

freiem **2*** durch eine aus der Äquivalenz der β -Protonen resultierende Triplettsstruktur mit Intensitätsverhältnis 1:2:1 ($a_{H_\beta}^{(2)} = 9.18$ G, weitere HF-Parameter in Tabelle 1) bei $T = 293$ K charakterisiert ist, schränkt Rezeptorzusatz die Beweglichkeit von **2*** schon bei Raumtemperatur ein, so daß die drei auf die β -Protonenkopplungen zurückzuführenden Signalgruppen annähernd gleiche Intensität aufweisen. Mit abnehmender Temperatur werden die mittleren HFS-Komponenten zunehmend breiter, um nach dem Koaleszenzgebiet wieder an Intensität zu gewinnen. Aus Abbildung 5 lassen sich bei $T = 252$ K $a_{H_\beta} = 10.90$ G und $a_{H_\beta} = 8.32$ G (übrige Daten in Tabelle 1) als für den Komplex **A2*** charakteristische Hyperfeinkopplungskonstanten entnehmen. Damit hat diese HFS jetzt Quartett-Charakter. Die für freies **2*** gefundene β -Protonenkopplung ($a_{H_\beta}^{(2)} = 9.18$ G) stellt also noch nicht den Mittelwert beider β -Kopplungen von **A2*** dar. In Abwesenheit von **A** läßt sich für **2*** keine vergleichbare Temperaturabhängigkeit finden, so daß für **2*** die magnetische Inäquivalenz der β -Protonen bei $T < 272$ K eine Konsequenz der Schlüssel-Schloß-Interaktion ist.

Die quantitative Auswertung dieser Molekulardynamik von **A2*** nach Arrhenius über den experimentell zugänglichen Temperaturbereich zwischen 252 K und 333 K unter Annahme eines Two-jump-Mechanismus ergibt eine Aktivierungsenergie von 8.2 kcal mol⁻¹ und $k_{293} = 47$ MHz.

Ein derartiger, in Abbildung 6 dargestellter Two-jump-Mechanismus als Interpretation des beobachteten Temperaturver-

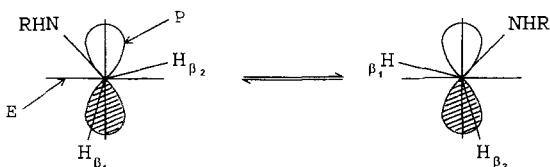


Abb. 6. Schematische Darstellung des Mechanismus des Two-jump-Prozesses. R = Purinyl, E: Ebene der aromatischen Einheit des Phenoxyls. P: p-Orbitaldarstellung senkrecht zu E.

haltens wird in der Literatur^[9, 10] für analoge Systeme mit tertiärem Stickstoffatom auf Hinderung der Rotation um die C_z-C_{Aroxyl}-Bindung sowie eine Stickstoffinversion zurückgeführt, wobei die Größe der gefundenen Aktivierungsenergie hier die Inhibition der Rotation als Erklärung favorisiert. Aroxyle, die mit einer sekundären Aminogruppe am Methylenkohlenstoffatom substituiert sind, zeigen über den gesamten untersuchten Temperaturbereich Äquivalenz der β -Protonen, so daß erst der Schlüssel im Schloß eine hinreichend große Aktivierungsenergie aufweist, die für die Beobachtung der Koaleszenz unter den vorliegenden Bedingungen erforderlich ist.

Experimentelles

Der Rezeptor **A** ist bekannt [5]. **1** wurde durch Addition von Adenin an 3,5-Di-*tert*-butylchinonmethid dargestellt [11]. **2** und **3** wurden durch Kondensation von 4-Brommethyl-2,6-di-*tert*-butylphenol mit Adenin bzw. 2-Aminobenzimidazol erhalten [10]. Alle Verbindungen wurden mit den üblichen Methoden charakterisiert. Die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren erfolgte in CDCl₃ mit einem Bruker-AC-250-Spektrometer (250 MHz).

Die Radikale **1***, **2***, **3*** wurden in CH₂Cl₂ durch Oxidation der entsprechenden Phenole mit PbO₂ generiert, wobei **A** vor oder nach der Radikalherzeugung zugesetzt werden kann. Zur Entfernung des Sauerstoffs wurden die Proben mit Argon gespült. Die Spektren wurden mit einem Bruker-ESP-300 E-Spektrometer, ergänzt durch eine Bruker-ER-810-ENDOR-Einheit, aufgezeichnet. Typische Instrumentenparameter für ENDOR-Untersuchungen waren: MW-Leistung 30 mW; RF-Leistung 7 dB, 500 W; Modulation 70 kHz.

