Chemical Synthesis of Re-type Lipopolysaccharide

Re 型リポ多糖の全合成

Oikawa, Masato

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University
Machikaneyama-cho 1-1, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan
FAX: 81-6-6850-5419, E-mail: moik@chem.sci.osaka-u.ac.jp

Key Words : *lipopolysaccharide, total synthesis, lipid A, Kdo, glycosylation*

Abstract

We have developed an efficient synthetic pathway for lipid A and its glycosylation method with Kdo. In combination with several additional new ideas such as the use of an oxidation-resistant benzyl-type protecting group and the application of liquid-liquid partition column chromatography, the synthesis of Re-type lipopolysaccharide has been achieved for the first time. The pathway allows us to synthesize various structural congeners of lipopolysaccharide of high purity, which are necessary to evaluate the biological and physicochemical functions of lipopolysaccharide precisely.

要 約

我々はリポ多糖に含まれるリピドA部分の効率的な合成法と、そこにKdoを高収率でグリコシル化する方法を開発した。抗酸化性ベンジル型保護基の開発や、液-液分配カラムクロマトグラフィーによる精製法の技術的な改良もあわせて、Re 型リポ多糖の初めての全合成に成功した。化学合成により得られる完全純粋品はリポ多糖のさまざまな機能を詳細に研究するために有用なものである。

A. Introduction

Lipopolysaccharide (LPS) is a major constituent of the outermost cell surface structure of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. LPS enhances immunological responses of higher animals including human(1). This is an elaborated important defense system of animals against infection of bacteria (see other reviews of this issue for details). Overactivation of the system is often observed as detrimental effects such as high fever, hypotension, and lethal toxicity. We have been working since the early 1980's on the bioactive entity of LPS starting with structural determination and then by synthesis of its active entity called lipid A **2** (Fig. 1)(2,3), which is a proximal partial structure of LPS. Lipid A **2** has an amphiphilic structure which consists of a $\beta(1\rightarrow6)$ glucosamine disaccharide acylated and phosphorylated. Since our first synthesis of **2**(3,4), we have synthesized its many structural analogues and studied the relationships between structure and bioactivities of lipid A(5-9) (10-14).

It had been suggested from a study using natural LPS that the polysaccharide portion linked at the 6'-hydroxy group of lipid A **2** influences the intrinsic biological function of **2**(15). However, there could be no quantitative data available on this issue since there was no well-established method of preparing

A. はじめに

リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) は大腸菌などグラム陰性菌の細胞表層構造を形成する主成分のひとつで、動物に発熱や悪寒などを引き起こし、さらに進んでショックや死をもたらす作用を有していることがわかっている(1)。高等動物にとっては一見有害と思われるようなリポ多糖のこの作用は、実はバクテリアの感染に対する動物の防御機構が過剰に反応した結果である。この防御反応の生物学的な研究は本特集の他稿に譲るとして、ここではリポ多糖に関連した合成研究について紹介する。我々はこのような生物活性を有するバクテリア表層のリポ多糖に興味を持ち、主に合成を中心とした化学的なアプローチによって、その活性の本体がリピドAと呼ばれるリポ多糖の末端糖脂質 (**2**)であることをすでに明らかにした(2,3)。図1に示すように、リピドAは $\beta 1\rightarrow 6$ 結合したグルコサミン二糖がリン酸化とアシル化を受けた両親媒性の構造をしていて、その6'位水酸基に多糖が結合したものがリポ多糖である。我々はリピドAの初めての全合成以来(3,4)、そのさまざまな類縁体を化学合成して構造と活性の相関関係について明らかにしてきた(5-9) (10-14)。その過程で、リピドAの有する自己会合性が活性発現に重要であるらしいことを見出している。

天然リポ多糖やその分解物を用いた研究によって、リピドAの6'位水酸基に結合している多糖はリピドAそのものの活性に変化を与えることが示唆されていたが(15)、それを支持する信頼性の高い定量的なデータは存在しなかった。その理由は、天然源からも化学合成によっても単一の構造を有する純粋なり

Fig. 1.

highly pure LPS either by purification of natural products or by chemical synthesis. Thus, a method of producing highly pure LPS first needed to be established (12,13)(16). We started a program directed toward a total synthesis of Re-type lipopolysaccharide (Re LPS, **1**), which is composed of two 3-deoxy-D-manno-2-octurosonic acids (formerly called 2-keto-3-deoxy-D-mannooctonic acid, Kdo) and lipid A (17). We have eventually succeeded in its first total synthesis (18), which is described here.

B. An Improved, Efficient Synthesis of Lipid A

The synthetic pathway toward lipid A **2** was reinvestigated first because high-yield preparation of this moiety was essential for the successful synthesis of **1** (8). The synthesis of two glucosamine components **5** and **8** is summarized in Fig. 2. Both components were synthesized by selective reductive opening in two different directions of the 4,6-*O*-benzylidene group of **3**, prepared from D-glucosamine in 3 steps.

For the synthesis of right-hand glucosamine **5**, the 3-hydroxy group of **3** was protected as an MPM ether. We have found that the reductive opening of a 4,6-*O*-benzylidene group of a gluco-type saccharide with $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{NH}$ and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ in CH_2Cl_2 gave a 4-*O*-Bn ether when the 3-hydroxy functional group was protected as an ether (19). In fact, the 4-*O*-Bn ether **4** was obtained as a sole product in 85% yield by applying these reagents in CH_2Cl_2 . *N*-Troc group was then removed (20), and the

ポ多糖を得る手法が確立されていなかったためである。上に述べたリピドAの研究を進展させて、リポ多糖の機能研究に化学の立場から貢献するにはまず高度に純粋な化合物を供給する手法を確立せねばならない (12,13)(16)。以上のような背景から、我々はリピドAにKdoという酸性糖が二残基縮合したRe型リポ多糖 **1** (17) を標的に選び、その合成に取り組んでこれに成功した (18)。これは天然リポ多糖の初めての全合成である。

