

Durch einfache Filtration kann der Ligand zurückgewonnen werden (> 98%). Sein wiederholter Einsatz in der Katalyse führt zum Produkt mit nahezu unverändert hohem *ee*-Wert bei gleichbleibender chemischer Ausbeute (85–92%).^[16] 5. Wie bei den Katalysatorsystemen von Sharpless^[1–3] geben die DHQ- und DHQD-Liganden **2a** bzw. **2b** Produkte mit gegensätzlicher Konfiguration.

Das Konzept, polymergebundene lösliche Liganden, die nach beendeter Reaktion durch Ausfällen leicht wiedergewonnen werden können, in der asymmetrischen Metallkatalyse einzusetzen, hat sich bewährt. Mit der hier vorgestellten Polymeranbindung werden in der AD erstmals sehr hohe Enantioselektivitäten erzielt, die den mit den Originalkatalysatorsystemen von Sharpless^[1–3] erreichten ähneln.

Eingegangen am 4. November 1996 [Z9729]

Stichworte: Asymmetrische Synthesen · Dihydroxylierungen · Homogene Katalyse

- [1] H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *116*, 2483.
- [2] E. N. Jacobsen, I. Markó, W. S. Mungall, G. Schroeder, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1968.
- [3] a) H. Becker, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 447; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 448; b) H. Becker, S. B. King, M. Taniguchi, K. P. M. Vanhessche, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3940; c) K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *ibid.* **1992**, *57*, 2768; d) E. J. Corey, A. Guzman-Perez, M. C. Noe, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10805.
- [4] a) B. M. Kim, K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3003; b) D. Pini, A. Petri, A. Nardi, C. Rosini, P. Salvadori, *ibid.* **1991**, *32*, 5175; c) B. B. Lohray, E. Nandanam, V. Bhushan, *ibid.* **1994**, *35*, 6559; d) C. E. Song, E. J. Roth, S.-G. Lee, I. O. Kim, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2687; e) D. Pini, A. Petri, P. Salvadori, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11321; f) A. Petri, D. Pini, S. Rapaccini, P. Salvadori, *Chirality* **1995**, *7*, 580; g) B. B. Lohray, E. Nandanam, V. Bhushan, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2805, zit. Lit.
- [5] Mit dem kürzlich beschriebenen polymergebundenen Phthalazinalkaloid wurden in der AD von Stilben und Zimtsäuremethylester exzellente Enantioselektivitäten (> 99% ee) erreicht: C. E. Song, J. W. Yang, H. J. Ha, S. Lee, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 645.
- [6] a) H. Han, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7632; b) siehe auch: S. Borman, *Chem. Eng. News* **1996**, August 26, S. 36. Dieses Konzept wurde auch schon bei anderen Metallkatalysen erfolgreich verfolgt; c) E. Bayer, V. Schurig, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 484; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 493; d) *Chemtech* **1976**, *6*, 212; e) M. P. Doyle, M. Y. Eismont, D. E. Bergbreiter, H. N. Gray, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6103, zit. Lit.
- [7] a) J. M. Harris, *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry*, Plenum, New York, **1992**; b) C. Delgado, G. E. Francis, D. Fisher, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1992**, *9*, 249; c) M. L. Nucci, R. Shorr, A. Abuchowski, *Adv. Drug Del. Rev.* **1991**, *6*, 133; d) N. V. Katre, *ibid.* **1993**, *10*, 91.
- [8] Janda und Mitarbeiter haben MeO-PEG zur kombinatorischen Synthese von niedermolekularen Verbindungen und Substanzbibliotheken genutzt: a) H. Han, M. M. Wolfe, S. Brenner, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6419; b) H. Han, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539.
- [9] D. J. Berrisford, C. Bolm, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1159; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1059.
- [10] In einer Fußnote in Lit. [6a] wird ein nicht näher beschriebener MeO-PEG-gebundener (DHQD)₂PHAL-Ligand erwähnt, mit dem höhere Enantioselektivitäten erhalten werden sollen.
- [11] DHQ = Dihydrochinin; DHQD = Dihydrochinidin.
- [12] Die Arylbromide **4** wurde ausgehend von 4-Brombenzonitril analog zur Synthese von (DHQD)₂PYR (PYR = 2,5-diphenyl-4,6-pyrimidindiyi) hergestellt. Siehe auch: G. A. Crispino, K.-S. Jeong, H. C. Kolb, Z.-M. Wang, D. Xu, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3785.
- [13] MeO-PEG der Firma Fluka ($M_r = 5000$; Hydroxylzahl OHZ = 0.2 Maßäquiv. pro Gramm Polymer).
- [14] Das Aryldibromid **8** wurde ausgehend von Pyrazin-2,3-dicarbonsäure analog zur Synthese der entsprechenden nichthalogenierten Verbindung [3b] hergestellt.
- [15] Mit *N*-Methylmorpholinoxid sind die *ee*-Werte vergleichsweise niedriger: Styrol 99% ee, Styrol 81% ee, 1-Methylstyrol 78% ee.
- [16] Der sechsmalige sequentielle Einsatz von **3** in der AD von Stryol lieferte die folgenden Enantioselektivitäten: 98, 98, 98, 98, 97, 96% ee. Das leichte Absinken der *ee*-Werte kann mit einem Alkaloidverlust durch geringfügige Esterhy-

