

Fluoreszierende, wasserlösliche Taxolderivate**

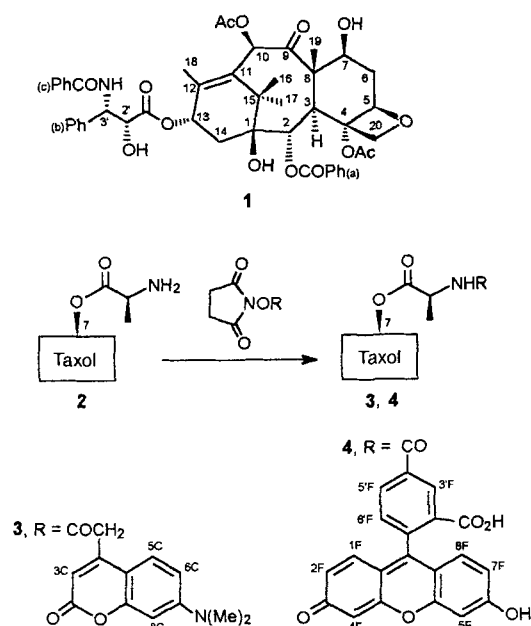
André A. Souto, A. Ulises Acuña, José M. Andreu, Isabel Barasoain, Miguel Abal und Francisco Amat-Guerri*

Paclitaxel (Taxol 1), ein natürliches Diterpenoid aus der Rinde der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*^[1], ist eines der erfolgversprechendsten Mittel gegen eine Vielzahl von Tumoren^[2], da es die ungewöhnliche Fähigkeit hat, die Zellteilung und andere Interphasenprozesse durch Stabilisierung der Mikrotubuli zu inhibieren^[3]. Dies hat in vielen Laboratorien eine intensive Beschäftigung mit der Chemie und Biochemie dieses aufregenden Antitumormittels ausgelöst. Inzwischen sind Berichte über die Totalsynthese von Taxol^[4], seine chemische Modifizierung und seine Struktur^[5] sowie über die Suche nach neuen Taxoiden mit besseren pharmakologischen Eigenschaften^[6] erschienen. Die Erforschung des biologischen Wirkprinzips von Taxol ist auch zur Entwicklung praktikabler Therapien mit diesem Wirkstoff von Bedeutung^[7]. Wir haben die Strukturen taxoidinduzierter Mikrotubuli in Lösung mit geringer Auflösung^[8], das Zusammenlagern von gereinigtem GDP-Tubulin in Gegenwart von Taxoiden und den Zusammenhang zwischen Taxoidbindung und Mikrotubulus-Bildung^[9] beschrieben. Bei diesen Untersuchungen erkannten wir, daß es eine sehr große Hilfe wäre, über ein fluoreszierendes und wasserlösliches Taxolderivat zu verfügen, denn a) würde es die direkte In-vivo-Untersuchung der Ziel-Mikrotubuli in Tumorzellkulturen durch Fluoreszenz-Mikroskopie ermöglichen und b) wäre es ein äußerst nützliches Instrument zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der taxoidinduzierten Mikrotubulus-Bildung, zum Auffinden anderer mutmaßlicher Taxol-Angriffsziele und für klinische Diagnosen.

Die Synthese fluoreszierender Taxolanaloga wurde mit mäßigem Erfolg schon früher versucht. So erwähnt Kingston ein fluoreszierendes Taxolderivat mit einer schwach absorbierenden Dansylgruppe, die über einen β -Alanylaminos-Spacer an die 7-Position gebunden ist^[5a]; allerdings muß die Bioaktivität dieser Verbindung noch gezeigt werden. Ein anderes emittierendes Taxoid mit einer *meta*-Aminogruppe am 2-Benzoylsubstituenten, das jedoch weniger aktiv ist als der ursprüngliche Wirkstoff, wurde ebenfalls kurz beschrieben^[10]. Ein wenig verwandt mit unserem Vorhaben ist die Synthese von photoaktivierbaren Taxoiden mit einem Azido-Substituenten an der 3'-Benzoylaminogruppe^[11], die sich als Photoaffinitätsmarkierungen zum Identifizieren der Taxoid-Bindungsstelle in Tubulin eignen.