B. リピドAの効率的な合成

ここでは最初到大腸菌型リピドA **2**の改良合成について述べる (8)。まず、グルコサミンから三段階で導いた同じ **3** から、ベンジリデン基の異なる位置での選択的な還元開裂反応によってリピドAに含まれるふたつのグルコサミン成分を以下のように合成した (図 2)。

まず、右側糖成分の合成のために **3** の3位水酸基をMPM化した。我々はグルコ型糖の4,6-*O*-ベンジリデン基を $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{NH} \cdot \text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ で還元するときに、3位水酸基をエーテル型保護基で保護して反応溶媒に CH_2Cl_2 を用いると4-*O*-ベンジル (Bn) エーテルが生成することを見出している (19)。実際にこの反応を **3** に適用してみると、反応は完全な位置選択性で進行し、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ による MPM 基の除去と合わせて二段階 85 % の収率で4-*O*-Bn保護グルコサミン誘導体 **4** を得ることができた。Troc基をZn-Cuカップルで切断し (20)、生じたアミノ基を3-ベンジロキシ脂肪酸と縮合させて二糖合成の際の糖受容体となる **5**

Fig. 2.

generated amino group was acylated to give **5** in 77% yield.

To transform the common intermediate **3** into the left-hand glucosamine **8**, the 4-hydroxy functional group has to be liberated and phosphorylated. We have also found that a 6-*O*-Bn ether is selectively obtained by applying the reduction by $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{NH}$ and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ in CH_3CN to a 3-*O*-acyl-4,6-*O*-benzylidene substrate(19). On the basis of this knowledge, the 3-hydroxy group of **3** was first acylated with (R) -3-(tetradecanoyloxy)tetradecanoic acid(6,14,21). The reductive opening reaction of **6** thus obtained proceeded quite smoothly as had been expected from our empirical rule(19) to afford the desired 6-*O*-Bn ether **7** in 90% yield with complete regioselectivity. After 2-step operations for phosphorylation of the generated 4-hydroxy group into Watanabe's cyclic phosphate(22), the 1-*O*-allyl group was removed(23). The 1-hy-

へと 77% の収率で導いた。

共通中間体 **3** を左側糖成分へと変換するためには 4 位水酸基をまず再生させ、リン酸化する必要がある。我々は 4,6-*O*-ベンジリデン基の $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{NH} \cdot \text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ による還元開裂反応を 3-*O*-アシル体に対して CH_3CN 中で行うと 6-*O*-Bn エーテルが得られることも明らかにしている (19)。そこでまず **3** の 3 位水酸基をアシルオキシ脂肪酸 (6,14,21) でアシル化し、得られた **6** にこの還元開裂反応を施すと、90% の収率で望む 6-*O*-Bn エーテル **7** が、我々の経験則どおり (19) 完全な選択性で得られた。このベンジリデン基の還元開裂法は大きなスケールで行うと収率が低下する場合があるものの、反応条件が穏やかで加水分解をほとんど起こさず選択性がよい利点を有している。アミダイト法で 4

Fig. 3.

droxy group was then trichloroacetimidated to give **8** to be used for the glycoside coupling with the right-hand saccharide **5**.

The coupling of the two glucosamine derivatives **5** and **8** was effected by using $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ in 84% yield. After acylations at 3- and 2'-positions were performed, 1-*O*-allyl group of **10** was deprotected. Subsequent 1-*O*-phosphorylation was carried out in an α -selective manner(24) and hydrogenolytic deprotection of all the benzyl-type protecting group provided lipid A **2**. Purification of amphiphilic **2** was efficiently accomplished with high recovery of 81% yield by liquid-liquid partition column chromatography on LH-20 gel(7).

The total yield for the synthesis of **2** from glucosamine derivative **3** was satisfactorily 24% for 11 steps. Our attention then moved to an efficient method of glycosylation with Kdo, which allow us stepwise introductions of two Kdo residues to the glucosamine disaccharide corresponding to lipid A prepared by the synthetic pathway thus established.

C. Glycosylation with Kdo

Kdo has a characteristic 3-deoxy-2-urosonic acid structure (Fig. 3). Because Kdo is available in only a limited amount from natural resources, it has to be supplied by chemical synthesis from D-mannose for the multi-step synthesis of Re LPS(25). Two main problems in glycosylation with Kdo are: 1) anchimeric assistance is not available for the control of the stereoselectivity due to the lack of participative group at the neighboring 3-position, and 2) elimination at C2–C3 position readily takes place when oxocarbenium ionic intermediate species are generated for glycosylation, to give glycals which is no longer useful for glycosylation. Although several glycosylation methods(26) had been reported using glycosyl bromide(10,27) or Williamson ether synthesis(13,28), these methods can not be applied for the synthesis of Re LPS **1** because of their low yield and low stereoselectivity. We have previously reported that glycosylation with 4,5- and 7,8-di-*O*-isopropylidene-protected Kdo fluoride proceeded in moderate yields(29) (30). On the basis of that finding, glycosylation with Kdo fluoride was further explored in the present synthetic study. As for the stereoselectivities, we had found that an isopropylidene protecting group introduced at the 4,5-hydroxy groups effectively shielded the upper β -face of the Kdo framework to prevent an approach of a glycosyl acceptor from this side, providing an aglycoside predominantly(29). The 4,5- and 7,8-di-*O*-