droylse unter den basischen Reaktionsbedingungen ($K_3[Fe(CN)_6]/K_2CO_3$) erklärt werden. Andere MeO-PEG-Anbindungen werden derzeit untersucht.

[17] Für experimentelle Detail siehe Lit. [12].

[18] Säulenmaterial: Daicel, Chiralcel; Eintrag Nr. 1: Bis- α -methoxy- α -trifluormethyl phenylacetat (OD); 2: Diol (OB); 3: Bisbenzoat (OD); 4: Bis-*p*-methoxybenzoat (OD); 5: *tert*-Butyldiphenylsilylmonoether (OD).

Totalsynthese von (–)-Epothilon B: eine Erweiterung der Suzuki-Kupplung und Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Epothilone

Dai-Shi Su, Dongfang Meng, Peter Bertinato, Aaron Balog, Erik J. Sorensen, Samuel J. Danishefsky,* Yu-Huang Zheng, Ting-Chao Chou, Lifeng He und Susan B. Horwitz

Vor kurzem konnten wir^[3, 4] die erste Totalsynthese von Epothilon A **3**^[1–5] erfolgreich beenden. Unsere Synthese verlief über die (*Z*)-Desoxyverbindung **4**, die nach einer unter definierten Bedingungen durchgeführten, hochstereoselektiven Epoxidierung mit Dimethyldioxiran das β -Epoxid ergab. Die gleichen Myxobakterien des Stammes *Sorangium*, die **3** liefern, produzieren auch Epothilon B **1**, das sowohl in antifungal als auch in Cytotoxizitätstests in einigen Zelllinien^[6, 7] ein höheres Wirkungspotential als **3** aufweist, so daß unser Interesse an der Synthese von Epothilon B **1** geweckt wurde. Zwischenziel unserer Totalsynthese war Desoxyepothilon B **2** oder ein geeignetes Derivat. Mit einer dieser Verbindungen sollte die Regio- und Stereoselektivität der Epoxidierung an der C12-C13-Doppelbindung untersucht werden. Ein weiterer interessanter Aspekt war die Synthese der (*Z*)-trisubstituierten, ungesättigten Vorläuferverbindung von **2** mit hoher Stereoselektivität. In der Synthese von Epothilon A **3**^[3] nutzten wir eine Palladium-vermittelte B-Alkyl-Suzuki-Kupplung^[8, 9] von (*Z*)-Vinyliodid **5** mit dem Boran **7**, das durch Hydroborierung von **6** mit 9-BBN erhalten wurde (Schema 1).

