-function studies is highly advantageous because oligosaccharides from natural sources are available only in limited quantities. Recent progress in oligosaccharide synthesis has resulted in a number of new and efficient glycosidation methodologies (2). However, oligosaccharide syntheses involving glycosylation and deprotection are difficult to achieve using standard protocols and require well-trained organic chemists. Seeberger and co-workers reported an automated solid-phase oligosaccharide synthesis using a modified solid-phase peptide synthesizer (3). Alternatively, one-pot sequential glycosylation for the synthesis of oligosaccharides was demonstrated by Kahne and co-workers in 1993. In this method an α -linked deoxytrisaccharide was prepared by sequential chemo-selective activation of glycosyl sulfoxide and thioglycoside using a single activator (4). One-pot glycosylation enables coupling of multiple building blocks in a single vessel to yield oligosaccharides; *the reaction protocols are simple, involving*

はじめに

糖鎖は、糖鎖-タンパク質や、糖鎖-糖鎖相互作用を介して、様々な細胞表層の生物学的イベントにおいて重要な役割を果たしている(1)。糖鎖は単離精製が困難で、かつ、分離困難な不純物が含まれている場合が多いため、それらの構造活性相関の研究では、化学合成によって得られた純粋なオリゴ糖を利用することが望まれている。近年の糖鎖合成法の格段の進歩により、様々な新しくかつ効率良いグリコシル化方法が開発されている(2)。しかし、グリコシル化反応および、脱保護を含む糖鎖合成を画一化された操作で行なうことは難しく、多くの場合、よく熟練した糖鎖合成化学者のを必要とする。近年、Seebergerらによって、ペプチド合成装置を改良した合成装置を利用することにより、糖鎖の固相合成が可能であることが示されている(3)。一方、1993年にKahneらによって、ワンポットグリコシル化反応によるデオキシ3糖の効率的合成が報告された。本手法では、スルホキシド糖とチオ糖の一つ活性化剤による連続的な活性化により3糖のワンポット合成を行なっている(4)。ワンポットグリコシル化反応は、試薬および、基質の連続的な導入という簡単な操作で、複数の糖鎖ユニットを結合させ、一つの反応容器内でオリゴ糖の合成を可能にする。我々は、本手法が、通常の糖鎖に応用できるのであれば、糖鎖の合成法として非常に有用な方法になる

sequential addition of reagents and substrates. Adaptation of the method to the synthesis of conventional oligosaccharides would be an effective and attractive way of producing various oligosaccharides. In this study, biologically important oligosaccharides were synthesized using one-pot glycosylation and a polymer-assisted strategy for deprotection of protected oligosaccharides was developed.

B. One-Pot Glycosylation

Scheme 1 shows two basic types of one-pot sequential glycosylation. The first is linear one-pot glycosylation, involving chemo-selective glycosylation that yields linear oligosaccharides. The second is branched one-pot glycosylation which involves regio-selective glycosylation to yield branched oligosaccharides. Ley and co-workers reported a one-pot glycosylation using multiple glycosyl donors whose reactivity was controlled by protecting group selection (5). Wong and co-workers developed the Optimizer method: sequential activation of reactivity-tuned thioglycosides (6). However, protecting groups on saccharide units greatly influence stereo-selectivity, as well as reactivity, during glycosidation reactions. In contrast, chemo-selective activation of glycosyl donors with different leaving groups (7, 8, 9) was the approach used in the present study. Reactivity of saccharide units toward glycosidation was tuned using appropriate activators. This method may be amenable to various types of chemo- and stereo-selective glycosylation and may be effective in the synthesis of oligosaccharide libraries.

Scheme 2 shows a one-pot synthesis of branched and linear trisaccharides, using glycosyl bromides, thioglycosides and 2-bromoethyl glycosides (10). Glycosylation of the thioglycoside 2 with the glycosyl bromide 1 by AgOTf, followed by activation of the remaining glycosylated thioglycoside 4 with NIS/TfOH in the presence of acceptor

と期待した。本論文では、ワンポットグリコシル化反応を利用した生物活性糖鎖の合成と固相法を利用した保護糖鎖の簡便脱保護法について述べる。

B. ワンポットグリコシル化反応

スキーム 1 にワンポットグリコシル化反応の 2 つの基本反応を示す。一つは、化学選択的グリコシル化反応を含む直鎖型ワンポットグリコシル化反応である。もう一つは、位置選択的なグリコシル化反応を含む分岐型のグリコシル化反応である。Ley らは、反応性を保護基により調整した糖供与体を利用する化学選択的グリコシル化によるワンポットグリコシル化反応を報告している (5)。また、Wong らは、反応性を制御したチオ糖の連続的活性化を基盤とした Opitimer 法を報告している (6)。しかしながら、糖鎖の保護基は、糖鎖の反応性だけでなく、グリコシル化反応の立体選択性にも大きく影響する。一方、我々は、異なる脱離基を有する糖供与体に対して適切な活性化剤を選択することにより、その反応性を制御した化学選択的グリコシル化反応によるワンポットグリコシル化反応に着目した (7, 8, 9)。脱離基と活性化剤の組み合わせによる連続的なグリコシル化は、様々なタイプの化学及び立体選択的なグリコシル化反応を可能にし、糖鎖ライブラリー合成に有用であると考えた (スキーム 1)。