Wir berichten nun über die Synthese und Charakterisierung von zwei neuen, bioaktiven, fluoreszierenden Taxolderivaten, von denen das eine deutlich besser wasserlöslich ist als Taxol selbst, und stellen als Beispiel für ihre Anwendung die erste direkte Visualisierung des Taxol-Mikrotubulus-Systems in Zellkulturen vor. Da sich herausgestellt hat, daß die biologische Aktivität von Taxol durch Modifizierung der 7-Hydroxygruppe

nicht merklich beeinflusst wird^[5b, c, 12], haben wir diese Position ausgewählt, um über einen Spacer mit einer freien Aminogruppe zwei Fluoreszenzfarbstoffreste anzubinden. Die Synthese des Esters 2, in dem L-Alanin an die 7-Hydroxygruppe von Taxol



gebunden ist, wurde bereits von Mathew et al. bei der Suche nach wasserlöslichen Taxoiden beschrieben^[13]. Ausgehend von Taxol 1 besteht diese Synthese aus drei Schritten: 1) Veresterung der 7- und 2'-OH-Gruppen des Taxolmoleküls mit der N-geschützten Aminosäure *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-alanin (BOC-Alanin), wobei 2',7-Di(BOC-L-alanyl)taxol entsteht; 2) Entschützen beider Aminogruppen mit Ameisensäure, was 2',7-Di(L-alanyl)taxol ergibt; 3) selektive wäßrige Hydrolyse der 2'-Estergruppe, was schließlich zu 7-(L-Alanyl)taxol 2 führt^[14]. Aminosäureester von Taxol mit ungeschützter NH₂-Gruppe sind schwierig zu reinigen, weil sie sich während der Aufarbeitung durch Epimerisierung und Seitenkettenspaltung leicht zersetzen^[13]. Es zeigte sich jedoch, daß das Rohprodukt 2 leicht über die freie Aminogruppe mit aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen, wie den Succinimidyestern von 7-Dimethylaminocoumarin-4-essigsäure^[15] oder 4'-Fluoresceincarbonensäure, reagieren kann, wobei die entsprechenden Verbindungen 3 bzw. 4 in guten Ausbeuten entstehen. Die richtige Wahl des Lösungsmittels für diese Reaktion ist besonders im Fall der Verbindung 4 schwierig. Die Strukturen der Verbindungen wurden durch Positiv-Ionen-FAB-Massenspektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt^[16]. Die Fluorophore wurden ausgewählt, weil ihre spektroskopischen und photophysikalischen Eigenschaften für unsere Vorhaben optimal sind: große Absorptionskoeffizienten bei Wellenlängen, die sich gut von denen der Eigenabsorption des Proteins unterscheiden und zu verfügbaren Laser-Anregungsquellen passen, sowie große Emissionsausbeute und Anisotropie. Die hier beschriebene Synthesemethode ist allgemein für die Einführung von Fluorophoren in das Taxolmolekül geeignet, und sie kann zum Herstellen einer Familie von neuen fluoreszierenden Taxolderivaten genutzt werden.

Die klinische Anwendung von Taxol ist durch dessen geringe Löslichkeit in Wasser (5 μ M)^[17] begrenzt, und es ist daher nicht überraschend, daß große Anstrengungen zur Synthese von löslichen Taxolderivaten unternommen werden. Durch häufig über

[*] Dr. F. Amat-Guerri, A. A. Souto
Instituto de Química Orgánica, C.S.I.C.
Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid (Spanien)
Telefax: Int. +1/5644853

Dr. A. U. Acuña
Instituto de Química Física Rocasolano, C.S.I.C., Madrid
Dr. J. M. Andreu, Dr. I. Barasoain, M. Abal
Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C., Madrid

[**] Diese Arbeit wurde von der spanischen Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Projekte PB93-0126 und PB92-0007) und der Acción Especial C.S.I.C. gefördert. Das Taxol wurde von Bristol-Myers Squibb zur Verfügung gestellt. A. A. S. dankt für ein Stipendium vom CNPq (Brasilien). Wir danken J. Evangelio für die HPLC-Analyse.

