

$R_f = 0.32$ (Et₂O). IR (Film): $\tilde{\nu} = 3078, 3047, 2927, 1734$ (C=O), 1653 cm^{-1} (C=C); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.68\text{--}0.72$ (m, 2H, Cyclopropyl-H), 0.75 (m_c, 2H, Cyclopropyl-H), 0.81 (m_c, 2H, Cyclopropyl-H), 0.90 (m_c, 2H, Cyclopropyl-H), 1.77 (dd, ² $J = 13.0$, ³ $J = 3.5$ Hz, 2H, 4'-H), 2.47 (dd, ² $J = 13.0$, ³ $J = 11.0$ Hz, 2H, 4'-H), 2.76 (dd, ³ $J = 9.0$, ³ $J = 4.0$ Hz, 4H, 6'-H), 3.18 (ddd, ³ $J = 11.0$, ³ $J = 9.0$, ³ $J = 3.5$ Hz, 2H, 5'-H), 3.98 (s, 6H, OCH₃), 5.80 (t, ³ $J = 4.0$ Hz, 2H, 7'-H), 7.08 (s, 4H, Ar-H); ¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃, APT): $\delta = 11.59$ (–, Cyclopropyl-C), 12.91 (–, Cyclopropyl-C), 20.09 (–, C-3'), 28.49 (–, C-4'), 37.48 (–, C-6'), 39.38 (+, C-5'), 51.64 (+, OCH₃), 123.80 (+, C-7'), 128.25 (+, Ar-C), 138.49 (–, C-8'*), 142.74 (–, Ar-C*), 175.98 (–, CO); MS (70 eV): m/z (%): 406 (31) [M^+], 183 (100) [$M^+ - 2\text{CO} - 2\text{MeOH} - \text{C}_8\text{H}_8$], 152 (6), 108 (14), 84 (14), 77 (6); Elementaranalyse (%): ber. für C₂₆H₃₀O₄ (406.5): C 76.82, H 7.44; gef.: C 76.65, H 7.43.

- [9] Herausragende Beispiele: B. M. Trost, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 701–703; b) B. M. Trost, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9421–9438.
- [10] Kristallstrukturanalyse von **5** (C₂₆H₃₀O₄): $Z = 4$, $M_r = 406.52$, Kristallabmessungen: $0.6 \times 0.5 \times 0.3$ mm, monoklin, Raumgruppe $P-2(1)$, $a = 629.17(2)$, $b = 1069.44(3)$, $c = 1580.34(4)$ pm, $\beta = 91.311(2)^\circ$, $V = 1.06307(5)\text{ nm}^3$, $\rho_{\text{ber}} = 1.270\text{ Mg m}^{-3}$, $F(000) = 436$, $\lambda = 71.073$ pm, $T = 133(2)$ K, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.084\text{ mm}^{-1}$, $2.30 \leq 2\theta \leq 25.03^\circ$; von den 18493 gesammelten Reflexen sind 1882 unabhängig und wurden zur Strukturverfeinerung von 186 Parametern mit Hilfe von 105 Restraints verwendet. Die R -Werte sind $R1 = 0.0804$ ($I > 2\sigma(I)$) und $wR2 = 0.1281$ (sämtliche Daten); min./max. Restelektrodenichte $-236/218\text{ e nm}^{-3}$. Die Daten wurden auf einem Stoe-Siemens-Huber-Vierkreisdiffraktometer mit einem Siemens-CCD-Flächendetektor gesammelt. Die Intensitäten wurden mit ϕ - und ω -Scans aufgenommen. Die Integration der Daten wurde mit dem Programm SAINT ausgeführt. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst (G. M. Sheldrick, SHELXL-93/97, Programm für die Kristallstrukturverfeinerung, Universität Göttingen, 1997) und nach dem Kleinstes-Fehlerquadrate-Verfahren gegen F^2 verfeinert. Alle Nichtwasserstoffatome konnten anisotrop verfeinert werden. Alle Wasserstoffatome wurden geometrisch ideal positioniert und in die Verfeinerung einbezogen. Alle Fehlerrichtungen konnten mit Hilfe von Abstands- und ADP-Restraints aufgelöst und anisotrop verfeinert werden. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no.“ CCDC-133154 (**4f**) und CCDC-133155 (**5**) beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [11] Auch die Bicyclopropylidenkomponente läßt sich variieren, denn zahlreiche substituierte Bicyclopropylidene sind mittlerweile leicht und in größeren Mengen zugänglich. Übersicht: A. de Meijere, S. I. Kozhushkov, A. F. Khlebnikov, *Topics Curr. Chem.* **1999**, *207*, 89–147.
- [12] a) S. Bräse, M. Schroen, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1139–1142; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1071–1073; b) S. Bräse, D. Enders, J. Köbberling, F. Avemaria, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3614–3616; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3413–3415; c) Übersicht: S. Bräse, S. Dahmen, M. Lormann in *Proceedings of ECSOC-3, The Third International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry* (Hrsg.: E. Pombo-Villar, R. Neier, S.-K. Lin), CD-ROM-Edition (ISBN 3-906980-04-9), MDPI, Basel, **1999**; d) S. Bräse, S. Dahmen, *Chem. Eur. J.* **2000**, im Druck.
- [13] S. Bräse, A. de Meijere in *Metal-catalyzed Cross-coupling Reactions* (Hrsg.: F. Diederich, P. J. Stang), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 99–167, zit. Lit.
- [14] Ein Kontrollexperiment unter Normaldruck ergab (nach der anschließenden Heck-Reaktion) lediglich p -(3-Cyclopentyl)zimtsäuremethylester in 68 % Ausbeute. Die Anwendung hohen Drucks fördert sowohl die Heck- als auch die Diels-Alder-Reaktion: K. Voigt, U. Schick, F. E. Meyer, A. de Meijere, *Synlett* **1994**, 189–190.
- [15] Alle neuen, nichtpolymeren Verbindungen wurden vollständig charakterisiert (¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, MS, Elementaranalyse oder HR-MS), literaturbekannte Verbindungen wurden durch Vergleich der spektroskopischen Daten identifiziert.