スキーム 2 に、プロモ糖、チオ糖および、2 - プロモエチルグリコシドを用いる分岐型および、直鎖型ワンポットグリコシル化を示す (10)。反応操作を以下に示す。直鎖型ワンポットグリコシル化反応では、銀トリフレートを用いてプロモ糖 1 を活性化しチオ糖 2 にグリコシル化することにより、グリコシル化されたチオ糖 4 を合成する。続いて NIS/TfOH を用いて、

Linear type one-pot glycosylation

Branched type one-pot glycosylation

Scheme 1. Two types of one-pot glycosylation: linear and branched.

Scheme 2. Synthesis of trisaccharide using a linear and a branched one-pot glycosylation.

3 provided the linear trisaccharide **5**. Regio-selective glycosylation of the primary alcohol at the 6 position of the 3,6 dihydroxyl glycosyl acceptor **8** with the glycosyl bromide **6**, followed by subsequent glycosylation of the remaining secondary alcohol of **9** with thioglycoside provided the branched trisaccharide **10**. This method allowed for the use of various combinations of glycosyl bromides and thioglycosides and 2-bromoethyl glycosides prepared from glucose, galactose and mannose in the synthesis of oligosaccharide libraries. However, α 3,6 dihydroxyl galactoside unit was not suitable for this approach due to the small difference in reactivity toward glycosylation between hydroxyl groups at the 3 and 6 positions. A parallel synthetic apparatus (Quest 210) was effective for the synthesis of an oligosaccharide library. The oligosaccharide library subsequently was used in the synthesis of glycol-conjugated, 9-member, DNA-cleaving molecules (11, 12, 13).

C. Applications of One-Pot Glycosylation to the Synthesis of bBiologically Active Oligosaccharides

C-1. One-Pot Synthesis of Branched Oligosaccharides Possessing a Phytoalexin-Elicitor Activity in Soybeans

The hexa- β -glucopyranosyl-D-glucitol (**11**), which is a β -glucan fragment, exhibits phytoalexin-elicitor activity in soybeans (Scheme 3) (14). The hexasaccharide unit composed of the β (1,3) diglucosyl β (1,6) tetraglucoside is the minimum structural element for high elicitor activity. Scheme 3 shows a one-pot synthesis of the methyl hexasaccharide **12** involving chemo-selective glycosylation of the thioglycoside **14** at the 6 position with the 3,6-diglucosylated glucosyl imidate **13** and subsequent glycosidation of the remaining thioglycoside at the

生成したチオ糖 **4** を活性化し、グリコシル化することにより目的とする直鎖 3 糖 **5** をワンポットで得た。一方、分岐型ワンポットグリコシル化反応では、3、6 位に 2 つの水酸基を有する糖受容体 **8** を用いて、まず、6 位選択的にブromo糖 **6** をグリコシル化し二糖 **9** を合成し、残った 2 級水酸基にチオ糖 **7** を連続的にグリコシル化することにより分岐 3 糖 **10** をワンポットで得た。本手法を利用して、グルコース、ガラクトース、マンノースより構成される分岐および、直鎖 3 糖ライブラリーの合成を行なった。その際、合成効率化のために、アルゴノート社製の並列合成装置 Quest210 を用いた。ただし、ガラクトースをアクセプターとして用いる分岐型ワンポットグリコシル化反応は、ガラクトースの 3、6 位の水酸基の反応性の差が十分でないため達成できていない。なお、得られた糖鎖ライブラリーは、9 員環 DNA 切断分子と結合させ、配糖体型 DNA 切断分子ライブラリーの合成に利用した (11, 12, 13)。

C. ワンポットグリコシル化反応を利用した生物活性糖鎖の合成

C-1. 大豆ファイトレキシンエリシター糖鎖のワンポット合成
 グルカンの部分構造である還元糖を還元末端に有する 6 糖 **11** は、大豆のファイトレキシンエリシターとして知られている (14)。2 つの β (1,3) グリコシドを有する β (1,6) 4 糖からなる 6 糖部が、その活性発現最小単位である。スキーム 3 に、3 成分ワンポットグリコシル化反応による 6 糖 **12** の合成を示す (15)。本合成では、3 糖イミダート糖供与体 **13** のチオ糖 **14** への化学選択的グリコシル化反応、続く、二糖糖受容体 **15** への連続的なグリコシル化反応により分岐 6 糖 **16** を合成する。

Scheme 3. The synthesis of the branched hexasaccharide **12** by one-pot sequential glycosylation.

Scheme 4. The synthesis of the branched heptasaccharide **25** by one-pot sequential glycosylation.

primary alcohol of the disaccharide acceptor **15** in one-pot (15). Imidate and sulfanyl groups were effective in chemo-selective glycosylation of glucoside with 3,6-diglucosyl glucoside. TMSOTf, which was used to activate glycosyl imidate, did not prevent activation of the thioglycoside.