位水酸基を渡辺リン酸エステル (22) として誘導体化した後にアリル基を除去 (23)、イミデート化して糖供与体 **8** を得た。

2つのグルコサミン誘導体 **5**, **8** の縮合には、酸触媒に $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ を用いた。N-Troc 基の関与により反応は完全に β 選択的に進行し、二糖 **9** が 84% の収率で得られた。これでリピド A **2** の合成に向けては、3, 2' 位のアシル化と 1 位リン酸化を残すのみである。長鎖脂肪酸を常法により順次導入して **10** としたのちに、1 位アリル基を脱保護した。ピロリン酸とリチウムアミドによって α 選択的に 1 位リン酸化を行い (24)、最後に接触水素化によりベンジル系保護基を一挙に除去してリピド A **2** へと導いた。両親媒性の性質を持ち、溶液中で会合しやすい **2** の最終精製は、LH-20 を担体に用いた液-液分配カラムクロマトグラフィー (7) によって行い、81% の高収率で **2** を損失なく得ることができた。

グルコサミン誘導体 **3** からの段階数は 11、全収率は 24% であり、我々はリピド A **2** の合成経路はこれで確立できたと考えた。そこで次に Kdo を用いたグリコシル化に取り組むことにした。本研究で目的の Re 型リポ多糖 **1** は以上のように確立した合成法にならってリピド A 部分を調製し、それに二残基の Kdo を順次グリコシル化して導入することによって合成できると考えた。

C. Kdo のグリコシル化

Kdo は 3-デオキシ-2-ケトース構造を有するアルドン酸である (図 3)。Kdo は天然源からは入手することができず極めて高価であるため、合成研究で用いるだけの量を得るには D-マンノースからの化学合成が必要である (25)。そして Kdo を用いるグリコシル化は、1) 立体制御のための隣接基関与が利用できない、2) 2-3 位間での脱離が起こり再利用不可能なグリカルが相当量生成してしまう、などの問題があり、さらに得られた Kdo グリコシドが酸性条件下で切断されやすいこともリポ多糖の合成を難しくしていた。Kdo を用いるグリコシル化 (26) は臭化糖を用いる方法 (10, 27) や Williamson エーテル合成法によるもの (13, 28) が報告されているが、リポ多糖の合成研究に利用できるレベルのものではない。我々は以前、フッ素を脱離基とするとグルコサミン二糖へのグリコシル化が中程度の収率で進行することを報告している (29)(30)。したがって本研究においてもフッ化 Kdo を糖供与体として用いることにした。また、以前の研究では Kdo の 4, 5 位水酸基をイソプロピリデン基として保護することにより凸面である α 側からの受容体の攻撃が優先することを見出していた (29)。我々は 4, 5 位水酸基の保護基が立体制御だ

Table. I

entry	donor	acceptor	BF ₃ ·OEt ₂ / eq	DIPEA / eq	disaccharide (yield, α:β)	yield of glycal
1	11	13	2.5	2.0	15 (72%, 90:10)	61%
2	12	13	2.5	2.0	16 (45%, 94:6)	10%
3	11	14	1.1	–	15 (83%, 87:13)	42%
4	12	14	1.5	–	16 (81%, 93:7)	5%

isopropylidene-protected Kdo donor itself can not be applied to the present study because the 4,5- and 7,8-*O*-protecting groups can not be differentiated toward synthesis of Re LPS **1**. Several Kdo fluorides, which have cyclic or bulky acyclic protecting groups for 4,5-hydroxy functions with 7,8-di-*O*-Bn ethers, were therefore synthesized and their efficiency in glycosylation was evaluated. Among them, two fluorides, **11** and **12**, proved to give satisfactory results as described below.

Glycosylation using Kdo fluorides **11** and **12** was carried out with a glucosamine derivative **13** and its TES ether **14** by the action of BF₃·OEt₂ (Table I)(31). In the glycosylation of **13**, ⁱPr₂NEt was added to the reaction mixture to neutralize HF produced as the reaction proceeded(32). When **13** was glycosylated with 4 eq. of the isopropylidene-protected Kdo fluoride **11**, the disaccharide **15** was obtained in 72% yield (entry 1). By changing the glycosyl donor to **12**, the yield decreased to 45% whereas the α-stereoselectivity increased (entry 2). This result indicates that acyclic but bulky TBS group is also effective for the steric shielding of the upper β-face to control the approaching direction of the glycosyl acceptor. It should also be noted here that the side-production of the glycal was greatly suppressed when TBS-protected Kdo fluoride **12** was used as a glycosyl donor. Suppression of glycal formation is supposed to result from a fine conformational difference of a pyranose ring of the intermediate. This was the most valuable finding toward the total synthesis of Re LPS.

The yield of the glycosylation of **13** with TBS-protected Kdo fluoride **12** was improved by employing 6-*O*-TES glucosamine derivative **14** as more reactive glycosyl acceptor (entry 4). In this case the desired Kdo glycoside **16** was obtained in

けでなく、グリコシル化の際のグリカールの副生量にも影響を及ぼすのではないかと考えて、4,5 位水酸基に数種の異なる保護基を導入した糖供与体を合成し、グリコシル化反応における優劣を比較した。そのうちの2つの供与体 (**11**, **12**) を用いたグリコシル化の結果を以下に示す。

我々の以前の結果 (16) を参考に、この検討ではグルコサミン誘導体 **13** もしくはその TES エーテル **14** を糖受容体に用い、反応は BF₃·OEt₂ の作用によって行った (表 I) (31)。また、**13** のグリコシル化の場合には反応が進むにつれて生じる HF を中和するために ⁱPr₂NEt を系内に添加した (32)。糖供与体 **11** を 4 当量用いて **13** と反応させたところ、72 % の収率で二糖 **15** が得られた (entry 1)。糖供与体を **12** に変えてグリコシル化を行うと、収率は45%に低下してしましたが、α 選択性はむしろ向上した (entry 2)。このことは Kdo の上面 (β 面) に存在する 4,5 位の TBS 基も α 選択的グリコシル化には有効であり、必ずしも β 面を環状型保護基によって凹面にする必要はないことを示すものである。ここで注目すべきは TBS 糖供与体 **12** を用いた場合にはグリカールの副生が大きく抑えられていることである。4,5 位水酸基の保護基を変えることによってもたらされる副生グリカール量の変化は、ピラノース環の配座の違いによってもたらされると考えているが、紙面の都合によりここでは省略する。Kdo を用いるグリコシル化で最も問題となるグリカールの副生は主に 4,5 位水酸基の保護基の選択によって制御できることを明らかにし、我々は Re 型リポ多糖 **1** の全合成のための大きなハードルを越えた。TBS 保護 Kdo 供与体 **12** を用いる Kdo 化では収率が低かったが、糖受容体に活性の高い TES エーテルを採用することによってこの問題を解決することができた (entry 4)。すなわち、2 当量の **12** を 1.5 当量の BF₃·OEt₂ の作用によって TES 保護糖受容体 **14** と縮合させると、立体選択性は保持したままで