Eingegangen am 11. Dezember 1995.
veränderte Fassung am 19. Februar 1996 [Z 8631]

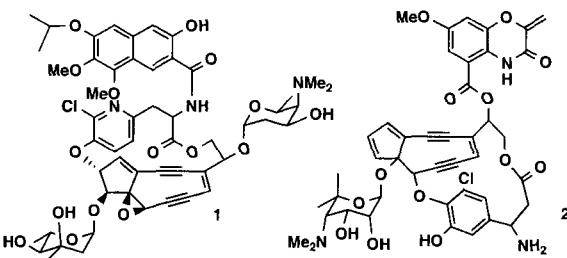
Stichworte: ENDOR-Spektroskopie · Molekulardynamik · Molekulare Erkennung

- [1] Aktuelle und umfassende Darstellung des Themas: J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, 1995.
- [2] J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* 1990, 102, 262; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 245.
- [3] J. Rebek, Jr., B. Askew, M. Killoran, D. Nemeth, F.-T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2426.
- [4] J. Rebek, Jr., D. Nemeth, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 5637.
- [5] J. Rebek, Jr., L. Marshall, R. Wolak, K. Parris, M. Killoran, B. Askew, D. Nemeth, N. Islam, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 7476.
- [6] H.-J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, U. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 6442.
- [7] A. V. Hill, *J. Physiol.* 1910, 40, iv.
- [8] A. Cornish-Bowden, D. E. Koshland, Jr., *J. Mol. Biol.* 1975, 95, 201.
- [9] V. Fischer, W. Bühler, K. Scheffler, *Z. Naturforsch. A* 1983, 38, 570.
- [10] V. Fischer, Dissertation, Universität Tübingen, 1981.
- [11] U. Höfler, Dissertation, Universität Tübingen, 1994.

DNA-Spaltung durch ein neungliedriges maskiertes Endiin, ein Kedaricidin- und C-1027-Chromophor-Analogon**

Takashi Takahashi*, Hiroshi Tanaka, Haruo Yamada, Takuyuki Matsumoto und Yukio Sugiura

Kedaricidin (KD)^[11] und C-1027^[21] gehören zu einer neuen Gruppe von Chromoproteinen mit Antitumor- und antibiotischer Wirkung. Sie bestehen aus einem 1:1-Komplex aus einer Proteinkomponente (Apoprotein) und einem cytotoxischen Chromophor, das keinen Proteincharakter hat. Das zentrale Strukturelement der Chromophore, KD-Chr 1 und C-1027-Chr 2, ist ein neungliedriger Endiin-Ring. Die biologische Aktivität

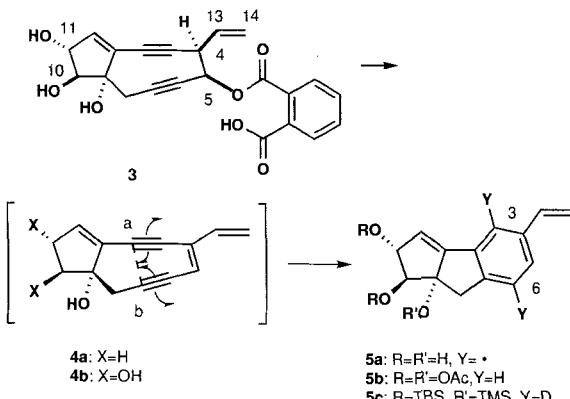


dieser Verbindungen beruht auf der ausgeprägten Fähigkeit, DNA-Strangbrüche auszulösen. Als Mechanismus der DNA-Spaltung wird die Bildung von Diradikal-Molekülspesies aus dem stark gespannten neungliedrigen Endiin vorgeschlagen, die Wasserstoffatome aus der Desoxyribose abstrahieren können^[14, 24]. Im Unterschied zu anderen Endiinen spaltet C-1027 auch in Abwesenheit von Thiolen oder Reduktionsmitteln DNA mit hoher Aktivität; dies ist ein wichtiger Hinweis für die Verwendung der Verbindung als potentes Tumor-Chemotherapeuticum^[13].

[*] Prof. Dr. T. Takahashi, H. Tanaka, Dr. H. Yamada
Tokyo Institute of Technology, Meguro
Tokyo 152 (Japan)
Telefax: Int. + 3/5734-2884
T. Matsumoto, Prof. Dr. Y. Sugiura
Institute for Chemical Research, Kyoto University Uji
Kyoto 611 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur (06240104) unterstützt.