Lectin-vermitteltes Drug-Targeting: Diskriminierung zwischen der Kohlenhydrat-vermittelten Aufnahme von Neoglyco-konjugaten, die in 3-Position modifizierte Fucose-Epitope tragen, in Tumor- oder Leberzellen**

Hans-Georg Lerchen,* Joerg Baumgarten, Norbert Piel und Victoria Kolb-Bachofen

Dr. Pol Bamelis zum 60. Geburtstag gewidmet

Die spezifische Wechselwirkung von Kohlenhydrat-Epitopen mit korrespondierenden endogenen Zelloberflächen-Lectinen spielt eine fundamentale Rolle bei verschiedenen interzellulären Erkennungsprozessen wie der Sperma-Eizell-Adhäsion, der Leukocyten-Adhäsion an Blutplättchen und Endothelzellen, der Tumor-Metastasierung sowie der Adhäsion von Mikroorganismen an Wirtszellen.^[1] Verschiedene Lectine wurden in Ratten-, Maus- und humanen Geweben, insbesondere der Leber, identifiziert und im Hinblick auf ihre Kohlenhydratspezifität charakterisiert.^[2] Die Nutzung dieser Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkung für ein rezeptorvermitteltes Drug-Targeting ist besonders bezüglich der Adressierung an die Leber bereits Gegenstand verschiedener Untersuchungen.^[3] Auch Tumorzellen exprimieren ein charakteristisches Lectinmuster auf ihren Zelloberflächen.^[4] Jedoch konnten unseres Wissens bisher keine tumorspezifischen Lectine identifiziert werden, und ein Lectin-vermitteltes Drug-Targeting ist somit nach wie vor eine große Herausforderung.^[5] Voraussetzungen hierfür sind zum einen eine ausreichende Differenzierung der Targeting-Einheit zwischen Tumor- und Normalgewebe, zum anderen die Umgehung des effizienten Abfangens von Glycokonjugaten durch die Leber, wie man es von Kupffer-Zellen und Hepatocyten kennt.^[6]

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Kohlenhydratbausteinen, die sich für ein Tumor-Targeting eignen sollten. Ein fucosebindender Rezeptor wurde auf Dickdarm-tumorzellen wie SW480 gefunden und sollte ein geeignetes Target sein, um Bindung und Aufnahme in Tumorzellen zu vermitteln.^[7] Jedoch bindet Fucose bekanntermaßen auch an Lectine in der Leber, besonders an solche auf Kupffer-Zellen.^[2] Deshalb mußte eine ausreichende Diskriminierung