satisfactory 81% yield without loss of α -stereoselectivity. The yield for undesired glycal was only 5% and most of the excess Kdo used was recovered as its hydrolyzed product. Because the use of isopropylidene-protected Kdo fluoride **11** for glycosylation of the TES ether **14** also gave the Kdo glycoside **15** in high yield (83%, entry 3), TES ether is generally an efficient glycosyl acceptor for glycosylation with Kdo fluoride as well (16).

D. Total Synthesis of Re-type LPS

Since our preliminary studies showed that Watanabe's cyclic phosphate at 4'-position of lipid A moiety prevented glycosylation of 6'-hydroxy group with Kdo, this group was planned to be introduced after construction of trisaccharide framework, Kdo-GlcN-GlcN, toward the synthesis of Re-type LPS **1**. In addition, *p*-(trifluoromethyl)benzyl group, which was newly developed as an oxidation-resistant benzyl-type protecting group(9), was employed for protection of hydroxy group on acyl residues.

Kdo グリコシド **16** が 81% の好収率で得られた。この際 Kdo グリカルは 5% しか副生せず、過剰に用いた Kdo の多くが再利用可能なその加水分解物として回収された。**14** を受容体に用いると、イソプロピリデン保護糖供与体 **15** を用いるグリコシル化の場合にも収率は 83 % へ向上したので (entry 3)、糖受容体に TES エーテルを用いる方法は Kdo のグリコシル化においても一般に有効であることが確認された (16)。

D. Re 型リポ多糖の全合成

Re 型リポ多糖 **1** の全合成に際して鍵となる、効率的な 1) リピド A の合成法と、2) Kdo を用いるグリコシル化法、を開発することができたので、以上の知見をもとにして実際に **1** の合成に取り組むことにした。この合成に向けた予備実験の結果から、4' 位に環状リン酸エステルが存在すると近傍の 6' 位水酸基への Kdo のグリコシル化が全く進行しないことがわかった。そこで我々はこのリン酸基の導入をグリコシル化のあと、すなわち三糖構築後に行うことにした。また、 β -ヒドロキシ酸エステルの保護に用いたベンジル (Bn) 基は酸化されてベンゾイル基になりやすいことも明らかになっていたので、この位置の保護には新たに開発した耐酸化性の *p*-(トリフルオロメチル)ベンジルエーテル (9) を採用することにした。

Fig. 4.

At first, glycosyl trichloroacetimidate **17** prepared from D-glucosamine in 6 steps was reacted with glucosamine derivative **18** by the action of Nafion-TMS (Fig. 4)(33), a solid-supported Lewis acid, to give the disaccharide **19** in 73% yield. After the disaccharide **19** was subjected to successive 3-*O*-acylation and 2'-*N*-acylation, the benzylidene group of **20** was removed and the 6'-hydroxy group was selectively silylated to give **21** ready for glycosylation with Kdo fluoride. According to the successful preliminary experiment (entry 4 in Table I), the disaccharide **21** was treated with 2 eq. of TBS-protected Kdo fluoride **12** in the presence of $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2 eq.) at 0 °C to give the trisaccharide **22**. Only a trace amount of the glycal was produced from **12**. Although a rather larger amount of $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ was required to complete the reaction as compared to the preliminary model experiment (1.5 eq.), the reaction proceeded smoothly within 30 min to give the desired **22** in 89% yield! The stereochemistry in the present glycosylation with the bulkier glycosyl acceptor **21** was completely controlled in an α -selective manner. In terms of the yield and stereoselectivity as well as the resistance toward elimination at 2,3-position, the TBS-protected Kdo fluoride **12** is the most versatile Kdo donor so far known.

4'-*O*-Phosphorylation of **22** proceeded cleanly to provide **23** in 96% yield. After removal of two TBS groups, the 4"-hydroxy group was selectively silylated to afford **24** ready for a second introduction of Kdo.

Glycosylation of trisaccharide **24** with Kdo was next attempted (Fig. 5). Difficulties in this glycosylation had been expected because 5 eq. of TESCl was actually required for triethylsilylation to prepare **24**. In fact, the glycosylation of **24** required a long reaction period over 2 h even with a large excess (4 eq.) of TBS-protected Kdo fluoride **12**, which gave a quite high yield in the above trisaccharide synthesis, probably because of the severe steric demand of the donor **12**. Even under these reaction conditions, the desired tetrasaccharide **26** was obtained only in 26% yield. We soon noticed the low yield came from the cleavage of the TBS protecting groups in **12** and **26** under the Lewis-acidic reaction conditions. Therefore, we then examined the use of less sterically demanding isopropylidene-protected Kdo fluoride **11** which is highly reactive and hence expected to react with **24** smoothly. With this Kdo donor the yield was greatly improved to 75% though most of the excess Kdo **11** used was recovered as the glycal form as expected from the preliminary experiment (Table I).