Entwurf und Synthese von DNA-spaltenden Verbindungen sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten^[4, 5]. Wir haben bereits über einen Versuch mit dem Endiin **4a** (Schema 1), einem neungliedrigen Esperamicin-Calicheamicin-Ana-

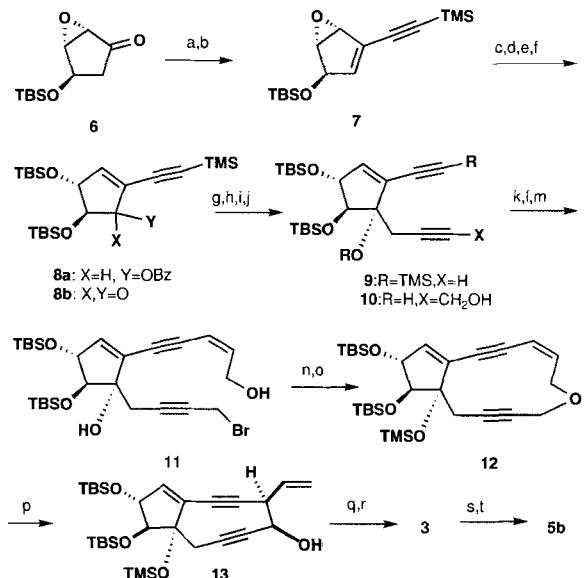


Schema 1. Mechanismus der Diradikalbildung aus 3.

logen, berichtet^[6]. Diese Verbindung verursacht allerdings keine DNA-Strangbrüche, wahrscheinlich, weil sie wasserunlöslich und bei Raumtemperatur recht instabil ist. Hier berichten wir über Entwurf, Synthese und DNA-Spaltungsaktivität des neuen Pro-Endiins **3**, das bei Raumtemperatur hinreichend stabil ist, daher isoliert und leicht gehandhabt werden kann und das auch ohne die Zugabe von Thiolen eine hohe DNA-Spaltungsaktivität aufweist.

Die Verbindung **3** wurde aufgrund der folgenden Überlegungen als potentielle Vorstufe des KD-Chr-Analogons **4b** entworfen: Die 1,5-Diin-Einheit in **3** sollte bei Raumtemperatur stabil genug sein, um **3** zu isolieren und zu handhaben, während der Phthaloylrest die Wasserlöslichkeit verbessern sollte. Die Eliminierung^[7] von Phthalsäure aus **3** in schwach basisch gepufferter Lösung sollte das hochreaktive neungliedrige Endiin **4b** liefern; daraus entsteht, wie MM2-Rechnungen ergaben, bei Raumtemperatur in einer spontanen Bergman-Cyclisierung das Diradikal **5a** (der Abstand zwischen a und b in **4b** beträgt 2.82 Å)^[8]. Ähnlich wie C-1027-Chr sollte also auch das Pro-Endiin **3** DNA ohne die Zugabe von Thiolen oder Reduktionsmitteln spalten. Die *trans*-ständigen Hydroxygruppen an C(10) und C(11) in **3** sollten dessen Wasserlöslichkeit erhöhen und könnten in DNA-Bindungsexperimenten als Anheftungsstelle für ein Element zur Erkennung einer DNA-Sequenz dienen. Die Vinylgruppe an C(4) könnte dazu genutzt werden, die Hydroxygruppen an C(13) und C(14) einzuführen, über die der Endiin-Makrocyclus wie in **1** und **2** zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese angebunden werden kann.

Zur Synthese von **3** wurde eine allgemeine, von uns entwickelte^[6, 9] Methode modifiziert. Ausgangsverbindung war das (\pm)-Epoxyketon **6** (Schema 2). Nach Zugabe von Magnesiumtrimesylsilylacetylid zu **6** (Ausbeute 80%) und Umsetzung des resultierenden Alkohols mit $(CF_3SO_2)_2O$ (Tf_2O) und Lutidin fiel das Enoxid **7** in 70% Ausbeute an^[10]. Durch palladiumkatalysierte Öffnung ($[Pd(OAc)_2]/PPh_3$ in THF) des Epoxidrings^[11] in Gegenwart von Benzoësäure (BzOH) wurde eine 4:1-Mischung aus dem 1,4- und dem 1,2-Addukt in 94% Ausbeute erhalten. Nach HPLC- und NMR-Untersuchung lagen das Hauptprodukt (das 1,4-Addukt) ausschließlich als α -Benzozat und das 1,2-Addukt als Gemisch aus dem α - und dem β -Benzozat im Verhältnis 2:1 vor. Ohne Trennung der Isomere wurde die Mischung in das Enon **8b** überführt. Dazu wurde der aus der Epoxidöffnung resultierende Alkohol mit *tert*-Butyldi-