[*] Dr. H.-G. Lerchen
Bayer AG, Zentrale Forschung, Wirkstoff-Forschung
Gebäude Q18, D-51368 Leverkusen
Fax: (+49) 214-3050070
E-mail: hans-georg.lerchen.hl@bayer-ag.de

Dr. J. Baumgarten
Bayer AG, Zentrale Forschung, Biotechnologie
Gebäude Q18, D-51368 Leverkusen

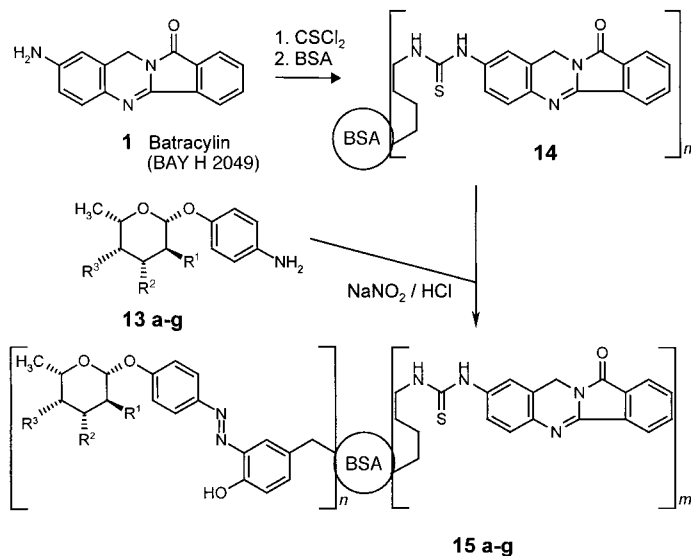
Dr. N. Piel
Bayer Corp., Business Group Diagnostics
511 Benedict Avenue, Tarrytown, NY 10591-5097 (USA)
Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen
Forschungsgruppe für Immunbiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5, Postfach 101007, D-40001 Düsseldorf

[**] Wir danken Andrea Borchard, Anna-Maria DiBetta, Manfred Hoffmann, Birgit Lang, Marija Lenzen und Dirk Wolter für ihre engagierte Mitarbeit.

zwischen der Erkennung durch Tumor- und durch Leberzellen erreicht werden. Als geeignete Werkzeuge, um Wechselwirkungen von Kohlenhydraten mit Lectinen sowie die Kohlenhydrat-vermittelte zelluläre Aufnahme zu untersuchen, bieten sich Neoglycokonjugate an, beispielsweise von Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA).^[4a] Für die Modifizierung verschiedener Aminosäureseitenketten des Proteins mit Kohlenhydratresten wurde eine Reihe von Methoden beschrieben.^[4a, 8] Die auf dem BSA-Molekül in Gruppen vorliegenden Kohlenhydrat-Epitope gewährleisten aufgrund der vielfachen Wechselwirkungen eine effiziente Bindung an entsprechende Rezeptoren auf Zellmembranen (Cluster-Effekt).^[8, 9] Um nun potentielle Unterschiede der zellulären Aufnahme durch Tumor- und Leberzellen herauszuarbeiten, entwarfen wir neuartige BSA-Konjugate mit modifizierten Fucose-Epitopen, die anschließend für die elektronenmikroskopische Detektion der zellulären Aufnahme mit kolloidalen Goldpartikeln markiert werden sollten. Aufgrund der Expression einer Vielzahl von Lectinen mit oft überlappenden Kohlenhydratspezifitäten auf Zelloberflächen sollte dieser funktionelle Endocytose-Assay für die Ermittlung des Tumor-Targeting-Potentials der Kohlenhydratreste aussagekräftiger sein als beispielsweise Studien an isolierten Lectinen. BSA-Konjugate mit unmodifizierten Fucoseresten sollten sowohl von Tumor- als auch von Leberzellen über Endocytose aufgenommen werden. Frühere Studien von anderen Arbeitsgruppen an definierten, gut charakterisierten Lectinen haben gezeigt, daß chemische Modifizierungen einzelner Hydroxygruppen im Kohlenhydratliganden eine starke Auswirkung auf die Lectinbindung haben können.^[10] Deshalb sollten in dieser Arbeit BSA-Konjugate mit regioselektiv modifizierten Fucose-Epitopen systematisch untersucht werden. Das Ziel war, eine spezielle Modifizierung des Kohlenhydrat-Epitops zu finden, die von Rezeptoren auf Tumorzellen toleriert wird, gleichzeitig jedoch zu einer deutlich reduzierten Erkennung und Aufnahme durch Rezeptoren auf Leberzellen führt. Dazu waren ausgehend von gut zugänglichem *p*-Nitrophenyl- β -L-fucosid effiziente Synthesen einer Reihe von regioselektiv modifizierten *p*-Aminophenyl- β -L-fucosiden zu entwickeln. Diese modifizierten Fucosederivate sollten dann an Tyrosinseitenketten von BSA geknüpft werden und anschließend die Aufnahme dieser Neoglycokonjugate in Tumorzellen der