The remaining steps from the tetrasaccharide **25** to Re-type LPS **1** were 1-*O*-phosphorylation and removal of all the protecting groups. Because glycosyl phosphate functionality is labile under acidic conditions, the 4", 5"-*O*-isopropylidene of **25** was hydrolyzed by TFA prior to 1-*O*-phosphorylation. After removal of 1-*O*-allyl group, the generated hemiacetal functionality was phosphorylated. The reaction proceeded with high

まず D-グルコサミンから 6 段階で導いた 4,6-*O*-ベンジリデン保護糖供与体 **17**、およびアシル基上の水酸基が *p*-(トリフルオロメチル)ベンジル保護された糖受容体 **18**とを固相担持ルイス酸である Nafion-TMS (33) の作用により反応させて二糖 **19** を 73 % の収率で得た(図 4)。ルイス酸として TMSOTf を用いた場合には **19** が 80% の収率で得られることから、固体酸を用いるこの反応は収率がやや低いものの、不溶物を濾去するだけで反応を停止することのできる点で有効である。二糖 **19** に対し、3-*O*-アシル化と 2'-*N*-アシル化を常法により順次行なって **20** へと導いたのちに、ベンジリデン基の酸加水分解と選択的 TES 化を施して Kdo とのグリコシル化に備えた。Kdo-GlcN-GlcN 三糖構造の構築に際しては、予備実験 (表 I、entry 4) の知見を生かして、リピド A 成分 **21** と 2 当量の TBS 保護フッ化 Kdo **12** とを 2 当量の $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ の作用により 0 °C で反応させた。単糖 **14** を糖受容体に用いた場合 (表 I、entry 4) に比べると $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ の量は若干多く必要としたものの、反応は 30 分以内に終了して 89% もの高収率で **22** は得られ、グリカールの生成は痕跡量しか認められなかった。かさ高い糖受容体を用いたこの反応では、望ましくない β -グリコシドの生成は全く認められず、明らかな選択性の向上が観察された。これほどの高収率で Kdo を用いたグリコシル化が進行した例はほかにはなく、立体選択性やグリカールの副生量などの点からも TBS 保護フッ化 Kdo **12** はもっとも有効な Kdo 供与体である。

得られた三糖 **22** の 4' 位水酸基のリン酸エステル化は極めてスムーズに進行して **23** を 96% の高収率で与えた。4",5"-*O*-TBS 基の除去をフッ化水素酸によって行ったのちに、4" 位水酸基のみを選択的に TES 化して二残基めの Kdo の導入に備えた。

三糖 TES エーテル **24** への Kdo 化を図 5 に示す。実は 4" 位水酸基の TES 化には 5 当量の TESCl が必要であったことから、このグリコシル化は困難を伴うことが予想されたが、果たして先のグリコシル化で好結果をもたらした Kdo 供与体 **12** を過剰 (4 当量) に用いても、望む四糖 **26** は 26% という低収率でしか得られなかった。反応性の低い糖受容体を用いたために反応の進行が止まるまでに 2 時間以上かかり、そのために TBS 基などが $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ によって分解を受けてしまうのが低収率の原因であった。反応を速やかに進行させるには Kdo 供与体 **12** に含まれる TBS 基をより小さいものに変えるべきではないか。... 我々は、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ による活性化の際にその多くがグリカールに分解してしまうものの、反応性が高いために反応時間の短縮が期待されるイソプロピリデン保護 Kdo 供与体 **11** をこのグリコシル化に用いることにした。その結果、四糖 **25** の収率は 75% にまで改善された。この反応では β -グリコシド生成物はほとんど検出されなかったが、予想通り用いた **11** のほとんどはグリカールとして回収された。以上のように、グルコサミン二糖 **21** の 6' 位への Kdo 化はうまく制御ができるようになったが、より込み入った位置にある二級水酸基の Kdo 化はまだ満足できるレベルではない。リボ多糖の多様な類縁体を自在に合成するためにはこの問題はかならず解決せねばならないが、本研究の目的である Re 型リボ多糖 **1** の初めての合成に向けては、すでに数段階の反応を残すのみという段階に到達していた。我々はこの問題を残したまま合成の完成へと進んだ。

四糖 **25** から Re 型リボ多糖 **1** へは、1-*O*-リン酸化と保護基の除去を残すのみである。グリコシルリン酸を導入したあとに末端 Kdo 残基のイソプロピリデン基を酸加水分解することは不可能なので、ここでまず最初に TFA と水とを作用させて脱イソプロピリデン化した。**27** のアリルグリコシドを常法によって分解

Fig. 5.

regio- and stereoselectivity(24) to give the 1-*O*-phosphate **29** in 37% yield. Although the phosphorylation proceeded quite cleanly, the product **29** was so unstable that decomposition during silica-gel chromatographic purification was hard to avoid. The recovered decomposition product **28** was reused for the same phosphorylation reaction. The 1-*O*-phosphate **29** was then subjected to hydrogenolysis to give Re-type LPS **1** after liquid-liquid partition column chromatography(7), completing the first total synthesis of **1**. This is the first achievement of the synthesis of LPS actually located in the cell surface of living Gram-negative bacteria. By comparison with spectroscopic and chromatographic behavior, the synthetic specimen was found to be identical with the natural product but with much higher purity than the latter. The impurities in the natural product, which are supposed to be the amphiphilic congeners of **1**, may not be completely removed by the present purification method as noted in the Introduction. In other words, highly pure Re-type LPS **1**

し、生じたヘミアセタールの選択的なリン酸化をテトラベンジルピロリン酸とリチウムアミドによって試みた(24)。反応は位置および立体選択的に進行して1-*O*-リン酸エステル **29** を 37% の収率で与えた。収率が低いのは、いったんはきれいに生成したグリコシルリン酸エステルが精製の過程で分解を受けたためであるが、生じた **28** は再びリン酸化反応に供することが可能であった。ベンジル系保護基を一斉に加水素分解して得た粗製の Re 型リポ多糖 **1** を液-液分配カラムクロマトグラフィー (7) によって精製して、**1** の初めての全合成に成功した。合成品はスペクトルデータとクロマトグラフィー上の挙動が天然抽出物のものと一致したのはもちろんのこと、合成品は天然物よりよりはるかに純度が高いことが明らかになった。天然物に混入しているものはおそらく **1** と構造の類似した両親媒性化合物であるが、現在の精製技術ではこれを完全に取り除くことはできな

can never be available by methods other than our chemical synthesis.