Schema 2. Synthese von **3** und **5b**. a) $TMS-C\equiv CH$, Tf_2O , Lutidin; b) $Pd(OAc)_2$, PPh_3 , BzOH; d) $TBSCl$, Imidazol; e) $MeLi$; f) PCC ; g) Propargylmagnesiumbromid, $ZnCl_2$; h) $TMSOTf$, NEt_3 ; i) $EtMgBr$, $(CH_2O)_2$; j) K_2CO_3 ; k) $(Z)-3$ -Iod-2-propenyl-*tert*-butyldimethylsilylether, $[Pd(OAc)_2]$, PPh_3 , CuI , $tBuNH_2$; l) CBr_4 , PPh_3 , Lutidin; m) HF_{aq} , CH_3CN ; n) NaH , THF ; o) $TMSOTf$, NEt_3 ; p) $tBuLi$, THF , $-110^\circ C$; q) Phthalsäureanhydrid, Pyridin, DMAP; r) HF_{aq} , CH_3CN , Raumtemperatur; s) DBU , THF , Cyclohexadien; t) Ac_2O , Pyridin, DMAP.

methylsilylchlorid(TBSCl)/Imidazol geschützt, die Benzoatreste von **8a** abgespalten ($MeLi$ in Et_2O ; Ausbeute 83% über 2 Stufen) und der daraus anfallende Alkohol mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) in CH_2Cl_2 zu **8b** oxidiert (Ausbeute 80%). Diese Verbindung wurde unter 1,2-Addition mit Propargylmagnesiumbromid in Gegenwart von $ZnCl_2$ in Et_2O bei $-78^\circ C$ umgesetzt und der Alkohol mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) unter Bildung einer trennbaren Mischung aus dem α -Trimethylsilylether **9** und seinem β -Isomer im Verhältnis 5:1 in 85% Ausbeute geschützt. Die Acetylengruppe wurde bei $0^\circ C$ mit $EtMgBr$ in THF metalliert und dann mit Paraformaldehyd zum Alkohol umgesetzt. Durch Abspaltung der Trimethylsilyl(TMS)-Gruppe mit K_2CO_3 in $MeOH$ wurde das Diol **10** erhalten (97% Ausbeute). Die Synthese des Bromids **11** gelang durch Kupplung von **10** und (Z) -3-Iod-2-propenyl-*tert*-butyldimethylsilylether mit $[Pd(OAc)_2]$ und CuI als Katalysatoren^[12] (97%), Bromierung des entstandenen Propargylalkohols (CBr_4 , PPh_3 , Lutidin/ CH_3CN) und selektive Abspaltung der primären TBS-Gruppe (HF_{aq}/CH_3CN bei $-20^\circ C$) in einer Gesamtausbeute von 57%. Das Bromid **11** wurde in stark verdünnter Lösung cyclisiert ($10^{-2} M$ in THF , NaH , Raumtemperatur) und der tertiäre Alkohol unter Bildung des cyclischen Ethers **12** geschützt (TMSOTf, Et_3N , CH_2Cl_2 ; 77% Ausbeute, zwei Stufen). Die [2,3]-Wittig-Umlagerung^[13] von **12** unter den von uns beschriebenen Bedingungen^[6, 9] ($tBuLi/THF$, $-110^\circ C$) war in 10 min abgeschlossen. Das Umlagerungsprodukt **13** fiel in 65% Ausbeute mit hoher Stereoselektivität für das *cis*-Isomer (90%) an^[14]. Es wurde mit Phthalsäureanhydrid, Pyridin und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) bei Raumtemperatur zum Halbester umgesetzt, der ohne Isolierung unter schwach sauren Bedingungen (40% HF_{aq}/CH_3CN = 5/95, 4 h, Raumtemperatur) zum Halbester **3** desilyliert wurde^[16]. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde **3** in 47% Gesamtausbeute erhalten.

Wie erwartet, war das maskierte Endiin **3** leicht löslich in einer 10proz. Lösung von $MeOH$ in Wasser sowie in neutralem Medium bei Raumtemperatur mehr als 24 h und bei $-20^\circ C$

über einen Monat stabil. In basischem Medium (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), THF, Cyclohexadien) wurde aus **3** das Phthalat durch β -Eliminierung abgespalten, woraufhin die Cyclisierung von **4b** zum Aren eintrat. Dieses wurde zu **5b** umgesetzt (25% Ausbeute; Schema 1)^[17], dessen Struktur aufgeklärt wurde. Behandelte man das Phthalat-Derivat von **13** mit DBU in $[D_6]$ THF, wurde Deuterium an C(3) und C(6) zu 67 bzw. 53% eingebaut (**5c**). Die Annahme, daß aus **3** ein Diradikal entsteht, wird durch den Einbau von Deuterium in diese Positionen gestützt.