Spacer an die 2'- und/oder 7-Hydroxygruppe gebundene polare oder ionische Substituenten^[18] wurden Wasserlöslichkeiten bis $0.01 \text{ M}^{[18c-e]}$ und, im Fall eines Derivats mit einer 7-Polyethylenglycolkette, von $0.1 \text{ M}^{[18f]}$ erhalten. Jedoch war in vielen Fällen die biologische Aktivität dieser Wirkstoffe im Test an ganzen Zellen gegenüber der Ausgangsverbindung **1** stark vermindert. Von den hier beschriebenen fluoreszierenden Derivaten **3** und **4** ist **3** mit ca. $1 \mu\text{M}$ in Wasser zwar weniger löslich als Taxol, doch **4** ist ca. zwei Größenordnungen besser löslich (0.3 mM).

Die biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von **4** werden im folgenden mit denen von Taxol verglichen. Erste Ergebnisse deuten an, daß **4** im wesentlichen die gleiche Aktivität wie **1** hat und daß es das Zusammenlagern von sonst inaktivem GDP-Tubulin zu Mikrotubuli induzieren kann, was das besondere Charakteristikum aktiver Taxoide ist^[9]. Wird diese Untersuchung mit PtK2-Epithelzellkulturen durchgeführt, ist das System der Mikrotubuli ganz einfach unter dem Fluoreszenz-Mikroskop zu sehen (Abb. 1).

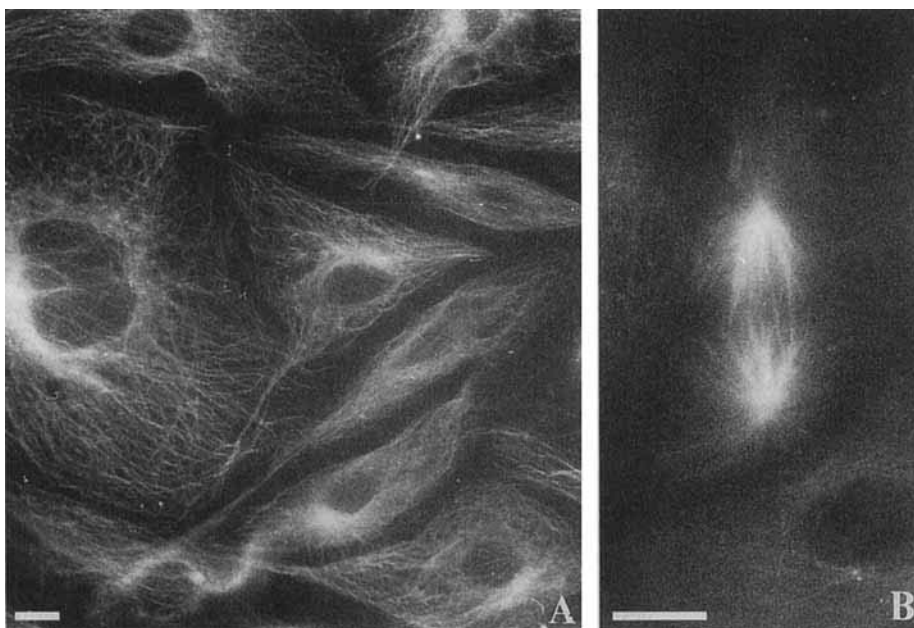


Abb. 1. Visualisierung der Mikrotubuli in PtK2-Epithelzellkulturen mit dem fluoreszierenden Taxolderivat **4** [19]. A) Eine typische Ansicht von Interphasen-Zellen. B) Vergrößerung einer leuchtenden Mitosespindel in einer sich teilenden Zelle. Die Balkenlänge entspricht jeweils $10 \mu\text{m}$.