Linie SW480 sowie in verschiedene Leberzellen untersucht werden. Weiterhin sollte die zusätzliche Modifizierung der Lysinseitenketten mit einem Toxophor auch die Messung der cytotoxischen Aktivität dieser BSA-Konjugate gegenüber der Tumorzelllinie SW480 ermöglichen.

Als Toxophor wurde das stark fluoreszierende Cytostatikum Batracyclin (BAYH 2049) **1** gewählt.^[11] Die Umsetzung der anilinschen Aminogruppe von **1** mit Thiophosgen lieferte das entsprechende Isothiocyanat, das in einem zweiten Schritt mit den Lysinseitenketten von BSA zum Konjugat **14** reagierte (Schema 1). Geeignete Kohlenhydratbausteine für



Scheme 1. Synthese von BSA-Konjugaten, die Batracyclin und modifizierte Fucose-Epitope enthalten.

die Verknüpfung mit BSA sind *p*-Aminophenylglycoside wie *p*-Aminophenyl- β -L-fucosid **13a** und dessen modifizierte Derivate **13b–g**. Zur Verknüpfung mit BSA wurden sie mit Natriumnitrit diazotiert und anschließend an die Tyrosinseitenketten gekuppelt, die unter den sauren Bedingungen die höchste Reaktivität aufweisen.^[4a, 8] In den so erhaltenen BSA-Konjugaten **15a–g** sind etwa 15–30 Lysinseitenketten mit dem Toxophor modifiziert, während 10–22 Tyrosinseitenketten Kohlenhydratreste tragen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Substitutionsmuster der *p*-Aminophenylfucoside **13a–g** und Zusammensetzung der BSA-Konjugate **15a–g** sowie ihre biologische Aktivität (zelluläre Aufnahme und cytotoxische Wirkung).

Nr.	Verb.	modifizierter Fucosid-Baustein			BSA-Konjugat		Kupffer-Zellen	Aufnahme ^[a] in		Cytotoxizität gegen SW480-Zellen [µm] ^[b]
		R ¹	R ²	R ³	Verb.	<i>n</i>		Hepato- cyten	SW480- Zellen	
1	13a	OH	OH	OH	15a	9	+++	++	+	7
2	13b	OH	OMe	OH	15b	20	(+)/++ ^[c]	+	++	12
3	13c	OH	OCH ₂ -COOH	OH	15c	22	–	(+)	++	7
4	13d	OH	OCH ₂ -CH ₂ OH	OH	15d	21	(+)	+	n. b.	15
5	13e	OH	H	OH	15e	14	(+)/++ ^[c]	n. b.	n. b.	25
6	13f	OMe	OH	OH	15f	15	+++	n. b.	n. b.	> 60
7	13g	OH	OH	H	15g	4	+++	(+)	n. b.	25

[a] Die Aufnahme wurde relativ zur Aufnahme von Gold-adsorbiertem Asialofetuin (Kontrolle) gemessen, die bei allen drei Zelltypen als hocheffizient (+++) definiert wurde. +++ = hocheffiziente Aufnahme, vergleichbar mit der Kontrolle; ++ = gute Aufnahme; + = schwache Aufnahme; (+) = Aufnahme nur in Einzelfällen; – = keine Aufnahme; n. b. = nicht bestimmt. [b] Assay, bei dem das zelluläre Wachstum mit Hilfe von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) detektiert wird. Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf eine Wachstumshemmung von 50%. [c] Es wurde wiederholt eine heterogene Aufnahme beobachtet, wobei eine kleinere Subpopulation eine gute Aufnahme zeigt.