Anschließend wurde die DNA-spaltende Aktivität des maskierten Endiins **3** untersucht. pBR322-DNA (Superhelix, Form I) wurde mit **3** in unterschiedlichen Konzentrationen in 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl-Puffer (pH = 7.5) bei 37 °C ohne Zugabe eines Thiols 5 h inkubiert (Abb. 1, Spuren 6–8; Tabelle 1). In Spur 6 (0.1 mM **3**) ist die



Abb. 1. Abhängigkeit der DNA-spaltenden Aktivität von **3** von Konzentration und Temperatur; Bandenmuster der gespaltenen DNA nach Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese (Form I: superhelicale DNA; Form II: relaxierte DNA; Form III: lineare DNA; Tabelle 1).

Tabelle 1. Anteile [%] an Form-I-, Form-II- und Form-III-DNA nach Spaltung mit **3** unter unterschiedlichen Bedingungen (siehe auch Abb. 1).

Spur	T [°C]	c(3) [mM]	Form I	Form II	Form III
1	[a]	—	85.9	14.1	0.0
2	4	1.0	16.4	74.7	8.9
3	20	1.0	13.6	77.7	8.7
4	37	1.0	7.9	63.3	28.7
5	50	1.0			
6	37	0.1	33.9	63.3	2.8
7	37	0.5	11.6	75.2	13.2
8	37	1.0	8.0	57.9	34.1
9	37	1.0 (+ DTT)	25.6	72.2	2.2

[a] Intakte DNA.

Entstehung von relaxierter DNA (Form II) nach einem Einzelstrangbruch zu erkennen. Mit 1.0 mM **3** wurde ein Doppelstrangbruch beobachtet (Spur 8; linearisierte DNA, Form III). Hierin unterscheidet sich **3** von den DNA-spaltenden Verbindungen, die die DNA alkylieren. Durch Dithiothreitol wurde die DNA-spaltende Aktivität von **3** nicht gesteigert (Spur 9), was darauf hindeutet, daß das maskierte Endiin **3** auch ohne das Thiol aktiviert wird. Weiterhin wurde die Temperaturabhängigkeit der DNA-Spaltung bei Inkubation (5 h) von DNA mit **3** (1 mM) untersucht (Spuren 2–5). Sogar bei 4 °C ist noch eine deutliche Aktivität nachweisbar (Spur 2). In einer kinetischen Untersuchung mit 1 mM **3** wurde gezeigt, daß die Spaltung des ersten DNA-Strangs bei 37 °C in 5 min abläuft (Tabelle 2).

Tabelle 2. Kinetische Untersuchung der DNA-Spaltung durch **3** (1 mM).

Inkubationszeit [min]	Form I [%]	Form II [%]	Form III [%]
0	94.9	5.1	0
5	21.9	67.2	10.9
10	23.5	66.7	9.8
30	19.3	75.6	5.1
60	12.5	81.6	5.9

Demnach ist anzunehmen, daß **3** die DNA nach einem Diradikalmechanismus über eine Bergman-Cyclisierung des hochgespannten neungliedrigen Endiin-Gerüsts spaltet.

Uns ist also der Entwurf und die Synthese eines neungliedrigen KD-Analogons gelungen, das DNA auch in Abwesenheit von Thiolen spaltet. Die biologischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung lassen hoffen, daß sie als Leitstruktur für die weitere Entwicklung von DNA-spaltenden Verbindungen dienen kann. Die Einführung von DNA-erkennenden Strukturelementen an C(10) und/oder C(11) wird derzeit untersucht.

Ein eingegangen am 8. Februar 1996 [Z 8795]