Experimentelles

3: Zu einer Lösung von rohem **2** (10 mg , 10.8 mmol) und Et_3N ($15 \mu\text{L}$, $108 \mu\text{mol}$) in Dioxan (1 mL) wurde eine Lösung von Succinimidyl-7-dimethylaminocumarin-4-acetat (5.6 mg , $16.2 \mu\text{mol}$) in Dioxan (0.5 mL) gegeben. Das Gemisch wurde 24 h unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt **3** wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (Kieselgel, Essigester/Dichlormethan $1/1$). Ausbeute: 9.5 mg (77%); Schmp. $182\text{--}185^\circ\text{C}$, HPLC-Reinheit $>96\%$ (C-4-Säule, $20\text{--}80\%$ Acetonitril in Wasser als Elutionsmittel). – FAB⁺-MS (*m*-NBA): m/z : 1176.50 ($M + \text{Na}^+$), 1154.50 (MH^+); berechnet für $\text{C}_{63}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_{18}$: 1153.44 ; UV/Vis (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 376 nm (20200); Emission (Anregung bei 376 nm): λ_{max} = 462 nm . ¹H-NMR (500 MHz , CDCl_3 , 30°C , TMS): δ = 8.10 (d, J = 7.3 Hz , 2H, *o*-H von Ph(a)), 7.75 (d, J = 7.3 Hz , 2H, *o*-H von Ph(c)), 7.61 (t, J = 7.5 Hz , 1H, *p*-H von Ph(a)), 7.50 (m, 6H, H-5C, *m*-H von Ph(a), *o*-H von Ph(b), *p*-H von Ph(c)), 7.41 (m, 4H, *m*-H von Ph(b), *m*-H von Ph(c)), 7.35 (t, J = 7.3 Hz , 1H, *p*-H von Ph(b)), 6.98 (d, J = 9.0 Hz , 1H, 3'-NH), 6.67 (d, J = 8.9 Hz , 1H, NH von Ala), 6.59 (dd, J = 2.4 , 8.9 Hz , 1H, H-6C), 6.48 (d, J = 2.4 Hz , 1H, H-8C), 6.17 (t, J = 8.5 Hz , 1H, H-13), 6.12 (s, 1H, H-3C), 6.09 (s, 1H, H-10), 5.78 (dd, J = 2.4 , 9.0 Hz , 1H, H-3'), 5.65 (d, J = 6.7 Hz , 1H, H-2), 5.60 (dd, J = 7.3 , 10.4 Hz , 1H, H-7), 4.89 (d, J = 8.9 Hz , 1H, H-5), 4.78 (dd, J = 2.4 , 5.1 Hz , 1H, H-2'), 4.68 (m, 1H, CH von Ala), 4.30 (d, J = 8.3 Hz , 1H, H-20 α), 4.16 (d, J = 8.3 Hz , 1H, H-20 β), 3.88 (d, J = 6.7 Hz , 1H, H-3), 3.65 (s, 2H, CH_2CONH), 3.56 (d, J = 5.1 Hz ,

1H, 2'-OH), 3.03 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.47 (m, 1H, H-6 α), 2.36 (s, 3H, 4- CH_3CO), 2.32 (m, 2H, H-14), 2.10 (s, 3H, 10- CH_3CO), 1.84 (m, 1H, H-6 β), 1.79 (s, 3H, H-18), 1.76 (s, 3H, H-19), 1.73 (s, 1H, 1-OH), 1.19 (s, 3H, H-17), 1.13 (überlappendes d, 3H, CH_3 von Ala), 1.12 (s, 3H, H-16).