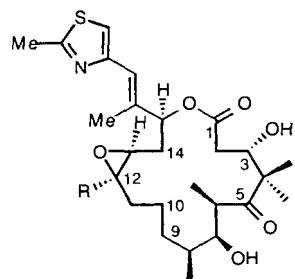
Unsere erste Strategie war daher, auf gleichem Weg das (*Z*)-trisubstituierte Olefin **13** als Zwischenverbindung in der Synthese von **2** herzustellen. Hierbei würde es notwendig sein, eine Methode zur Synthese des Vinyliodids **8** zu entwickeln, eines Analogons von **5** mit trisubstituierter Doppelbindung. Selbst

[*] Prof. S. J. Danishefsky,^[+] Dr. D.-S. Su, D. Meng,^[+] Dr. P. Bertinato, Dr. A. Balog, Dr. E. J. Sorensen
Laboratory for Bioorganic Chemistry
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)
Telefax: Int. + 212/772-8691

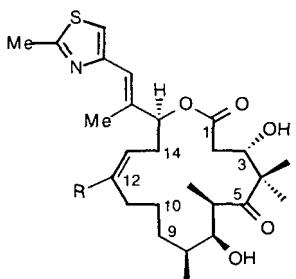
Dr. Yu-H. Zheng, Dr. T.-C. Chou
Laboratory for Biochemical Pharmacology, Sloan-Kettering Institute
L. He, S. B. Horwitz
Department of Molecular Pharmacology
The Albert Einstein College of Medicine
Bronx, NY 10461 (USA)

[+] Weitere Adresse:
Columbia University, Department of Chemistry, Havemeyer Hall
New York, NY 10027 (USA)

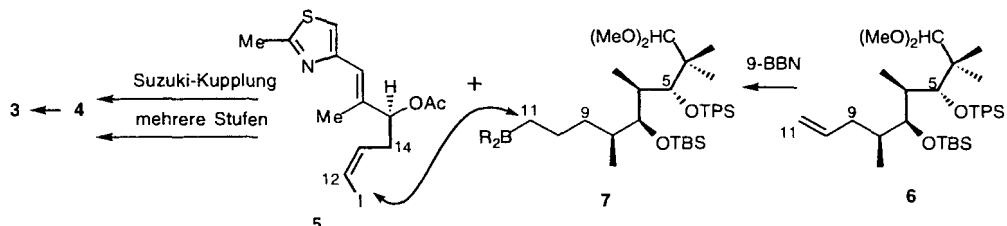
[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (NIH) gefördert [CA-28824 (S.J.D.) und CA-39821 (S.B.H.)]. Ein Postdoktorandenstipendium erhielten E. J. S. (NSF, CHE-9504805), A. B. (NIH, CA-GM 72231) und P. B. (NIH, CA 62948). Wir danken Dr. George Sukernick (NMR Core Facility, Sloan-Kettering Institute) für die NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Analysen. Professor Dr. G. Höfle von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, danken wir für die für Vergleichsanalysen zur Verfügung gestellten natürlichen Epothilone A und B sowie Professor G. I. Georg von der University of Kansas für wertvolle Anregungen zu diesem Thema.



1: R = Me, Epothilon B
3: R = H, Epothilon A



2: R = Me, X = Desoxyepothilon B
4: R = H, X = Desoxyepothilon A



Schema 1.

nach Erreichen dieses Ziels wäre der Erfolg der B-Alkyl-Suzuki-Kupplung zum trisubstituierten (*Z*)-Olefin nicht garantiert. Eine solche intermolekulare Kupplung von einer „B-Alkyl“-Verbindung (im Unterschied zu einer „B-Alkenyl“-Verbindung) mit einem Vinyliodid, das nicht vom β -Iodoenat-Typ (oder β -Iodenon-Typ) ist, wurde noch nicht beschrieben.