Stichworte: Antitumormittel · DNA-Spaltung · Endiine · Naturstoffe

- [1] a) K. S. Lam, G. A. Hesler, D. R. Gustavson, A. R. Crosswell, J. M. Veitch, S. Forenza, K. Tomita, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 472–478; b) S. J. Hofstead, J. A. Matson, A. R. Malacko, H. Marquardt, *ibid.* **1992**, *45*, 1250–1254; c) J. E. Leet, D. R. Schroeder, S. J. Hofstead, J. Golik, K. L. Colson, S. Huang, S. E. Klohr, T. W. Doyle, J. A. Matson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7946–7948; d) J. E. Leet, D. R. Schroeder, D. R. Langley, K. L. Colson, S. Huang, S. E. Klohr, M. S. Lee, J. Golik, S. J. Hofstead, T. W. Doyle, J. A. Matson, *ibid.* **1993**, *115*, 8432–8443; e) N. Zein, K. L. Colson, J. E. Leet, D. R. Schroeder, W. Solomon, T. W. Doyle, A. M. Casazza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2822–2826.
- [2] a) J. Hu, Y.-C. Xue, M.-Y. Xie, R. Zhang, T. Otani, Y. Minami, Y. Yamada, T. Marunaka, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1575–1579; b) T. Otani, Y. Minami, Y. Yamada, T. Marunaka, R. Zhang, M.-Y. Xie, *ibid.* **1988**, *41*, 1580–1585; c) Y. Minami, K. Yoshida, R. Azuma, M. Saeki, T. Otani, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2633–2636; d) K. Yoshida, Y. Minami, R. Azuma, M. Saeki, T. Otani, *ibid.* **1993**, *34*, 2637–2640.
- [3] a) Y. Sugiimoto, T. Otani, S. Oie, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 417–421; b) Y. Sugiura, T. Matsumoto, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5548–5553; c) Y.-J. Xu, Y.-S. Chen, I. H. Goldberg, *ibid.* **1994**, *33*, 5947–5954; d) T. Matsumoto, Y. Sugiura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 1533–1538; e) R. J. Cobuzzi, Jr., S. K. Kotsopoulos, T. Otani, T. A. Beerman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 583–592; f) M. M. McHugh, J. M. Woynarowski, L. S. Gawron, T. Otani, T. A. Beerman, *ibid.* **1995**, *34*, 1805–1814; g) Y.-J. Xu, Z. Xi, Y.-S. Chen, I. H. Goldberg, *ibid.* **1995**, *34*, 12451–12460.
- [4] a) K. C. Nicolaou, Y. Ogawa, G. Zuccarello, H. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7247–7248; b) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, S.-C. Tsay, Y. A. Estevez, W. Wrasidlo, *Science* **1992**, *256*, 1172–1178; Übersichtsartikel: c) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, E. W. Yue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5881–5888; d) M. E. Maier, *Synlett* **1995**, 16–24; e) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1453–1481; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1387–1416; f) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 497–503.
- [5] a) P. A. Wender, M. Harmata, D. Jeffrey, C. Mukai, J. Suffert, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 909–912; b) P. A. Wender, J. A. McKinney, C. Mukai, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5369–5370; c) P. Magnus, T. Pittner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 541–543; d) P. Magnus, M. Davies, *ibid.* **1991**, 1522–1524; e) A. G. Myers, P. M. Harrington, E. Y. Kuo, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 694–695; f) A. G. Myers, P. M. Harrington, B.-M. Kwon, *ibid.* **1992**, *114*, 1086–1087; g) K. R. Buszek, Y. Jeong, *Syn. Commun.* **1994**, *24*, 2461–2470; h) K. Iida, M. Hirama, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10310–10311; i) *ibid.* **1995**, *117*, 8875–8876.
- [6] T. Doi, T. Takahashi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3465–3467.
- [7] a) M. E. Maier, T. Brandstetter, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3679–3682; b) A. G. Myers, P. S. Dragovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5859–5860; c) H. Audrain, T. Skrydstrup, G. Ulibarri, D. S. Grierson, *Synlett* **1993**, 20–22; d) H. Audrain, T. Skrydstrup, G. Ulibarri, C. Riche, A. Chiaroni, D. S. Grierson, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1469–1502; e) J. M. Nuss, M. M. Murphy, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 37–40.
- [8] K. C. Nicolaou, G. Zuccarello, Y. Ogawa, E. J. Schweiger, T. Kumazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4866–4868.
- [9] T. Takahashi, H. Tanaka, Y. Hirai, T. Doi, H. Yamada, T. Shiraki, Y. Sugiura, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1719–1722; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1657–1659.
- [10] Die Addition von (Z)-1-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)pent-2-en-4-in an **6** und die anschließende Dehydratisierung des tertiären Alkohols mit $(CF_3SO_2)_2O$ und Lutidin führten zum (E)-konfigurierten Cyclopentenylpentenin, was Probleme bei der Makrocyclisierung analog zu **11** → **12** nach sich zog.
- [11] a) T. Takahashi, H. Kataoka, J. Tsuji, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 147–149; b) D. R. Deardorff, D. C. Myles, K. D. MacFerrin, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5615–5618.