4: Zu einer Lösung von rohem **2** (10 mg , 10.8 mmol) in DMF (1 mL) und wäßrigem Carbonat/Bicarbonat-Puffer ($\text{pH } 9$, 1 mL) wurde eine Lösung von Succinimidyl-fluorescein-4'-carboxylat (7.7 mg , 16.2 mmol) im selben Lösungsmittelgemisch (1 mL) gegeben. Das Gemisch wurde 2 h gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt **4** durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (Kieselgel, Essigester/Dichlormethan $1/4$). Ausbeute: 8.0 mg (60%); Schmp. $>300^\circ\text{C}$, HPLC-Reinheit $>92\%$ (C-18-Säule, $20\text{--}80\%$ Acetonitril in Wasser als Elutionsmittel). – FAB⁺-MS (*m*-NBA): m/z : 1305.50 ($M + \text{Na}^+$), 1283.50 (MH^+); berechnet für $\text{C}_{71}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{21}$: 1282.42 ; UV/Vis: in Wasser: λ_{max} = 494 nm ; in basischem MeOH: λ_{max} (ϵ) = 499 nm (70000); Emission (in Wasser, Anregung bei 494 nm): λ_{max} = 520 nm ; ¹H-NMR (500 MHz , D_2O , 40°C , Standard: $\delta(\text{H}_2\text{O})$ = 4.61): δ = 8.20 (s, 1H, H-3'F), 8.00 (d, J = 8.0 Hz , 3H, *o*-H von Ph(a), H-5'F), 7.81 (d, J = 7.9 Hz , 2H, *o*-H von Ph(c)), 7.68 (t, J = 8.0 Hz , 1H, *p*-H von Ph(a)), 7.63 (t, J = 7.9 Hz , 1H, *p*-H von Ph(c)), 7.58 (t, J = 8.0 Hz , 2H, *m*-H von Ph(a)), 7.54 (t, J = 7.9 Hz , 2H, *m*-H von Ph(c)), 7.50 (überlappendes d, 2H, H-1F, H-8F), 7.49 (s, 2H, H-4F, H-5F), 7.31 (m, 1H, *p*-H von Ph(b)), 7.13 (m, 2H, *m*-H von Ph(b)), 6.69 (d, J = 8.0 Hz , 4H, H-2F, H-7F, *o*-H von Ph(b)), 6.62 (d, J = 8.4 Hz , 1H, H-10), 6.10 (t, J = 9.0 Hz , 1H, H-13), 5.64 (d, J = 7.7 Hz , 1H, H-2), 5.52 (m, 1H, H-7), 5.46 (d, J = 7.1 Hz , 1H, H-3'), 5.04 (m, 1H, H-5), 4.85 (d, J = 7.1 Hz , 1H, H-2'), 4.73 (q, J = 7.5 Hz , 1H, CH von Ala), 4.24 (m, 2H, H-20), 3.79 (d, J = 7.7 Hz , 1H, H-3), 2.64 (m, 1H, H-6 α), 2.29 (s, 3H, 4- CH_3CO), 2.19 (s, 3H, 10- CH_3CO), 1.91 (m, 2H, H-6 β , H-14 α), 1.86 (s, 3H, H-19), 1.78 (s, 3H, H-18), 1.74 (m, 1H, H-14 β), 1.45 (d, J = 7.5 Hz , 3H, CH_3 von Ala), 1.16 (s, 6H, H-16, H-17).

Eingegangen am 18. Juli 1995 [Z 8224]