Zur Synthese von regioselektiv modifizierten *p*-Aminophenyl- β -L-fucosiden **13b–g** wurde leicht erhältliches *p*-Nitrophenyl- β -L-fucosid **2** als Ausgangsmaterial eingesetzt. Umwandlungen der Hydroxygruppen sind ohne das Anbringen von Schutzgruppen am anomeren Zentrum möglich. Darüber hinaus kann nach den Umwandlungen an den Hydroxygruppen die aromatische Nitrogruppe hydrogenolytisch reduziert werden, wobei die für die Verknüpfung mit BSA geeigneten *p*-Aminophenylfucoside **13b–g** entstehen.

Ein effizienter Zugang zu einer Serie von 3-O-modifizierten *p*-Aminophenyl- β -L-fucosiden durch Verwendung von Zinn-Reagentien ist in Schema 2 dargestellt.^[12] Die *cis*-Hydroxygruppe von **2** wird mit Dibutylzinnoxid in Methanol in das Zinnacetal **3** überführt. Nach Entfernen des Methanols und Zusatz von Alkylierungsmitteln wie Methyljodid oder Bromessigsäuremethylester in DMF oder Dioxan wird das Zinnacetal unter Alkylierung der reaktiveren äquatorialen Position mit hoher Regioselektivität geöffnet. Insbesondere der 3-O-methylierte Baustein **4** wurde in hoher Ausbeute (83 %) erhalten und anschließend mit Wasserstoff über Palladium/Aktivkohle zum *p*-Aminophenyl-3-O-methyl- β -L-fucosid **13b** reduziert.

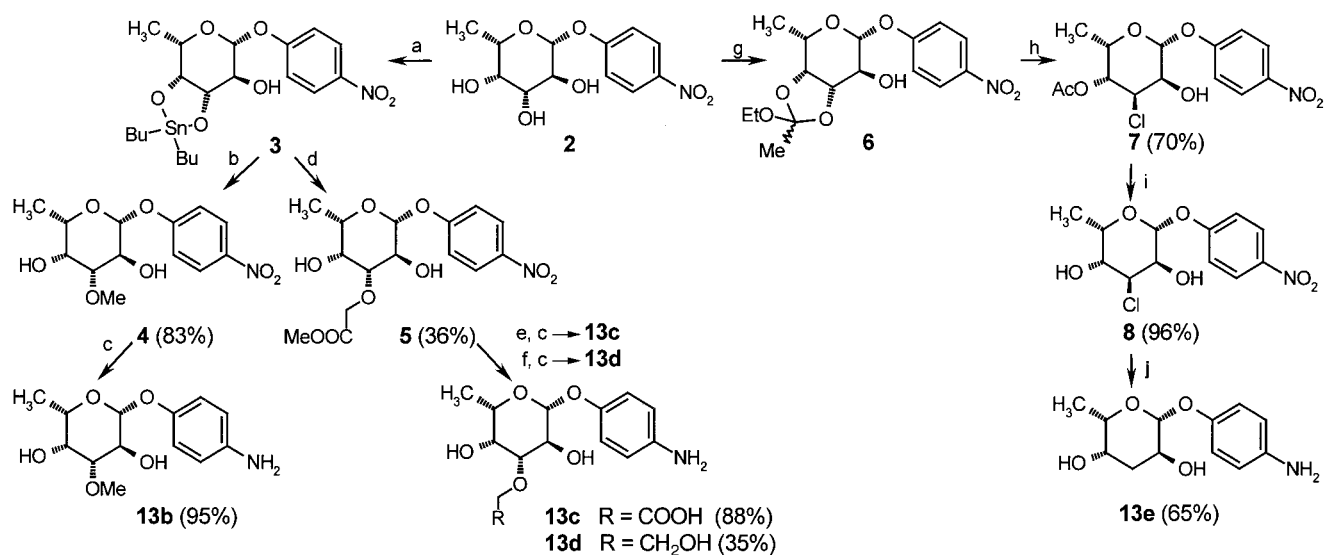
Die Alkylierung von **3** mit Bromessigsäuremethylester verlief am besten bei 100 °C in Dioxan in Gegenwart von katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumjodid. Der intermediär gebildete Methylester **5** wurde mit Lithiumhydroxid in Methanol gespalten. Das Carboxylat wurde dann mit dem sauren Ionenaustauscher Lewatit SC108 [H⁺] angesäuert, und nach der Reduktion der Nitrogruppe wurde *p*-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl- β -L-fucosid **13c** erhalten. Alternativ konnte **5** auch in zwei aufeinanderfolgenden Reduktionsschritten mit Natriumboranat in THF/Wasser bei 40 °C und durch anschließende Hydrogenolyse zu *p*-Aminophenyl-3-O-hydroxyethyl- β -L-fucosid **13d** umgesetzt werden.