Zunächst wendeten wir uns der Synthese von **8** zu (Schema 2). Ausgangspunkt war das Olefin **10**, das nach bekannter

Vorschrift^[4] durch katalytische asymmetrische Allylierung von **9**^[11] und anschließende Acetylierung der freien Hydroxygruppe hergestellt wurde. Regioselektive Dihydroxylierung von **10** und nachfolgende oxidative Spaltung des erhaltenen Glycols ergab den labilen Aldehyd **11**. Interessanterweise reagierte **11** mit dem Phosphoran **12**,^[12] das gemäß Schema 2 hergestellt wurde, in mäßiger Gesamtausbeute zum (*Z*)-Iodid **8**. Das Boran **7** wurde (wie beschrieben) aus **6** synthetisiert.^[3] Wie erhofft, konnte **7** mit dem Iodid **8** zum (*Z*)-Olefin **13** gekuppelt werden.

Wir nutzten nun Arbeitsvorschriften, die wir bereits zur Synthese von **4**^[3] entwickelt hatten. So führte die Hydrolyse des Acetals zum Aldehyd **14**, der eine Makroaldolcyclisierung einging

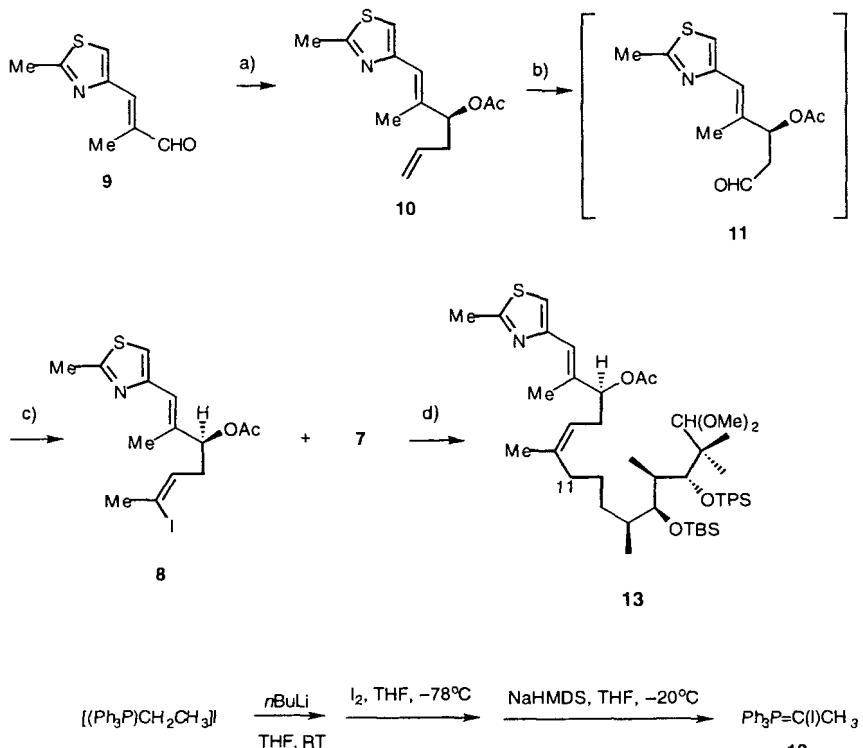
(Schema 3). Unter Bedingungen, unter denen die besten Ausbeuten an Aldolprodukt erzielt wurden, erhielten wir ein α/β -Verhältnis von 1.5/1 bezogen auf die Konfiguration an C3. Durch Reduktion des aus dem (3*R*)-Isomer erhaltenen C3-Ketons **15** konnten wir das (3*R*)- in das benötigte (3*S*)-Epimer überführen.^[13] Spaltung des Triphenylsilyl ethers an C5 mit anschließender Einführung der *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe an C3, Oxidation an C5 (vgl. **16**) und Abspaltung der Silylschutzgruppen an C3 und C7 lieferte **2**.

Die Epoxidierung von (*Z*)-Desoxyepothilon B **2** ergab rasch und mit hoher Regio- und Stereoselektivität^[14] Epothilon B **1**. Die charakteristischen Daten (¹H-NMR, MS, IR, $[\alpha]_D$) von **1** stimmten mit denen einer natürlichen Probe überein. Damit war die erste Totalsynthese von (–)-Epothilon B vollendet.