Linear- and branched-type one-pot glycosylations using more than two leaving groups in a reaction sequence allowed the one-pot synthesis of more complex branched oligosaccharides from simple building blocks (16). Scheme 4 shows a one-pot synthesis of the di-branched heptasaccharide **25** from seven independent building blocks possessing four different leaving groups (17). The glycosyl bromide **17**, ethyl glycosides **18** and **19**, glycosyl fluoride **20** and phenylthioglycosides **21** and **22** were activated in this sequence. The reaction sequence involved three steps: (i) regio-selective glycosylation of the primary alcohol of ethylthioglycoside **18** with the glycosyl bromide **17** in the presence of the secondary alcohol; (ii) glycosylation of the glycosyl fluoride **20**; and (iii) glycosylation of the remaining secondary alcohol with thioglycoside **19** to give the tetrasaccharide **24**. A successive one-pot glycosylation starting

イミダート糖の活性化剤である TMSOTf は、続くチオ糖の活性化を阻害しない点が重要である (スキーム 3)。

2 つ以上の脱離基を利用した直鎖型および、分岐型ワンポットグリコシル化反応を組み合わせることにより、より複雑な糖鎖の合成の簡便合成が可能になる (16)。スキーム 4 は、4 つの異なる脱離基を利用した 7 つの独立な糖ユニットの結合を含む 2 分岐 7 糖 **25** の合成を示す (17)。本合成では、ブロモ糖 **17**、エチルチオ糖 **18**、**19**、フッ化糖 **20**、フェニルチオ糖 **21**、**22** の連続的活性化を利用した。反応の順序は以下の通りである。まず、3、6 位に水酸基を有するエチルチオ糖 **18** の 6 位に、ブロモ糖 **17** を銀トリフレートで活性化して、位選択的および、化学選択的にグリコシル化を行なった。続いて、エチルチオ糖をメチルトリフレートを用いて活性化し、フッ化糖 **20** の 6 位にグリコシル化した。続いて、残った 3 位水酸基にエチルチオ糖 **19** をグリコシル化することにより分岐 4 糖 **24** を得た。同様な順番のグリコシル化を 2 つのフェニルチオ

with the tetrasaccharide **24** using three saccharide building blocks **21**, **22** and **23** (iv, v and vi) allowed the one-pot heptasaccharide synthesis using four different leaving groups. All of the glycosylations proceeded in a β -stereoselective manner via neighboring group participation of the C2 acyl protecting groups. The one-pot six-step glycosylation was achieved utilizing a parallel synthesizer (Quest 210), which was effective for the synthesis of an oligosaccharide library.

C-2. Synthesis of Core 2 Class Glycosyl Amino Acids by One-Pot Glycosylation

Gal β (1–3)-[GlcNAc β (1–6)]-GalNAc α (1–3)-Ser and -Thr (**26a** and **26b**), which are classified as core 2 class glycosyl amino acids, comprise mucin-type glycoproteins (Scheme 5). Glycosyl amino acids are important building blocks in the synthesis of glycopeptides and glycoproteins. Scheme 5 shows the synthesis of core 2 class glycosyl amino acids by one-pot three-step sequential glycosylation (18). Chemo-selective glycosylation of the trimethylsilyl ether on the 2-azido-6-*O*-trimethylsilyl-3-hydroxythioglycoside **28** with the glycosyl fluoride **27** was achieved by stoichiometric treatment with $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Subsequent glycosidation of the galactosyl fluoride **30**, followed by glycosidation of the resulting thioglycoside at the amino acids **31a** and **31b** provided the protected core 2 class glycosyl amino acids **32a** and **32b**. Use of the dihydroxyl acceptor **29** instead of the silylether **28** resulted in a mixture of the disaccharide **33**, trisaccharide **34** and thioglycoside **35**. The thioglycoside **35** was generated by aglycone transfer via **36** (19, 20). The silicon-fluoride interaction between donor and acceptor prevented these undesired reactions in glycosylation of the silylether **28** with the glycosyl fluoride **27**. (21)

糖 **21,22** および、メチルグリコシド **23** を利用して連続的に進行することにより、目的とする分岐 7 糖 **25** のワンポット合成を達成した。なお、すべてのグリコシル化反応は、2 位のアシル保護基の隣接基効果により、選択的に進行した。このワンポットグリコシル化反応は、先に述べた並列自動合成装置を利用して実施可能であり、ライブラリー合成に有用な手法であることが明らかにした (スキーム 4)。