Orthoester von *cis*-Hydroxygruppen in Kohlenhydraten werden bekanntermaßen zu den axial acylierten Derivaten geöffnet.^[13] So wurde **2** in eine Mischung der diastereomeren Orthoester **6** überführt (Schema 2). Während der Versuche,

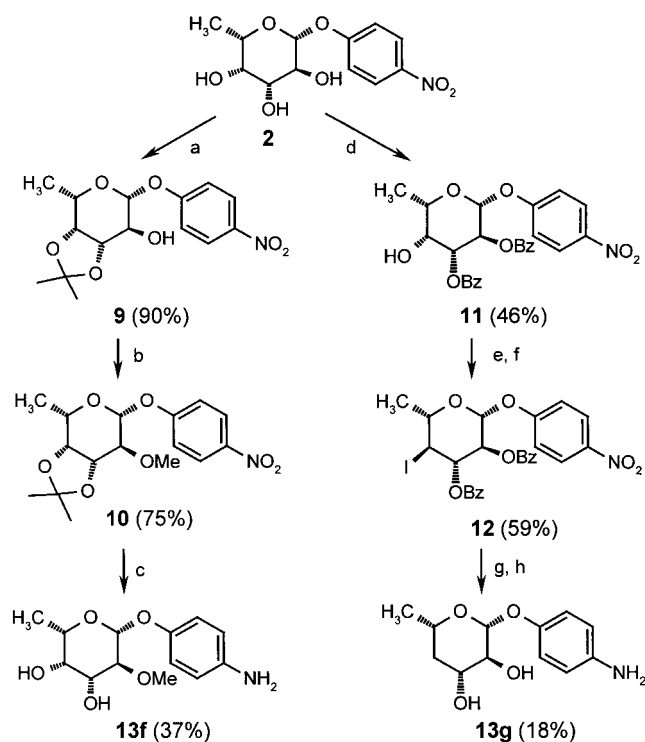
die 2-Hydroxygruppe von **6** mit Benzoylchlorid in das Benzoat zu überführen, wurde als Nebenreaktion eine Öffnung des Orthoesters durch Chloridionen beobachtet. Behandelte man **6** direkt mit Chlorwasserstoff in Dichlormethan, so wurde die Öffnung zur Hauptreaktion, und man erhielt das 3,6-Didesoxy-3-chlor-L-gulose-Derivat **7** in einer Ausbeute von 70 %. Diese Reaktion sollte einen effizienten Zugang zu *p*-Aminophenyl-3-desoxy- β -L-fucosid **13e** eröffnen. Die Acetylgruppe wurde zur Vermeidung von Epoxidbildung mit katalytischen Mengen Natriummethoxid in Methanol unter Zemplén-Bedingungen abgespalten, wodurch das Gulose-Derivat **8** erhalten wurde. Die Hydrogenolyse von **8** in Methanol in Gegenwart von Triethylamin als Säurefänger lieferte das 3-Desoxyfucose-Derivat **13e** in einem Schritt.

Ausgewählte Synthesen zur regioselektiven Modifizierung der 2- und 4-Hydroxygruppe von *p*-Nitrophenyl- β -L-fucosid sind in Schema 3 dargestellt: Um einen selektiven Zugang zur 2-Hydroxygruppe zu ermöglichen, wurden die *cis*-konfigurierten 3- und 4-Hydroxygruppen durch Umsetzung mit Methoxypropen in Dioxan/DMF in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure als Isopropylidenacetal geschützt (\rightarrow **9**). Anschließend wurde die 2-Hydroxygruppe mit 1.5 Äquivalenten Natriumhydrid in Gegenwart von Methyljodid im 5fachen Überschuss deprotoniert. Man erhielt das 2-alkylierte Derivat **10** in einer Ausbeute von 75 %. Anschließende Hydrogenolyse mit Wasserstoff auf Platinoxid in 80proz. Essigsäure lieferte in einem Schritt *p*-Aminophenyl-2-O-methyl- β -L-fucosid **13f** in 37 % Ausbeute.