E. Conclusions

The key issues for successful multi-step total synthesis are the optimization of individual reaction conditions and the realization of efficient synthetic pathways. As noted above, the individual reaction conditions have been well established except for Kdo-glycosylation of sterically hindered 4"-hydroxy group of **24**. Several additional new ideas such as the use of an oxidation-resistant benzyl-type protecting group and the application of liquid-liquid partition column chromatography were also important to lead us to achieve the first total synthesis of Re-type LPS. The synthetic strategy, which allowed us to construct a tetrasaccharide framework by sequential glycosylation starting from terminal glucosamine derivative **18**, is not yet fully matured particularly in terms of the number of the total synthetic steps and the total yield. It should be noted the linear synthetic pathway is, however, effective for synthesis of Re-LPS congeners, which lacks terminal Kdo of **1**. In fact we have already synthesized such congeners using the intermediate **23**. By using those congeners, we have started studies on structure-activity relationships of Re-LPS. This synthetic pathway also allowed us to synthesize *Haemophilus Influenzae* lipopolysaccharide(34), whose chemical properties had not been well explored just because the naturally occurring LPS could not be sufficiently purified. NMR analysis of **1** for conformational study is currently underway also by using a synthetic highly pure specimen.

The present achievement described here allows us to move to the next functional study of LPS, which ultimately aims for clarification of the interaction between bacteria and higher animals at a molecular level.

Acknowledgements

We are grateful to Drs. Y. Suda and K. Fukase for their invaluable discussion and collaboration throughout this achievement, which includes the thesis work of Dr. H. Yoshizaki and results of many other members of the laboratory of Prof. Kusumoto. Their names can be seen in the reference.

References

1. Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahring, U., Seydel, U., Dipadova, F., Schreier, M., and Brade, H. (1994) *Faseb J.* **8**, 217–225; Rietschel, E.T. and Brade, H. (1992) *Sci. Am.* **267**, 54–61
2. Imoto, M., Kusumoto, S., Shiba, T., Naoki, H., Iwashita, T., Rietschel, E.T., Wollenweber, H.W., Galanos, C., and Luderitz, O. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**, 4017–4020; Kusumoto, S. (1992) in *Bact. Endotoxic Lipopolysaccharides* (Morrison, D.C., and Ryan, J.L., eds) Vol. 1, pp. 81–105, CRC, Boca Raton; Kusumoto, S., Fukase, K., and Oikawa, M. (1999) in *Endotoxin in Health and Disease* (Brade, H., Opal, S.M., Vogel, S.N., and Morrison, D.C., eds), pp. 243–256, Marcel Dekker, New York; Kusumoto, S., Fukase, K., Suda, Y., and Oikawa, M. (1996) *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **54**, 976–987
3. Imoto, M., Yoshimura, H., Sakaguchi, N., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1985) *Tetrahedron Lett.* **26**, 1545–1548
4. Imoto, M., Yoshimura, H., Shimamoto, T., Sakaguchi, N., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1987) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2205–2214
5. Fukase, K., Oikawa, M., Suda, Y., Liu, W.-C., Fukase, Y., Shintaku, T., Sekljic, H., Yoshizaki, H., and Kusumoto, S. (1999) *J. Endotoxin Res.*

い。言い換えれば我々の合成品ほど純度の高い Re 型リポ多糖は天然抽出物から調製することはできないのである。

E. おわりに

多段階合成を完成に導くのは、個々の反応の最適化と合成経路の効率化である。上にも述べたとおり、立体障害の大きな Kdo の 4" 位への Kdo 化を除けば、個々の反応の最適化は終了したと考えている。4 種の糖を順次縮合してゆく合成経路は、段階数や全収率の面から言うとも必ずしも有利ではないが、我々はベンジル型保護基の改良やリポ多糖の大量精製を可能にする液-液分配カラムクロマトグラフィー法の開発などによって、このリポ多糖の初めての合成を完成することができた。この直線的な合成経路は糖の数の異なる類縁体の合成には有効で、実際に我々は Re 型リポ多糖 **1** の末端 Kdo を欠いた類縁体などの合成を **23** を用いて行うことにも成功している。これらの類縁体を用いることによってリポ多糖の構造-活性相関に関する知見がすでにいくつか得られており、最近では *H. influenzae* 菌のリポ多糖 (34) の合成にも成功してその構造化学的な性質を明らかにした。また、NMR を用いた合成リポ多糖の会合性の解析に関してもデータが得られつつある。

高度に純粋なリポ多糖とその類縁体は、リポ多糖の構造-活性相関研究やその機能研究のために待ち望まれていたものである。我々は本稿で紹介した合成経路に更に改良を加えてリポ多糖の標識体の合成にも発展させ、高等動物の免疫系による認識の解析も分子レベルで進めていきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたっては隅田泰生助教授、深瀬浩一助教授に多くの助言と協力を頂いた。本研究は大阪大学大学院理学研究科楠本研究室の多くの学生諸氏の研究成果であり、直接的には吉崎弘明博士の学位論文 (平成 12 年度) の内容をまとめたものである。関係の方々にここで深くお礼を申し上げる。