C-2. コア 2 型糖アミノ酸のワンポット合成

Gal β (1–3)-[GlcNAc β (1–6)]-GalNAc α (1–3)-Ser and -Thr (**26a** and **26b**) は、コア 2 クラスと呼ばれる糖アミノ酸ユニットで、ムチン型の糖タンパク質に見られる。このアミノ酸ユニットは、糖ペプチドや糖タンパク質の化学合成における有用な中間体となる。スキーム 5 では、このコア 2 クラスの糖アミノ酸ユニットのワンポット合成を示す (18)。6 位をトリメチルシリル基で保護した 2 アジドチオ糖 **28** に対し、量論量の $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いて活性化させたフッ化糖 **27** を作用させると、位置及び化学選択的に 6 位にグルコサミンが導入されたチオ糖 **33** を得た。続いて、残った 3 位水酸基にガラクトシド **30** をグリコシル化し、最後に、セリン **31a**、または、スレオニン **31b** に対しグリコシル化することにより、目的とする糖アミノ酸ユニット **32a** と **32b** のワンポット合成に成功した。ここで、3、6 ジヒドロキシル体 **29** を用いてグリコシル化反応を行なうと、目的とする二糖 **33** だけでなく、3 位にもグリコシル化された 3 糖 **34**、また、チオニウムカチオン **36** を経由したアグリコン転位反応により生成したと考えられるチオ糖 **35** の生成を確認した (19, 20)。フッ化糖 **27** のシリルエーテル **28** へのグリコシル化反応では、シリコン-フッ素の相互作用によりシリルエーテルへの選択的なグリコシル化反応が進行し、これらの副反応を抑制したと考えている (21) (スキーム 5)。

Scheme 5. The synthesis of the glycosyl amino acids by one-pot sequential glycosylation.

C-3. Synthesis of Sialo-Containing Glycosyl Amino Acids by One-Pot Glycosylation

Sialic acids, such as Neu5Ac, Neu5Glc and KDN, are often located at the non-reducing end of glycoconjugates on the cell surface through α -glycosidic bonds, and play a central role in cell surface recognition phenomena. Adaptation of sialylation to one-pot glycosylation, would be an effective and attractive way to synthesize sialo-containing oligosaccharides. However, α -selective sialylation is a problematic step in the chemical synthesis of oligosaccharides. Recently, it was found that replacement of the acetamino group at the 5 position of the sialyl donor with an *N,N*-diacetyl (22), azido (23), *N*-TFA (24), *N*-Troc (25, 26), *N*-Fmoc (26), *N*-trichloroacetyl (26), or *N*-phthalimide (27) group is effective for direct α -selective sialylation. Scheme 6 shows our results from the glycosylation of the primary alcohol **38** with the sialyl donors **37a-i**, varying the *N*-protecting group at the 5 position. (26). The *N*-Fmoc and *N*-Troc β -thiophenyl sialosides **37d** and **37e** are suitable for the synthesis of glycosyl amino acids and glycopeptides because they can be modified to *N*-acetyl groups without racemization of amino acids. Scheme 7 shows a one-pot synthesis of sialo-containing glycosyl amino acids **41** using the *N*-Troc sialyl donor **37e**. Chemo-selective glycosylation of the galactosyl fluoride **42** with the *N*-Troc-protected thiosialoside **37e**, followed by glycosylation of galactosaminyl serine **43** provided the linear trisaccharide **41** in one-pot (26b). The α (2,3) sialylation of galactosyl fluoride proceeded smoothly to provide the sialyl galactosyl fluoride **44**. This chemo-selective sialylation method was useful for synthesizing building blocks

C-3. シアル酸含有糖アミノ酸のワンポット合成

シアル酸 (Neu5Ac, Neu5Glc, KDN) に代表されるシアル酸は、グリコシド結合を介し細胞表層の糖鎖の非還元末端に多く見られる。さらに、細胞表層でおこる細胞間相互作用に重要な役割を果たしている。もし、シアル化がワンポットグリコシル化反応に組み込むことが可能であれば、その手法は、様々なシアル酸含有糖鎖を合成する方法として有用な方法となると期待できる。しかしながら、選択的グリコシル化反応は、糖鎖の化学合成において問題の多いステップである。近年、5位のアセトアミド基を *N,N*-ジアセチル基 (22)、アジド基 (23)、*N*-TFA 基 (24)、*N*-Troc 基 (25, 26)、*N*-Fmoc 基 (26)、*N*-トリクロロアセチル基 (26)、または、*N*-フタロイル基 (27) に変換したシアル酸糖供与体が高い反応性を示すことが明らかになってきている。スキーム 6 は、我々が行った 5 位変換型シアル酸等供与体 **37a-i** のシアル化反応の比較結果を示している (26a,b)。最終脱保護工程を考慮すると、シアル酸含有糖アミノ酸の合成には、アミノ酸をラセミ化させることなくアセトアミド基へと変換可能な *N*-Fmoc および *N*-Troc 型シアル酸糖供与体 **37d**, **37e** が有用であると考えられる。スキーム 7 には、*N*-Troc 型シアル酸糖供与体 **37e** を利用したシアル酸含有糖鎖のワンポット合成を示した (26b)。*N*-Troc 型チオシアル糖供与体 **37e** は、フッ化ガラクトシド **42** の 3 位へ化学選択的にグリコシル化することが可能である。また、得られたフッ化糖 **44** を連続的に活性化することにより、目的とする直鎖 3 糖 **41** のワンポット合成に成功した。このような立体選択的かつ化学選択的なシアル化反応は、様々なシアル酸含有糖鎖合成の中間体合成にも有用な方法である (スキーム 6

Donor	R ₂ R ₁ N	39, Yield / % (α / β)	40
37a	ZHN	68 (84 / 16)	8
37b	AOCHN	-	-
37c	BocHN	44 (88 / 12)	20
37d	FmocHN	91 (86 / 14)	7
37e	TrocHN	91 (89 / 11)	6
37f	TFAHN	92 (92 / 8)	5
37g	TCAHN	83 (91 / 9)	4
37h	AcHN	47 (85 / 15)	28
37i	Ac ₂ N	65 (62 / 38)	23

The α / β ratio was determined by HPLC analysis.