Die axiale 4-Hydroxygruppe im Fucosemolekül ist die gegenüber Acylierungen am wenigsten reaktive.^[14] So war es mit Benzoylchlorid in Dichlormethan in Gegenwart von Pyridin bei tiefen Temperaturen (–35 °C) möglich, selektiv die 2- und 3-Hydroxygruppen von **2** zu benzoylieren. Die 4-Hydroxygruppe von **11** wurde dann mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid umgesetzt und das entstandene Triflat durch Iodid substituiert. Die Hydrogenolyse in Gegenwart von Triethylamin gefolgt von der Alkohololyse der Benzoat-



Schema 2. Synthese von 3-O-modifizierten *p*-Aminophenylfucosiden. a) $\text{Bu}_2\text{SnO}/\text{MeOH}$; b) MeI/DMF ; c) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$, MeOH ; d) $\text{BrCH}_2\text{COOMe}/\text{Bu}_4\text{NI}$ in Dioxan; e) LiOH , MeOH , anschließend Lewatit SC108; f) NaBH_4 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 40 °C; g) Triethylorthoacetat, *p*-TosOH, THF ; h) $\text{HCl}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; i) MeOH/NaOMe ; j) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$, MeOH , NEt_3 . – Tos = Toluol-4-sulfonyl.



Schema 3. Synthese von 2- und 4-O-modifizierten *p*-Aminophenylfucosiden. a) 2-Methoxypropen, *p*-TosOH in Dioxan/DMF; b) 5 Äquiv. MeI in THF, anschließend 1.5 Äquiv. NaH; c) 80proz. AcOH, H₂/PtO₂; d) 2 Äquiv. BzCl, CH₂Cl₂, Pyridin, –35 °C; e) (CF₃SO₂)₂O, CH₂Cl₂; f) NaI, DMF; g) H₂/PtO₂, MeOH, NEt₃; h) NaOMe, MeOH. – Bz = Benzoyl.

gruppen mit Natriummethoxid in Methanol lieferte *p*-Aminophenyl-4-desoxy-β-L-fucosid **13g**.

Die modifizierten *p*-Aminophenyl-β-L-fucoside **13b–g** wurden dann in Analogie zu **13a** mit dem Batracylin-BSA-Konjugat **14** zu den Neoglykokonjugaten **15b–g** umgesetzt (Schema 1). Anschließend wurden diese Konjugate für die elektronenmikroskopische Detektion der zellulären Aufnahme an kolloidale Goldpartikel von 5 oder 17 nm Durchmesser adsorbiert.^[15] Die Gold-Sole wurden durch Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Phosphoriger Säure (für 5-nm-Partikel) oder mit Natriumcitrat (für 17-nm-Partikel) hergestellt. Diese Gold-Sole wurden mit den Konjugat-Lösungen gemischt (Endkonzentration 10 µg Protein pro mL Gold-Sol) und durch Zugabe von Polyethylenglycol stabilisiert. Schließlich wurde überschüssiges Glykokonjugat durch Zentrifugation abgetrennt. Die Sättigung der Adsorption wurde durch einen Farbwechsel nach Zugabe von Natriumchlorid im Überschuss angezeigt. Frisch isolierte oder kultivierte Zellen wurden mit den beladenen Goldpartikeln bei 4 °C zur Detektion von Bindung oder bei 37 °C zur Untersuchung der zellulären Aufnahme inkubiert und nach Entfernen der nichtgebundenen Liganden für die elektronenmikroskopische Detektion vorbereitet. Die Aufnahme in die Tumorzellen der Linie SW480 sowie in Leberzellen wie Kupffer-Zellen und Hepatocyten wurde mit der Endocytose von Gold-adsorbiertem Asialofetuin (Kontrolle) verglichen und semiquantitativ ausgewertet. Darüber hinaus wurde die cytotoxische Aktivität der Konjugate **15a–g** gegenüber SW480-Tumorzellen mit dem MTT-Assay bestimmt (Tabelle 1).