- 5, 46–51; Oikawa, M., Furuta, H., Suda, Y., and Kusumoto, S. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 5199–5202; Oikawa, M., Shintaku, T., Sekljic, H., Fukase, K., and Kusumoto, S. (1999) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **72**, 1857–1867; Fukase, K., Kinoshita, I., Suda, Y., Aoki, Y., Liu, W.-C., Oikawa, M., Kurosawa, M., Zahringer, U., Seydel, U., Rietschel, E.T., and Kusumoto, S. (1996) *Synlett*, 252–254; Fukase, K., Liu, W.-C., Suda, Y., Oikawa, M., Wada, A., Mori, S., Ulmer, A.J., Rietschel, E.T., and Kusumoto, S. (1995) *Tetrahedron Lett.* **36**, 7455–7458; Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1984) *Tetrahedron Lett.* **25**, 2667–2670; Imoto, M., Yoshimura, H., Yamamoto, M., Shimamoto, T., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1987) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 2197–2204; Kusumoto, S. and Oikawa, M. (2001) in *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I-III* (Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., and Thiem, J., eds), pp. 2107–2148, Springer, Heidelberg
6. Liu, W.-C., Oikawa, M., Fukase, K., Suda, Y., Winarno, H., Mori, S., Hashimoto, M., and Kusumoto, S. (1997) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **70**, 1441–1450
7. Oikawa, M., Wada, A., Yoshizaki, H., Fukase, K., and Kusumoto, S. (1997) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **70**, 1435–1440
8. Liu, W.-C., Oikawa, M., Fukase, K., Suda, Y., and Kusumoto, S. (1999) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **72**, 1377–1385; Fukase, K., Fukase, Y., Oikawa, M., Liu, W.-C., Suda, Y., and Kusumoto, S. (1998) *Tetrahedron* **54**, 4033–4050
9. Sakai, Y., Oikawa, M., Yoshizaki, H., Ogawa, T., Suda, Y., Fukase, K., and Kusumoto, S. (2000) *Tetrahedron Lett.* **41**, 6843–6847
10. Kosma, P., Bahnmueller, R., Schulz, G., and Brade, H. (1990) *Carbohydr. Res.* **208**, 37–50
11. For studies related to the synthesis of lipid A reported by other laboratories, see: Ishida, H., Fujishima, Y., Ogawa, Y., Kumazawa, Y., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1790–1792; Kusama, T., Soga, T., Ono, Y., Kumazawa, E., Shioya, E., Osada, Y., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1994–1999; Kusama, T., Soga, T., Shioya, E., Nakayama, K., Nakajima, H., Osada, Y., Ono, Y., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1990) *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3366–3372; Bridges, A.J. (1995) *Chemtracts: Org. Chem.* **8**, 260–268; Bulusu, M., Hildebrandt, J., Lam, C., Liehl, E., Loibner, H., Macher, I., Scholz, D., Schutze, E., Stutz, P., Vyplel, H., and Unger, F. (1994) *Pure Appl. Chem.* **66**, 2171–2174; Bulusu, M.A.R.C., Waldstaetten, P., Hildebrandt, J., Schutze, E., and Schulz, G. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 3463–3469; Griffiths, S.L., Madsen, R., and Fraser-Reid, B. (1997) *J. Org. Chem.* **62**, 3654–3658; Ikeda, K., Asahara, T., and Achiwa, K. (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1879–1881; Ikeda, K., Miyajima, K., and Achiwa, K. (1996) *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 1958–1961; Johnson, D.A., Keegan, D.S., Sowell, C.G., Livesay, M.T., Johnson, C.L., Taubner, L.M., Harris, A., Myers, K.R., Thompson, J.D., Gustafson, G.L., Rhodes, M.J., Ulrich, J.T., Ward, J.R., Yorgensen, Y.M., Cantrell, J.L., and Brookshire, V.G. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 4640–4649; Johnson, D.A., Sowell, C.G., Johnson, C.L., Livesay, M.T., Keegan, D.S., Rhodes, M.J., Ulrich, J.T., Ward, J.R., Cantrell, J.L., and Brookshire, V.G. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2273–2278; Kiyajima, K., Ikeda, K., and Achiwa, K. (1996) *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 2268–2273; Kusama, T., Soga, T., Ono, Y., Kumazawa, E., Shioya, E., Nakayama, K., Uoto, K., and Osada, Y. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 3244–3253; Miyajima, K. and Achiwa, K. (1997) *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 312–320; Miyajima, K., Gomi, N., Ikeda, K., and Achiwa, K. (1997) *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1089–1093; Miyajima, K., Nekado, T., Ikeda, K., and Achiwa, K. (1997) *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1544–1546; Nakayama, K., Higashi, K., Soga, T., Uoto, K., and Kusama, T. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2909–2912; Ogawa, Y., Wakida, M., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1993) *Carbohydr. Res.* **242**, 303–309; Ogawa, Y., Wakida, M., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1994) *J. Carbohydr. Chem.* **13**, 433–446; Sano, T., Ikeda, K., and Achiwa, K. (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1465–1468; Scholz, D., Bednarik, K., Ehn, G., Neruda, W., Janzek, E., Loibner, H., Briner, K., and Vasella, A. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 2070–2074; Shiozaki, M., Arai, M., Macindoe, W.M., Mochizuki, T., Wakabayashi, T., Kurakata, S., Tatsuta, T., Maeda, H., and Nishijima, M. (1997) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **70**, 1149–1161; Suhara, Y., Arakawa, M., Ikeda, K., and Achiwa, K. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 2526–2531; Vyplel, H., Scholz, D., Loibner, H., Kern, M., Bednarik, K., and Schaller, H. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 1261–1264; Eustache, J., Grob, A., and Retscher, H. (1994) *Carbohydr. Res.* **251**, 251–267
12. Paulsen, H. and Hoffgen, E.C. (1993) *Liebigs Ann. Chem.*, 531–541
13. Rembold, H. and Schmidt, R.R. (1993) *Carbohydr. Res.* **246**, 137–159
14. Christ, W.J., McGuinness, P.D., Asano, O., Wang, Y., Mullarkey, M.A., Perez, M., Hawkins, L.D., Blythe, T.A., Dubuc, G.R., and Robidoux, A.L. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3637–3638
15. Suda, Y., Aoyama, K., Arimoto, K., Tamura, T., and Kusumoto, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 327–332; Suda, Y., Shiyama, T., Yasukochi, T., Kawano, K., Brade, H., Rietschel, E.T., and Kusumoto, S. (1996) *J. Endotoxin Res.* **3**, 1–7; Rietschel, E.T., Brade, L., Lindner, B., and Zahringer, U. (1992) in *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides: Molecular Biochemistry and Cellular Biology* (Morrison, D.C., and Ryan, J.L., eds), pp. 3–41, CRC Press, Boca Raton
16. Fukase, K., Kurosawa, M., and Kusumoto, S. (1994) *J. Endotoxin Res.* **1**, 149–163; Kusumoto, S., Kusunose, N., Kamikawa, T., and Shiba, T. (1988) *Tetrahedron Lett.* **29**, 6325–6326
17. Zahringer, U., Lindner, B., Seydel, U., Rietschel, E.T., Naoki, H., Unger, F.M., Imoto, M., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1985) *Tetrahedron Lett.* **26**, 6321–6324; Tanamoto, K. and Homma, J.Y. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 741–746; Tanamoto, K., Abe, C., Homma, J.Y., and Kojima, Y. (1979) *Eur. J. Biochem.* **97**, 623–629; Cavaillon, J.-M. and Haeflner-Cavaillon, N. (1992) in *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides: Molecular Biochemistry and Cellular Biology* (Morrison, D.C., and Ryan, J.L., eds), pp. 205–224, CRC Press, Boca Raton
18. Yoshizaki, H., Fukuda, N., Sato, K., Oikawa, M., Fukase, K., Suda, Y., and Kusumoto, S. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 1475–1480
19. Oikawa, M., Liu, W.-C., Nakai, Y., Koshida, S., Fukase, K., and Kusumoto, S. (1996) *Synlett*, 1179–1180
20. Windholz, T.B. and Johnston, D.B.R. (1967) *Tetrahedron Lett.* **8**, 2555–2557
21. For the preparation of optically active β -hydroxy fatty acid, see: Oikawa, M. and Kusumoto, S. (1995) *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 961–966; Jadhav, P.K. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 4763–4766; Keegan, D.S., Hagen, S.R., and Johnson, D.A. (1996) *Tetrahedron: Asymmetry* **7**, 3559–3564; Kiso, M., Tanaka, S., Fujita, M., Fujishima, Y., Ogawa, Y., Ishida, H., and Hasegawa, A. (1987) *Carbohydr. Res.* **162**, 127–140; Matsuyama, K. and Ikunaka, M. (1999) *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 2945–2950; Sugai, T., Ritzen, H., and Wong, C.H. (1993) *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, 1051–1058; Tai, A., Nakahata, M., Harada, T., Izumi, Y., Kusumoto, S., Inage, M., and Shiba, T. (1980) *Chem. Lett.*, 1125–1126
22. Watanabe, Y., Komoda, Y., Ebisuya, K., and Ozaki, S. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 255–256
23. Oltyoort, J.J., van Boeckel, C.A.A., de Koning, J.H., and van Boom, J.H. (1981) *Synthesis*, 305–308
24. Inage, M., Chaki, H., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1982) *Chem. Lett.*, 1281–1284
25. Imoto, M., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 6235–6238; Vanderklein, P.A.M., Boons, G., Veeneman, G.H., Vandermael, G.A., and Vanboom, J.H. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 5477–5480
26. For mercuriocyclusation approach to a Kdo glycoside, see: Paquet, F. and Sinay, P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 8313–8315