Stichworte: Antitumormittel · Fluoreszenzmarkierung · Taxol

- [1] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327.
- [2] Neuere Übersichten über die Therapie mit Taxol: a) K. Gelmon, *The Lancet* **1994**, *344*, 1267–1272; b) E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, *New Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1004–1014.
- [3] a) P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature* **1979**, *277*, 665–667; b) P. B. Schiff, S. B. Horwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1561–1565.
- [4] Die Totalsynthese von Taxol wurde unabhängig voneinander von den Arbeitsgruppen von Nicolaou und Holton beschrieben: a) K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Clairborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, E. J. Sorensen, *Nature* **1994**, *367*, 630–634; K. C. Nicolaou, P. G. Nantermet, H. Ueno, R. K. Guy, E. A. Couladouros, E. J. Sorensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 624–633; K. C. Nicolaou, J.-J. Liu, Z. Yang, H. Ueno, E. J. Sorensen, C. F. Clairborne, R. K. Guy, C.-K. Hwang, M. Nakada, P. G. Nantermet, *ibid.* **1995**, *117*, 634–644; K. C. Nicolaou, Z. Yang, J.-J. Liu, P. G. Nantermet, C. F. Clairborne, J. Renaud, R. K. Guy, K. Shibayama, *ibid.* **1995**, *117*, 645–652; K. C. Nicolaou, H. Ueno, J.-J. Liu, P. G. Nantermet, Z. Yang, J. Renaud, K. Paulvannan, R. Chadha, *ibid.* **1995**, *117*, 653–659; siehe auch K. C. Nicolaou, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2247; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2079; b) R. A. Holton, C. Somoza, H.-B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, J. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597–1598; R. A. Holton, H.-B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile, J. H. Liu, *ibid.* **1994**, *116*, 1599–1600. c) Eine kommentierende Diskussion der beiden Syntheseansätze ist: L. Wessjohann, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 959–961; S. B. Horwitz, *Nature* **1994**, *367*, 593–594.
- [5] Ausgewählte Übersichten über die Chemie und Biologie von Taxol sind: a) D. G. I. Kingston, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *52*, 1–34; b) *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 222–227; c) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 38; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 15–44. Zur Konformation von Taxol in einer Reihe organischer Lösungsmittel siehe S. V. Balasubramanian, J. L. Alderfer, R. M. Straubinger, *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1470–1476.