Scheme 6. Glycosidation of *N*-modified sialyl donors **37a-i**.

Scheme 7. The synthesis of the sialo-containing linear trisaccharide by one-pot sequential glycosylation.

of various sialo-containing oligosaccharides.

D. Automated Synthesis of a Protected Oligosaccharide Library Based on Dimeric Lewis X Derivatives

Development of automated technology for the synthesis of oligosaccharides is an important development in the field of carbohydrate organic chemistry. One-pot glycosylation allows the synthesis of oligosaccharides from simple building blocks by addition of only the substrates and reagents. If the requisite manipulations of one-pot glycosylation could be adapted for use with an automated synthesizer, it would be an attractive way for automated synthesis of structurally complex oligosaccharides. Scheme 8 shows an automated synthesis of dimeric Lewis X derivatives by one-pot glycosylation utilizing an automated synthesizer (28). One-pot glycosylation for the synthesis of the tetra- to octa-saccharides **46** was initiated by chemo- and regio-selective glycosylation of the 2-*N*-phthaloyl thioglucosamine **45** at the C4 position with the galactosyl fluoride **A2** or **A3**. Activation of the resulting thioglycoside for coupling with the glycosyl acceptor **B1** or **B2**, followed by α -selective glycosylation of the remaining C3 hydroxyl group of the glucosamine unit with thiofucoside **C** provided the protected oligosaccharides **46** in one-pot. The use of glucosamines, **A3**, **B1-B2**, and **C** enabled the synthesis of the di- to tetra-saccharides **47**. An automated synthesizer (L-COSTM), which allows for controlled stirring, reaction temperature, and rate of reagent addition, was used in the library synthesis (Fig. 1) (29). Fig. 1 shows the program schedule for the parallel synthesis of twelve oligosaccharides **46** and **47**. The program run time was eight hours, after set-up of all reagents. Purification of the twelve crude compounds

and 7).

D. ダイメリックルイス X 類縁体ライブラリーの自動合成

糖鎖の自動合成法の開発は、糖質合成化学における重要な課題の一つである。ワンポットグリル化反応は、試薬および、基質の連続的な投入という簡便な操作だけで、簡単なユニットより、オリゴ糖の合成を可能にする。もし、これらの反応操作を自動合成装置で行なうことができれば、複雑な糖鎖の自動合成法となりうる。スキーム 8 にワンポットグリコシル化反応を利用したダイメリックルイス X 類縁体ライブラリーの自動合成について示している (28)。ダイメリックルイス X 類縁体 **46** は、2 位をフタルイミドで保護したチオグルコサミン **45** の 4 位に対するフッ化糖 **A2**, **A3** の位置及び化学選択的なグリコシル化、続く、チオ糖の糖受容体 **B1**, **B2** へのグリシル化、最後に、残ったグルコサミンの 3 位水酸基にフコースユニット **C** を導入することにより達成した。ルイス X 類縁体 **47** は、プロモ糖をフッ化糖の代わりに用いることで合成できる。図 1 に、自動合成装置とそのプロトコルを示す。本研究で用いたモリテックス社製自動合成装置 (L-COS) は、40 種類の反応容器について、かくはん、反応温度、試薬の分注を制御できる。プロトコル図において、矢印は、試薬の分注を示し、下部にその時の反応温度を示した。当研究室では以前、本自動合成装置を利用した糖鎖の並列合成について報告している (29)。本プログラムの実行には、8 時間を要した。反応終了後、

Scheme 8. The synthesis of the dimeric Lewis X epitope family by one-pot sequential glycosylation.

MORITEX L-COS

Fig. 1. The automated synthesizer (L-COS) and the program for the library synthesis.

using silica gel chromatography and gel permeability chromatography provided twelve protected oligosaccharides **46** and **47** in 22-46% overall yields based on **B1** or **B2**.