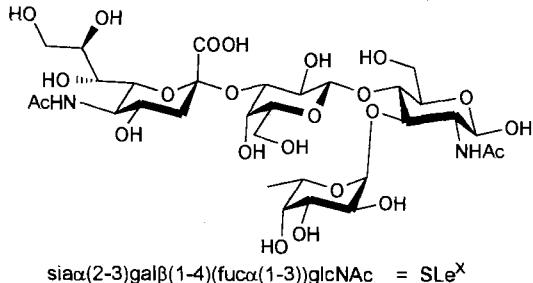
- [12] a) R. D. Stephens, C. E. Castro, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313–3315; b) K. Sonogashira, Y. Tohada, N. Hagiwara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467–4470; c) V. Ratovelomanana, G. Linstrumelle, *ibid.* **1981**, *22*, 315–318.
- [13] Transanulare [2,3]-Wittig-Umlagerung: a) T. Takahashi, H. Nemoto, Y. Kanda, J. Tsuji, Y. Fujise, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4315–4316; b) J. A. Marshall, T. M. Jensoin, B. S. DeHoff, *ibid.* **1986**, *51*, 4316–4319; c) Übersichtsartikel über die acyclische [2,3]-Wittig-Umlagerung: T. Nakai, K. Mikami, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 885–902.
- [14] Die *cis*-Konfiguration zwischen der C(4)-Vinyl- und der C(5)-Hydroxygruppe wurde durch NOE-NMR-Messungen nachgewiesen. Die relative Konfiguration zwischen der C(5)- und der C(11)-Hydroxygruppe wurde nach einer modifizierten Methode durch Veresterung zum α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetat bestimmt [15]. Weitere Einzelheiten zur Strukturbestimmung von **13**: T. Takahashi, H. Tanaka, Y. Sakamoto, H. Yamada, *Heterocycles* **1996**, *43*, 945–948.
- [15] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.
- [16] 3: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 7.6–7.8 (m, 4H), 5.84 (ddd, 1H, J = 6.9, 9.9, 17.2 Hz), 5.76 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 5.47 (dd, 1H, J = 2.6, 6.6 Hz), 5.45 (br, 1H, J = 17.2 Hz), 5.20 (br, 1H, J = 9.9 Hz), 4.14–4.24 (m, 1H), 3.98 (br, 1H, J = 6.6, 6.9 Hz), 3.75–3.84 (m, 1H), 2.41 (d, 1H, J = 17.5 Hz), 2.34 (dd, 1H, J = 2.6, 17.5 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 170.2, 167.7, 133.9, 132.3, 132.0, 131.3, 131.3, 129.5, 128.8, 128.3, 118.7, 97.6, 94.3, 91.1, 87.4, 84.8, 81.2, 76.9, 69.0, 43.1, 26.6; IR (KBr): 3402, 2212, 1719, 1259, 1118, 1069, 1038, 789, 744, 712 cm^{-1} ; MS (FAB): m/z : 417 [$M^+ + \text{Na}$], 433 [$M^+ + \text{K}$], 471 [$M^+ - \text{H} + 2\text{K}$].
- [17] 5b: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CD_2Cl_2): δ = 7.59 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 7.39 (dd, 1H, J = 1.7, 7.9 Hz), 7.26 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 6.74 (dd, 1H, J = 10.9, 17.5 Hz), 6.23 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 5.78 (d, 1H, J = 17.5 Hz), 5.52 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 5.44 (s, 1H), 5.28 (d, 1H, J = 10.9 Hz), 3.36 (d, 1H, J = 18.1 Hz), 3.24 (d, 1H, J = 18.1 Hz), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CD_2Cl_2): δ = 171.0, 170.2, 169.3, 156.1, 148.1, 137.6, 136.6, 133.8, 128.6, 126.6, 121.1, 120.8, 114.4, 97.2, 85.7, 76.7, 35.3, 22.1, 21.2; IR (Film): 2926, 2250, 1735, 1429, 1368, 1226, 1025, 929, 827, 732, 608 cm^{-1} ; MS (FAB): m/z : 379 [$M^+ + \text{Na}$].

Chemo-enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis^x-Glycopeptiden**

Gabi Baisch und Reinholt Öhrlein*

Bei akuten und chronischen Entzündungen spielen invasive Leukozyten eine entscheidende Rolle^[1]. Sie gelangen in einem mehrstufigen Prozeß, der durch das „Leukozyten-Rolling“^[2, 3] eingeleitet wird, an den Ort der Entzündung. Das „Rolling“ beruht auf der Wechselwirkung von Glycoproteinen, den E- und P-Selectinen, welche auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden, mit Kohlenhydrat-Liganden auf der Leukozytenoberfläche^[4]. Ein eleganter therapeutischer Ansatz beruht darauf, diese Interaktionen zu blockieren^[5].