- [6] a) F. Guérrette-Voegelein, D. Guénard, F. Lavelle, M.-T. Le Goff, L. Mangatal, P. Potier, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 992–998; b) C. S. Swindell, N. E. Krauss, S. B. Horwitz, I. Ringel, *ibid.* **1991**, *34*, 1176–1184; c) G. Appendino, H. C. Ozen, P. Gariboldi, B. Gabetta, E. Bombardelli, *Fitoterapia* **1993**, *64*, 47–81; d) A. N. Boa, P. R. Jenkins, N. J. Lawrence, *Contemp. Org. Synth.* **1994**, *1*, 47–75.
- [7] a) W. D. Howard, S. N. Timasheff, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1342–1346; b) S. B. Horwitz, *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 134–136; c) R. B. Dye, S. P. Fink, R. C. Williams, Jr., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6874–6850; d) M. A. Jordan, R. J. Toso, H. Thrower, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9552–9556; e) E. Nogales, S. G. Wolf, I. A. Khan, R. F. Ludueña, K. H. Downing, *Nature* **1995**, *375*, 424–427.
- [8] a) J. M. Andreu, J. Bordsas, J. F. Díaz, J. García de Ancos, R. Gil, F. J. Medrano, E. Nogales, E. Pantos, E. Towns-Andrews, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 169–184; b) J. M. Andreu, J. F. Díaz, R. Gil, J. M. de Pereda, M. García de Lacoba, V. Peyrot, C. Briand, E. Towns-Andrews, J. Bordsas, *J. Biol. Chem.* **1994**, *31785*–31792.
- [9] a) J. F. Díaz, J. M. Andreu, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2747–2755; b) J. F. Díaz, M. Menendez, J. M. Andreu, *ibid.* **1993**, *32*, 10067–10077.
- [10] Y. Han, A. G. Chaudhary, M. D. Chordia, D. L. Sackett, D. G. I. Kingston, S. B. Hastie, *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 284a.
- [11] a) G. I. Georg, T. C. Boge, H. Park, R. H. Himes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 615–620; b) C. Combeau, A. Commerçon, C. Mioskowski, B. Rousseau, F. Aubert, M. Goeldner, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6676–6683; c) S. Rao, N. E. Krauss, J. M. Heerding, C. S. Swindell, I. Ringel, G. A. Orr, S. B. Horwitz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3132–3134; d) C. S. Swindell, J. M. Heerding, N. E. Krauss, S. B. Horwitz, S. Rao, I. Ringel, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1446–1449; e) D. Dasgupta, H. Park, G. C. Harriman, G. I. Georg, R. H. Himes, *ibid.* **1994**, *37*, 2976–2980. Der Ester 7-[(*m*-Azido-*o*-nitro)benzoyl]taxol wurde ebenfalls als Photoaffinitätsanalogon genutzt: J. M. Carboni, V. Farina, S. Rao, S. I. Hauck, S. B. Horwitz, I. Ringel, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 513–515.
- [12] W. Mellado, N. F. Magri, D. G. I. Kingston, R. García Arenas, G. A. Orr, S. B. Horwitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *124*, 329–336.
- [13] A. E. Mathew, M. R. Mejillano, J. P. Nath, R. H. Himes, V. J. Stella, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145–151.
- [14] Unsere Gesamtausbeute an **2** betrug ca. 70%.
- [15] Die direkte Veresterung der 7-Hydroxygruppe in 2'-[(2,2,2-Trichloräthyl)oxycarbonyl]taxol (N. F. Magri, D. G. I. Kingston, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 797–802) mit 7-Dimethylaminocumarin-4-essigsäure gelang unter einer Reihe von experimentellen Bedingungen nicht, wahrscheinlich wegen einer starken sterischen Hinderung, wie Molekülmodelle vermuten lassen.
- [16] ROESY-Experimente zeigten, daß sich in CDCl₃ die Cumarineinheit in Verbindung **3** in der Nähe der Protonen H-3 und H-7 des Taxolteils befinden muß, da nennenswerte NOE-Effekte mit dem Proton H-3C der Cumarineinheit beobachtet wurden. Kreuzpeaks zwischen den Signalen der aromatischen Taxolprotonen wurden nicht gefunden, was die Annahme stützt, daß sich die entsprechenden Ringe nicht nahe kommen (keine Clusterbildung), was in einem unpolaren Lösungsmittel auch zu erwarten war (D. G. Vander Velde, G. I. Georg, G. L. Grunewald, C. W. Gunn, L. A. Mitscher, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11650–11651).
- [17] K. C. Nicolaou, C. Riemer, M. A. Kerr, D. Rideout, W. Wrasidlo, *Nature* **1993**, *364*, 464–466.
- [18] a) H. M. Deutsch, J. A. Glinski, M. Hernandez, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan, M. Suffness, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 788–792; b) Z. Zhao, D. G. I. Kingston, A. R. Crosswell, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1607–1611; c) K. C. Nicolaou, R. K. Guy, E. N. Pitsinos, W. Wrasidlo, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1672; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1583–1587; d) L. G. Paloma, R. K. Guy, W. Wrasidlo, K. C. Nicolaou, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 107–112; e) K. C. Nicolaou, J. Renaud, P. G. Nantermet, E. A. Couladouros, R. K. Guy, W. Wrasidlo, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2409–2420; f) R. B. Greenwald, A. Pendri, D. Bolikal, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 331–336; g) Y. Ueda, J. D. Matiske, A. B. Mikkilineni, V. Farina, J. O. Knipe, W. C. Rose, A. M. Casazza, D. M. Vyas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 247–252.
- [19] Auf Objektträgern gewachsene PtK2-Zellen wurden ca. 12 h mit dem Taxolderivat **4** (1 µM) kultiviert, zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen, ohne Fixierung in einem 0.13 M Glycin-Puffer (pH 8.6, 0.20 M NaCl, 70% Glycerin) aufgezogen und beobachtet. Die Zellen wurden wie bei C. de Inés, D. Leynadier, I. Barasoain, V. Peyrot, P. García, C. Briand, G. A. Renner, C. Temple, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 75–84, beschrieben kultiviert und photographiert.