E. Polymer-Assisted Strategy for Deprotection of Protected Oligosaccharides

Deprotection of the protected oligosaccharides **48** to **52**, including the cleavage of various *O*-protecting groups and the replacement of *N*-protecting groups with *N*-acetyl groups is the final process in oligosaccharide synthesis (Scheme 9). Complete deprotection of protected oligosaccharides frequently requires tuning the reaction solvents to prevent precipitation of partially deprotected intermediates. In addition, isolation and purification of the highly polar intermediates often results in loss of compounds. To overcome these problems, a polymer-assisted method for the deprotection of protected oligosaccharides was developed (30). The solid-supported protected oligosaccharide **51** linked through a tetrahydropyranyl (THP) linker was designed as a key intermediate. The solid-supported complex oligosaccharides smoothly undergo deprotection because aggregation is very limited. A Birch reduction was used to remove the solid-supported benzyl ethers and esters on **51** (31). The THP linker survived under the strongly basic conditions for deprotections and was cleaved under mildly acidic

反応溶液を濃縮、得られたクルードを精製することによって、目的とする糖鎖を収率 22-46% で得た (スキーム 8 and 図 1)。

E. 固相法を用いる保護糖鎖の脱保護法の開発

様々な水酸基の保護基および、アミノ基の保護基の *N*-アセチル化への変換を含む保護糖鎖の脱保護 (**48** to **52**) は、糖鎖の化学合成の最終段階である (スキーム 1)。糖鎖の完全脱保護行程では、その反応中間体が、反応中に凝集しないよう反応溶媒を調整することが必要となる。合成中間体の凝集性は構成する単糖の種類および、結合順序、そして保護基の組み合わせに依存するため、反応条件だけでなく、脱保護の順番も化合物ごとに注意深く調整する必要がある。さらに、複数種類の保護基を脱保護する場合、その各々の段階で得られる高極性な合成中間体の単離や精製にロスが含まれる。これらの問題を解決すること目的として、我々は、固相法を用いる脱保護法の開発を行なった。(30) 本脱保護法では、固相上にテトラヒドロピラニルリンカーを介して結合した保護糖鎖 **51** が、鍵中間体である。固相上に担持された糖鎖は凝集しにくいので、脱保護がスムーズに進行すると期待した。ベンジルエーテルや、エステル脱保護には、Birch 還元を利用するこ

Scheme 9. Solid-assisted strategy for the deprotection of protected oligosaccharides.

conditions to release the fully deprotected oligosaccharide **52** without anomerization or cleavage of the glycosidic bonds (32). Solid-supported compounds are easy to handle, making them effective, not only for high-speed synthesis of a single target oligosaccharide, but also for deprotection of protected oligosaccharide libraries (13, 33). The polymer-supported protected oligosaccharide **51** can be prepared using the following reaction sequence: (i) acetal formation of the protected saccharides **48** that possess at least a hydroxyl group with the prelinker **49** containing a DHP moiety and an activated ester; and, (ii) subsequent amidation of the resulting activated ester with the solid-supported amines **50** to give **51**, in an irreversible reaction. The irreversible loading reaction enables complete immobilization of the protected oligosaccharides **48** (34).

Scheme 10 shows the deprotection method applied to the synthesis of the protected trimeric Lewis X epitope **55** based on the polymer-assisted strategy (Scheme 4). The treatment of the protected deca-saccharide **53** with 3 equivalents of the prelinker **49** in the presence of CSA at room temperature, followed by loading onto the resin using 10 equivalents of the solid-supported amine **50** provided the solid-supported oligosaccharide **54**. Completely deprotected trimeric Lewis X epitope **55** in 58% overall isolated yields based on **53** resulted from the following reaction sequence:

ととした (31)。THP リンカーは、これらの脱保護反応に安定で、かつ、グリコシド結合の異性化や、切断なく固相上より切り出すことを可能にする (32)。固相上に化合物を固定化し、取り扱いを容易にすることは、糖鎖の迅速合成だけでなく、多種類の糖鎖の並列脱保護にも有用であると考えられる (13, 33)。THP リンカーで固定化された糖鎖 **51** は、デヒドロピランと活性化エステルから構成されるプレリンカー **49** を用いて、液相でのアセタール化、続く、固相上のアミン **50** へのアミド化によって調製する。後者は、不可逆反応にであるので、液相法で合成した糖鎖を効率的に固定化できると期待した (スキーム 10) (34)。

スキーム 10 は、固相脱保護法を用いたトリメックルイス X55 の脱保護について示している。保護された 10 糖 **53** を 3 当量のプレリンカー **49** と酸性条件下反応させた。続いて、塩基性条件下、10 当量の固相上のアミン **50** とのアミド化により固相上に保護糖 **54** を合成した。エタノール溶媒中ヒドラジンを作用させることにより、フタロイル基を除去し、続いて、遊離のアミンをアセトアミドへと変換した。続いて、Birch 還元条件下、ベンジル基、ベンジリデンアセタール、および、エステルを脱保護した。最後に、固相から切り出すことに

Scheme 10 The deprotection of the protected trimeric LewisX based on the solid-assisted strategy.

removal of the phthaloyl groups of the solid-supported oligosaccharide **54**; acetylation of the resulting amines; cleavage of benzyl ethers, benzylden acetal, and esters under Birch reduction conditions; cleavage from the resin under mildly acidic conditions. . ArgoPore resin was critical for the quantitative cleavage of solid-supported benzyl ethers from the solid.