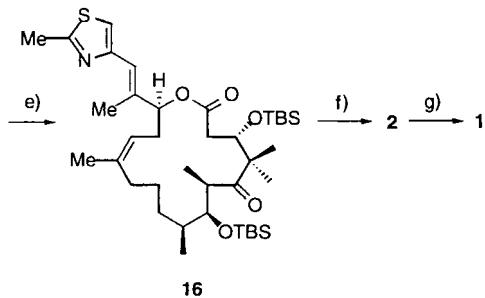
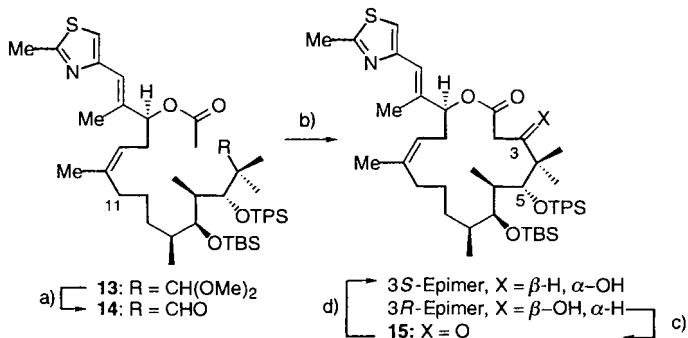
Es war sicherlich nicht vorherzusehen, daß das Vinyliodid **8** aus dem selten verwendeten Phosphoran **12** und dem äußerst labilen β -Acetoxyaldehyd **11** stereospezifisch hergestellt werden kann.^[12] Die erfolgreiche Bildung der trisubstituierten (*Z*)-Doppelbindung durch die Suzuki-Kupplung ist eine wichtige Erweiterung dieser C-C-Knüpfungsreaktion.^[10, 15] Die hochregioselektive und -stereoselektive Epoxidierung von (*Z*)-Desoxyepothilon B **2** mit Dimethyldioxiran verlief äußerst zufriedenstellend.

Darüber hinaus untersuchten wir die biologischen Eigenschaften von synthetischem Epothilon B **1** und dessen (*Z*)-12,13-Desoxyvorläuferverbindung **2**. Von früheren Synthesen^[3, 4] standen uns Epothilon A **3**, dessen (*Z*)-12,13-Desoxyvorläuferverbindung **4** sowie deren Doppelbindungsisomer **17** zur Verfügung. Auf einem abgewandelten Reaktionsweg erhielten wir die (*E*)-Verbindungen der B-Reihe, z. B. **18**.^[16]

Alle diese Verbindungen konnten (ähnlich wie Taxol) in Abwesenheit von GTP an Mikrotubuli binden^[17] und waren in hohem

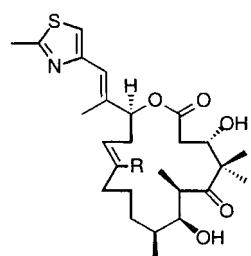


Scheme 2. a) 1. Allyl(triethylzinn), (*S*)(–)-2,2'-Dihydroxy-1,1'-biphenyl ((*S*)(–)-BINOL), Ti(O*i*Pr)₄, CH₂Cl₂, –20°C, 60%, >95% ee; 2. Ac₂O, Et₃N, 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), CH₂Cl₂, RT, 95%; b) 1. OsO₄, *N*-Methylmorpholin-N-oxid-monohydrat, Aceton/H₂O, 0°C; 2. Pb(OAc)₄, C₆H₆, 0°C; c) **12**, THF, –20°C, nur (*Z*)-Isomer, 43% aus **10**; d) [Pd(dppf)] (dppf = 1,4'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene), Cs₂CO₃, Ph₃As, H₂O, DMF, RT, 77%. THP = Tetrahydropyran; TPS = Triphenylsilyl; RT = Raumtemperatur.