Herstellung von Oligosaccharid-Bibliotheken durch Zufalls-Glycosylierung**

Osamu Kanie, Frank Barresi, Yili Ding, Jill Labbe, Albin Otter, L. Scott Forsberg, Beat Ernst und Ole Hindsgaul*

Die Anwendung der Kombinatorischen Chemie in der Wirkstoffforschung zur raschen gleichzeitigen Synthese von Verbindungen oder Gemischen aus einer Vielzahl von Verbindungen ist eine neue Herausforderung für die Organische Chemie. Gewaltige Erfolge wurden zunächst bei Oligopeptiden und -nucleotiden sowie deren Analoga, dann aber auch bei kleinen organischen Molekülen erreicht^[1]. Trotz der möglichen Bedeutung^[2] von Oligosaccharid-Bibliotheken sowohl für die Entdeckung von kohlenhydratbindenden Rezeptoren als auch für die Identifizierung von neuen Leitstrukturen (z. B. von Zelladhäsionsinhibitoren) wurde die Herstellung solcher Bibliotheken bislang kaum in Angriff genommen. Dies ist wahrscheinlich auf die erheblichen Schwierigkeiten zurückzuführen, die auftreten würden, wenn man mit den gegenwärtig verfügbaren Glycosylierungs- und Schutzgruppentechniken mehrwertige Monosaccharide zu brauchbaren Oligosaccharidgemischen umsetzen wollte.

Wir berichten hier über erste Resultate, mit einer neuen Strategie zur Zufalls-Glycosylierung Oligosaccharid-Bibliotheken zu erhalten. Das Ziel ist dabei, Produktgemische (typischerweise aus Trisacchariden) herzustellen, in denen jedes der möglichen gewünschten Oligosaccharide vorhanden ist und die ihrerseits durch einen biologischen Test zu bewerten sind. In Abbildung 1 ist die Strategie der Zufalls-Glycosylierung der der klassischen mehrstufigen Synthese^[3] am Beispiel der Herstellung von einer systematischen Reihe von Trisacchariden gegenübergestellt. In diesem hypothetischen Beispiel sollen alle sechs α -fucosylierten β Gal(1 \rightarrow 3) β GlcNAc-OR hergestellt werden. Einige dieser Trisaccharide sind Blutgruppen-Antigene^[2], die mit Antikörpern, Enzymen und Rezeptoren wechselwirken. Die konventionelle, mehrstufige Synthese würde die einzelnen Fucosyl-Trisaccharide liefern: Ausgehend vom ungeschützten Disaccharid-Glycosid-acceptor **1** mit sechs freien OH-Gruppen würden zunächst 12–15 Reaktionsschritte benötigt, um die sechs entsprechend geschützten Acceptoren für die unabhängigen α -Fucosylierungen zu erhalten. Zur anschließenden Entfernung der Schutzgruppen wären für jedes Trisaccharid erneut – je nach Zahl der verwendeten, unterschiedlichen Schutzgruppen – mehrere Stufen erforderlich. Die Schutzgruppenchemie wäre bei jedem weiteren Disaccharid-Acceptor eine andere. So würde die Synthesesequenz zum Anknüpfen der Schutzgruppen erheblich länger, wenn in **1** statt Gal etwa Glc vorläge. Von Nachteil ist auch, daß nach beinahe jeder Stufe in diesem Syntheseansatz eine chromatographische Reinigung erforderlich ist.

Im Unterschied dazu wird bei der Zufalls-Glycosylierung (Abb. 1) das ungeschützte Disaccharid **1** direkt und nur bis zu

* Prof. O. Hindsgaul, O. Kanie, F. Barresi, Y. Ding, J. Labbe, A. Otter
Department of Chemistry, University of Alberta
Edmonton, AB T6G 2G2 (Kanada)
Telefax: Int. + 403/492-7705

L. S. Forsberg
Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia
Athens, GA (USA)

Dr. B. Ernst
Ciba, Central Research Laboratories, Basel (Schweiz)

** Diese Arbeit wurde durch einen Steacie Fellowship Award vom Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada an O. H. ermöglicht und finanziell durch Ciba-Canada unterstützt. Frau Y. Kanie danken wir für ihre Hilfe bei den HPLC-Trennungen.