F. Conclusion

In this study, biologically important oligosaccharides were synthesized in a one-pot glycosylation and a polymer-assisted deprotection method was developed. These methods may be effectively applied not only to the high-speed synthesis of a single target oligosaccharide, but also to the synthesis of oligosaccharide libraries. These chemically synthesized oligosaccharides will facilitate the study of the biological functions of oligosaccharides. Although well-trained organic chemists are required for preparation of the requisite building blocks, automated lab equipment will increase the availability of these chemicals.

より目的とする 10 糖脱保護体 **55** を保護糖 **53** を基準として収率 58% で得た。切り出した化合物を ^1H NMR によって分析したところ、残存するベンジルエーテルは確認されなかった。また、固相上のベンジルエーテルの Birch 還元による切断は、ArgoPore レジンをを用いた場合に、効率的に進行した (スキーム 10)。

F. 結 論

本総説では、当研究室で開発してきたワンポットグリコシル化反応と固相脱保護法による生物活性糖鎖の合成について述べている。これらの方法は、標的糖鎖の迅速合成だけでなく、糖鎖ライブラリー構築に有用な手法である。これらの化学的に合成されたオリゴ糖鎖は、それらの機能解明研究に大きく寄与すると思われる。現段階では、誘導体合成に必要な糖鎖ユニットの合成には、いまだ熟練した有機合成化学者が必要であるが、この問題については、ラボオートメーション技術によって、将来的には解決されていくであろう。

謝 辞

本研究は、高橋研究室の学生諸氏の昼夜を問わないたゆまない努力と研究に対する情熱の上に成し遂げられたものである。ここに深く感謝申し上げます。

References

1. (a) Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97. (b) Dwek, R. A. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 683. (c) Hakomori, S. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 173. (d) Bucior, I., and Burger, M. M. (2004) *Curr. Opin. Struct.* **14**, 631
2. Seeberger, P. H. and Haase, W.-C. (2000) *Chem. Rev.* **100**, 4349
3. Plante, O. J., Palmacci, E. R., and Seeberger, P. H. (2001) *Science* **291**, 1523
4. Raghavan, S., and Kahne, D. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1580
5. Ley, S. V., and Priepke, H. W. M. (1994) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **33**, 2292
6. (a) Zhang, Z., Ollmann, I. R., Ye, X.-S., Wischnat, R., Baasov, T., and Wong, C.-H. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 734. (b) Ye, X.-S., and Wong, C.-H. (2000) *J. Org. Chem.* **65**, 2410
7. Yamada, H., Harada, T., Miyazaki, H., and Takahashi, T. (1994) *Tetrahedron Lett.* **35**, 3979
8. Chenault, H. K., and Castro, A. (1994) *Tetrahedron Lett.* **35**, 9145
9. Yamada, H., Kato, T., and Takahashi, T. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 4581
10. Takahashi, T., Adachi, M., Matsuda, A., and Doi, T. (2000) *Tetrahedron Lett.* **41**, 2599
11. (a) Doi, T., and Takahashi, T. (1991) *J. Org. Chem.* **56**, 3465. (b) Takahashi, T., Tanaka, H., Yamada, H., Matsumoto, T., and Sugiura, Y. (1996) *Angew. Chem., Int. Ed.* **35**, 1835. (c) Takahashi, T., Tanaka, H., Yamada, H., Matsumoto, T., and Sugiura, Y. (1997) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **36**, 1524
12. (a) Takahashi, T.; Tanaka, H.; Matsuda, A., Doi, T., and Yamada, H. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3299. (b) Takahashi, T., Tanaka, H., Matsuda, A., Doi, T., Yamada, H., Matsumoto, T., Sasaki, D., and Sugiura, Y. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3303
13. Matsuda, A., Doi, T., Tanaka, H., and Takahashi, T. (2001) *Synlett*, 1101
14. (a) Sharp, J. K., Valent, B., and Albersheim, P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11312. (b) Sharp, J. K., McNeil, M., and Albersheim, P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11321. (c) Sharp, J. K., Albersheim, P., and Lindberg, B. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11341
15. Yamada, H., Harada, T., and Takahashi, T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7919
16. Yamada, H., Takimoto, H., Ikeda, T., Tsukamoto, H., Harada, T., and Takahashi, T. (2001) *Synlett* 1751
17. Tanaka, H., Adachi, M., Tsukamoto, H., Ikeda, T., Yamada, H., and Takahashi, T. (2002) *Org. Lett.* **4**, 4213
18. Tanaka, H., Adachi, M., and Takahashi, T. (2004) *Tetrahedron Lett.* **45**, 1433
19. For intermolecular aglycon transfer of thioglycoside, see: (a) Coutant, C., and Jacquinet, J.-C. (1995) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** 1573. (b) Leigh, D. A., Smart, J. P., and Truscetto, A. M. (1995) *Carbohydr. Res.* **276**, 417. (c) Belot, F., and Jacquinet, J.-C. (1996) *Carbohydr. Res.* **290**, 79. (d) Biao, H. Y., Wu, X., Hui, Y., and Han, X. J. (2000) *Chem. Soc., Perkin Trans.* 11445. (e) Zhu, T., and Boons, G.-J. *Carbohydr. Res.* **329**, 709
20. Recently, 2,6-dimethylphenylthioglycosides were effective for preventing the aglycon transfer, see: Li, Z., and Gildersleeve, J. C. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11612.
21. (a) Hashimoto, S., Hayashi, M., and Noyori, R. (1984) *Tetrahedron Lett.* **25**, 1379. (b) Kunz, H., and Sager, W. (1985) *Helv. Chim. Acta.* **68**, 283. (c) Yoshizaki, H., Fukuda, N., Sato, K., Oikawa, M., Fukase, K., Suda, Y., and Kusumoto, S. (2001) *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 1475