Schema 3. a) $p\text{-TsOH}$, Dioxan/ H_2O , 55°C , 71%; b) KHMDS, THF, -78°C , 67%, α/β 1.5/1; c) Dess-Martin-Periodinan, CH_2Cl_2 , RT; d) NaBH_4 , MeOH , RT, 80% über zwei Stufen; e) 1. $\text{HF}\cdot\text{Py}$, Py, THF, RT, 93%; 2. TBSOTf , 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , -30°C , 89%; 3. Dess-Martin-Periodinan, CH_2Cl_2 , RT, 67%; f) $\text{HF}\cdot\text{Py}$, THF, RT, 80%; g) Dimethylidioxiran, CH_2Cl_2 , -50°C , 70%, *cis/trans* 14/1. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl; OTf = Trifluormethansulfonat; Py = Pyridin.

Maße zelltoxisch (Tabelle 1). Die trisubstituierten Verbindungen **1** und **2** weisen höhere Cytotoxizitäten auf als die disubstituierten Analoga **3** und **4**.



Die Desoxyverbindungen **2** und **4** haben eine ähnliche Wirkung wie die natürlichen Verbindungen **1** und **3** und sind diesen in mancher Beziehung sogar überlegen. Interessanterweise ist **18** zwar noch merklich aktiv, doch wesentlich weniger wirksam als die ent-

Tabelle 1. Hemmung des Wachstums von humanen Leukämie-CCRF-CEM-Zellen und CCRF-CEM-MDR-Unterstämmen, die gegen Taxol oder Etoposid resistent sind, durch Epothilone und einige Derivate sowie Taxol [a].

Verbindung	CCRF-CEM IC_{50} (μM) [b]	CCRF-CEM/VBL IC_{50} (μM) [b]	CCRF-CEM/VM1 IC_{50} (μM) [b]
Epothilon A 3	0.003	0.020	0.003
Desoxyepothilon A 4	0.022	0.012	0.013
<i>trans</i> -Desoxyepothilon A 17	0.052	0.035	0.111
Epothilon B 1	0.0004	0.003	0.002
Desoxyepothilon B 2	0.009	0.017	0.014
<i>trans</i> -Desoxyepothilon B 18	0.090	0.262	0.094
Taxol	0.002	3.390	0.002

[a] Die Cytotoxizitäten der Testverbindungen wurden durch Ermittlung der Wachstumsraten von humanen lymphoblastischen Leukämiezellen CCRF-CEM oder ihrer entweder gegen Vinblastin und Taxol (CCRF-CEM/VBL) oder Etoposid (CCRF-CEM/VM-1) resistenten Unterstämmen. XTT-Mikrokultur-Tetrazolium/Formazan-Tests [18] wurden verwendet. [b] Die IC_{50} -Werte wurden aus 5–6 Konzentrationen durch ein Computerprogramm [20] berechnet, das auf einem "median-effect plot" [19] basiert.

sprechenden (*Z*)-Verbindungen **2** oder **4** oder die disubstituierte (*E*)-Verbindung **17**. Diese Struktureigenschaften müssen bei der Entwicklung von pharmakologisch relevanten Epothilonen berücksichtigt werden.

Eingegangen am 27. Dezember 1996 [Z9934]