Als Ligand für die Selektine wurde unter anderem das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (SLe^x) identifiziert^[6]. Monovalentes



[*] Dr. R. Öhrlein, G. Baisch
CIBA Zentrale Forschungslaboratorien
Schwarzwaldallee 211, CH-4002 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. + 61/6978975

[**] Die Autoren danken Dr. A. Katopodis und Dr. M. Streiff für die Bereitstellung von biotechnologisch erzeugter α (2-3)Sialyltransferase und Fucosyltransferase VI.

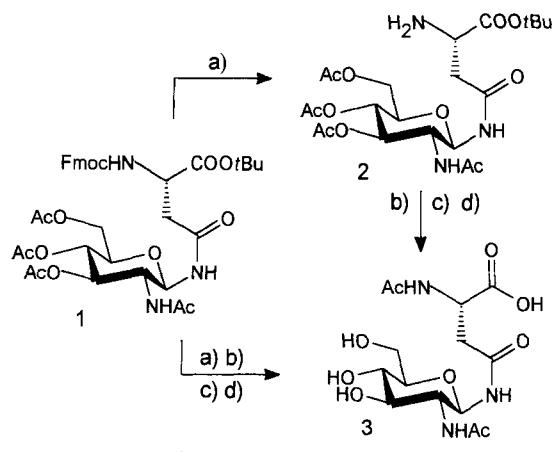
SLe^x zeigt in vitro allerdings nur eine relativ schwache Wechselwirkung mit E-Selectin ($\text{IC}_{50} = 0.75 \text{ mM}$)^[7]. Man vermutet deshalb, daß die E-Selectin-SLe^x-Interaktion in vivo durch „Clustering“ (Multivalenz) zwischen E-Selectin und SLe^x verstärkt wird^[8]. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden zunächst bis zu 18 chemisch vorgefertigte SLe^x-Einheiten über einen Spacer mit Rinderserumalbumin^[9] verknüpft. Die positiven Assay-Daten dieser künstlichen Glycoproteine stimulierten die Suche nach Methoden zur definierteren Synthese oligovalenter SLe^x-Konjugate. So verknüpfte man drei chemisch vorgefertigte SLe^x-Einheiten mit Nitromethantricarbonsäuren^[10] oder Cyclopeptidtemplaten^[11]. Relativ starre, divaleente SLe^x-Konjugate erhielt man chemo-enzymatisch mit Trisaccharidtemplaten^[12].

Bislang ist aber weder die Größe noch die räumliche Anordnung der E-Selectin-SLe^x-Cluster bekannt. Eine rasche Bestimmung dieser Parameter ermöglicht die folgende Strategie zur Synthese oligovalenter SLe^x-Konjugate. Als Kohlenhydrat-tragendes Rückgrat wählten wir Oligopeptidketten. Je nach Wahl der monomeren Bausteine kann durch Rigidisierung oder Flexibilisierung der Kette die Präsentation der SLe^x-Einheiten beeinflußt werden. Zusätzlich kann die Peptidkette nach ausgearbeiteten Synthesetechniken^[13] optimiert werden^[14].

Als Methode der Wahl zum Aufbau solcher Kohlenhydrat-Cluster mit natürlichen Zuckerbausteinen erweist sich die enzymatische Glycosylierung. Glycosyltransferasen haben folgende Vorteile: a) Die Glycosylierungen verlaufen auf vorhersagbare Weise mit exzellenter Stereo- und Regioselektivität^[15], wobei man die äußerst anspruchsvolle chemische Synthese des SLe^x-Tetrasaccharids^[16] umgeht. b) Man vermeidet weitgehend aufwendige Schutzgruppenmanipulationen, wie sie üblicherweise in der chemischen Glycopeptidsynthese notwendig sind^[17]. c) Man kann in wässrigen Puffersystemen ohne organische Lösungsmittel arbeiten. d) Es fallen keine giftigen Schwermetallsalzabfälle an, wie sie bei chemischen Glycosylierungen entstehen.

Eingeschränkt wird die enzymatische Methode durch die noch limitierte Zugänglichkeit der Glycosyltransferasen^[18]. Die benötigten aktivierten Zuckermonomere sind zwar prinzipiell kommerziell erhältlich, ein größerer Bedarf jedoch muß durch Synthese^[19] gedeckt werden; alternativ lassen sich bestimmte aktivierte Donoren *in situ* generieren^[20].

Ausgangspunkt unserer Synthesen waren die *N*-Acetylglucosamin-Asparagin-Bausteine **2** und **3** (Schema 1). Aus dem *N*-



$\text{ZNH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ **4**, $n = 1-7$

Schema 1. a) Morphilin, 77%; b) CH_2Cl_2 , Ac_2O , py, 96%; c) CF_3COOH , 94%; d) MeOH , MeONa , 76%; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Z = Benzyl-oxy carbonyl VI.