27. For glycosylation with Kdo bromides, see: Dsouza, F.W., Kosma, P., and Brade, H. (1994) Carbohydr. Res. **262**, 223–244; Kiso, M., Fujita, M., Tanahashi, M., Fujishima, Y., Ogawa, Y., Hasegawa, A., and Unger, F.M. (1988) Carbohydr. Res. **177**, 51–67; Paulsen, H., Wulff, A., and Brenken, M. (1991) Liebigs Ann. Chem., 1127–1145
28. For glycosylation with Kdo alkoxides, see: Esswein, A., Rembold, H., and Schmidt, R.R. (1990) Carbohydr. Res. **200**, 287–305
29. Imoto, M., Kusunose, N., Matsuura, Y., Kusumoto, S., and Shiba, T. (1987) Tetrahedron Lett. **28**, 6277–6280
30. Vanderklein, P.A.M., Filemon, W., Boons, G., Veeneman, G.H., Vandermarel, G.A., and Vanboom, J.H. (1992) Tetrahedron **48**, 4649–4658
31. Nicolaou, K.C., Chucholowski, A., Dolle, R.E., and Randall, J.L. (1984) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1155–1156
32. Kunz, H. and Sager, W. (1985) Helv. Chim. Acta **68**, 283–287
33. Haunert, F., Bolli, M.H., Hinzen, B., and Ley, S.V. (1998) J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2235–2237; Olah, G.A., Iyer, P.S., and Prakash, G.K.S. (1986) Synthesis, 513–531; Demuth, M., Mikhail, G., and George, M.V. (1981) Helv. Chim. Acta **64**, 2759–2765
34. Helander, I.M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, A.A., Rietschel, E.T., and Zahring, U. (1988) Eur. J. Biochem. **177**, 483–492

Received on March 5, 2002, accepted on March 18, 2002

Profile of the Author

Masato Oikawa was born in Sapporo in 1965. He was educated in synthetic organic chemistry, and received his degrees of Bachelor of Science (1988) and Doctor of Agriculture (1994) from Hokkaido University. After working in Nippon Soda Co from 1990 to 1994 as a research scientist, he moved to the Department of Chemistry, Graduate School of Science at Osaka University where he has been a research associate since 1994. From 2001 to 2002, he joined Harvard University (Prof. Schreiber) and learned diversity-oriented organic synthesis for a library-realization chemistry.