Stichworte: Epothilone · Naturstoffe · Totalsynthesen

- [1] D. Meng, E. J. Sorensen, P. Bertinato, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7998.
- [2] P. Bertinato, E. J. Sorensen, D. Meng, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8000.
- [3] A. Balog, D. Meng, T. Kamenecka, P. Bertinato, D.-S. Su, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2976; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2801.
- [4] D. Meng, D.-S. Su, A. Balog, P. Bertinato, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, Nr. 12.
- [5] Weitere Totalsynthesen von Epothilon A siehe: Z. Yang, Y. He, D. Vourloumis, H. Vallberg, K. C. Nicolaou, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 170; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 166; K. C. Nicolaou, F. Sarabia, S. Ninkovic, Z. Yang *ibid.* **1997**, *109*, 539 bzw. **1997**, *36*, 525; D. Schinzer, A. Limberg, A. Bauer, O. M. Böhm, M. Cordes, *ibid.* **1997**, *109*, 543 bzw. **1997**, *36*, 523. Andere synthetische Studien bezüglich Epothilon A siehe: a) K. C. Nicolaou, Y. He, D. Vourloumis, H. Vollberg, Z. Yang, *ibid.* **1996**, *108*, 2554 bzw. **1996**, *35*, 2399; b) D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* **1996**, 1477; c) J. Mulzer, A. Mantouidis, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9179.
- [6] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomberg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1567.
- [7] D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325.
- [8] N. Miyaura, T. Ishiyama, H. Sasaki, M. Ishi-Kawa, M. Satoh, A. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 314.
- [9] Übersichtsartikel: N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457.
- [10] Für einige analoge Studien, die sich in wichtigen Details von den unseren unterscheiden siehe: a) N. Miyaura, H. Sugiyama, A. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 2221; b) M. Ohba, N. Kawase, T. Fujii, K. Aoe, K. Okamura, R. Fathi-Afshar, T. M. Allen, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6101; c) C. R. Johnson, M. P. Braun, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11014.
- [11] G. E. Keck, K. H. Tarbet, L. S. Geraci, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8467.
- [12] J. Chen, T. Wang, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2827.
- [13] Die stereochemisch kontrollierte Aldolkondensation lieferte die natürlich vorkommende (3*S*)-Konfiguration, wie sie für die Epothilon-A-Serie [3] auftritt. Mit dem hier beschriebenen Verfahren wurde eine höhere Gesamtausbeute an (3*S*)-Epimer erzielt.
- [14] Die Epoxidierung von **2** scheint schneller und regioselektiver abzulaufen als die von **4** [3].
- [15] Unseres Wissens ist dies die erste erfolgreiche Suzuki-Kupplung einer B-Alkyl-Verbindung mit einem trisubstituierten, nicht-konjugierten Alken.
- [16] Verbindung **18** wurde durch eine nicht-stereospezifische Olefinmetathese hergestellt, die auch **2** lieferte. Diese Isomere konnten nur schwierig voneinander getrennt werden.
- [17] Diese Experimente wurden von Dr. Susan Horwitz am Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA, durchgeführt: Microtubuli-Protein (MTP) wurde durch zwei Cyclen des temperaturabhängigen Auf- und Abbaus aus Kalbshirn gereinigt [21]. In Kontrollaufbaupräparaten wurde (4-Methylthiophenol (MTP; 1 mg mL^{-1}) mit einem aus 0.1 M 2-(*N*-Morpholinolino)ethansulfinsäure (MES), 1 mM 3,6-Dioxaoctan-1,8-diamin-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA), 0.5 mM MgCl_2 , 1 mM GTP und 3 M Glycerin bestehenden Puffer (pH = 6.6) verdünnt. Die Konzentration von Tubulin in MTP betrug ungefähr 85%. Die Assoziation wurde spektrophotometrisch bei 350 nm (35°C , 40 min) untersucht, indem Trübungsänderungen zur Messung der Polymermasse verfolgt wurden [22]. Die Testverbindungen wurden bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ohne GTP untersucht. Die Mikrotubulibildung wurde durch Elektronenmikroskopie überprüft. Um die Stabilität der Mikrotubuliaggregate in Gegenwart von GTP oder der Testverbindungen zu ermitteln, wurde die Trübung 40 min bei 4°C verfolgt.
- [18] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, D. K. Paul, A. Monks, S. Teiney, T. H. Hafsig, J. J. Currens, D. Sheriff, M. R. Boyd, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827.
- [19] T.-C. Chou, D. Rideout, *Synergism and Antagonism in Chemotherapy*, Academic Press, New York, **1991**, S. 61–102.
- [20] J. Chou, T.-C. Chou, IBM-PC-Software und -Handbuch, Biosoft, Cambridge, UK, **1987**.
- [21] R. C. Weisenberg, *Science* **1972**, *177*, 1104.
- [22] F. Gaskin, C. R. Cantor, M. L. Shelanski, *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 737.