22. Demchenko A. V., and Boons, G.-J. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 3065
23. Yu, C.-S.; Niikura, K., Lin, C.-C.; Wong, C.-H. (2001) *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 2900
24. (a) Meo, D., Demchenko, A. V., and Boons, G.-J. (2001) *J. Org. Chem.* **66**, 5490 (b) Demchenko, A. V., and Boons, G. J. (1999) *Chem. Eur. J.* **5**, 1278
25. (a) Ando, H., Koike, Y., Ishida, H., and Kiso, M. (2003) *Tetrahedron Lett.* **44**, 6883. (b) Ando H, Koike Y, Koizumi S, Ishida H, Kiso M. (2005) *Angew. Chem., Int. Ed.* **44**, 6759
26. (a) Adachi, M., Tanaka, H., and Takahashi, T. (2004) *Synlett* 609. (b) Tanaka, H., Adachi, M., and Takahashi, T. (2005) *Chem. Eur. J.* **11**, 849. (c) Tanaka, H., Nishiura, Y., Adachi, M., and Takahashi, T. (2006) *Heterocycles* **67**, 107
27. Tanaka, K., Goi, T., and Fukase K. (2005) *Synlett* 2958
28. Tanaka, H., Matoba, N., Tsukamoto, H., Takimoto, H., Yamada, H., and Takahashi, T. (2005) *Synlett* 824
29. We have reported on the parallel synthesis of a oligosaccharide library utilizing the automated synthesizer, see; Tanaka, H., Amaya, T., and Takahashi, T. (2003) *Tetrahedron Lett.* **44**, 3053
30. Tanaka, H., Ishida, T., Matoba, N., Tsukamoto, H., Yamada, H., and Takahashi, T. (2006) *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, 6349
31. The solid-supported benzyl ethers are known to be difficult to cleave. (a) Kanie, O., Grotenbreg, G., and Wong, C.-H. (2000) *Angew. Chem., Int. Ed.* **39**, 4545. (b) Adinolfi, M., Barone, G., Iadonisi, A., and Schiattarella, M. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 5971.
32. Thompson, L. A., and Ellman, J. A. (1994) *Tetrahedron Lett.* **35**, 9333
33. Tanaka, H., Zenkoh, T., Setoi, H., and Takahashi, T. (2002) *Synlett* 1427
34. Meseguer, B., Alonso-Díaz, D., Griebenow, N., Herget, T., and Waldmann, H. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2902

Received on June 15, 2007, accepted on July 31, 2007

Profile of the Authors

Hiroshi Tanaka received his B.S., M.S. and Ph D. from Tokyo Institute of Technology in 1991, 1993, and 1996, respectively, under the direction of Professor Takashi Takahashi. His professional career started at Simitomo Pharmaceutical CO. LTD. (1996-1999). Then he worked at Tokyo Institute of Technology as a postdoctoral research associate supervised by professor Takashi Takahashi (1999-2001). He joined the department of Chemical Engineering at Tokyo Institute of Technology as Assistant Professor (2001-). He was a recipient of the GlycoTOKYO Incentive Award in 2005 and the Japanese Society of Carbohydrate Research Incentive Award in 2006.

★★★★★★★★

Haruo Yamada graduated from the Department of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology in 1982 (M.S.). After working at Meiji College of Pharmacy (1984-1988), he joined Tokyo Institute of Technology as a research associate to start his career in the carbohydrate field under Prof. Takashi Takahashi. He obtained his Ph.D. degree from the Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology in 1991. He was appointed as an associate professor in 1996. In 2000, he moved to Okayama University of Science as professor. His current research interests are in the area of carbohydrate chemistry and synthetic organic chemistry.

★★★★★★★★

Takashi Takahashi received his B.S. in 1970 from Tohoku University. He then moved to Columbia University and received his Ph.D. in 1976 under the direction of Professor G. Stork. He joined the department of Chemical Engineering at Tokyo Institute of Technology as Assistant Professor (1976-1989), Associate Professor (1989-1993) and rose to the rank of Full Professor in the department of Applied Chemistry in 1993. He was a recipient of the Progress Award in Synthetic Organic Chemistry, Japan in 1984. He has been president of the Japan Combinatorial Chemistry Focus group (JCCF) since 1997. His research interest is in the area of synthetic organic chemistry, organometallic chemistry, and combinatorial chemistry.