Das BSA-Glykokonjugat zu **15a** mit unmodifizierten β-L-Fucose-Epitopen wurde zwar von SW480-Tumorzellen durch Endocytose aufgenommen, aber noch effizienter war die Endocytose durch Kupffer-Zellen und Hepatocyten (Tabelle 1, Nr. 1). Die analogen BSA-Glykokonjugate mit 2-O-Methyl- und 4-Desoxyfucosid-Epitopen, **15f** bzw. **15g**, wiesen im Vergleich zu **15a** keine Verminderung der Aufnahme in Kupffer-Zellen auf (Tabelle 1, Nr. 6, 7). Im Gegensatz dazu zeigten die BSA-Konjugate **15b–e**, die mit verschiedenen in 3-Position modifizierten Fucose-Epitopen markiert waren, eine deutliche Verringerung der Endocytose durch Leberzellen verglichen mit **15a** (Tabelle 1, Nr. 2–5). Gleichzeitig tolerierten die Tumorzellen SW480, wie für **15b** und **15c** gezeigt, offenbar die Modifizierungen der Fucose-Epitope in dieser speziellen Position und nahmen diese Glykokonjugate effizient durch Endocytose auf. Die angestrebte Diskriminierung zwischen Tumor- und Leberzellen war beim BSA-Konjugat **15c** am stärksten ausgeprägt, das mit 3-O-Carboxymethylfucosid-Epitopen markiert war.

Aufgrund des angeknüpften Batracylinrestes wiesen sowohl das Neoglykokonjugat mit unsubstituiertem Fucoserest, **15a**, als auch die Neoglykokonjugate mit in 3- oder 4-Position modifizierten Fucoseresten, **15b–e** bzw. **15g**, eine signifikante cytotoxische Wirkung auf. Die Konzentrationen zum Erreichen einer Wachstumshemmung von 50 % lagen im Bereich von 7–25 µM, was im Falle einer zellulären Aufnahme den Erwartungen entspricht (Tabelle 1). Im Unterschied dazu wies das kohlenhydratfreie BSA-Konjugat **14** keinerlei und das Konjugat **15f** eine verminderte cytotoxische Aktivität gegenüber SW480-Zellen auf. Diese Befunde untermauern die Annahme einer Kohlenhydrat-abhängigen Aufnahme und cytotoxischen Wirkung der Glykokonjugate **15a–e** und **15g**.

Diese Ergebnisse zeigen, daß bei den BSA-Neoglykokonjugaten eine chemische Modifizierung der 3-Position in den Fucose-Epitopen zu der angestrebten Diskriminierung zwischen der Aufnahme in Tumorzellen oder in Leberzellen führt. Weiterhin korreliert die gefundene Aufnahme in Tumorzellen mit einer cytotoxischen Wirkung dieser Neoglykokonjugate. BSA-Neoglykokonjugate haben sich damit als geeignete Werkzeuge erwiesen, um Kohlenhydratreste zu identifizieren, die potentiell für ein Tumor-Targeting geeignet sind. Jedoch wird ein Einsatz in vivo wegen ihres immunogenen Potentials nur eingeschränkt möglich sein. Deshalb wird zur Zeit das Potential der identifizierten Kohlenhydratreste für ein Tumor-Targeting mit niedermolekularen Glykokonjugaten von cytotoxischen Verbindungen untersucht.

Eingegangen am 13. August 1999 [Z13874]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3680–3683

Stichwörter: Endocytose • Glycoproteine • Kohlenhydrate • Tumorthherapie • Wirkstoff-Forschung

- [1] a) N. Sharon, H. Lis, *Science* **1989**, 246, 227–246; b) J. H. Musser, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1992**, 27, 301–310.
 [2] a) M. A. Lehrmann, R. S. Haltiwanger, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 7426–7432; b) R. S. Haltiwanger, M. A. Lehrmann, A. E. Eckhardt, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 7433–7439.
 [3] a) M. S. Wadhwa, K. G. Rice, *J. Drug Targeting* **1995**, 3, 111–127; b) E. A. L. Biessen, D. M. Beuting, H. C. P. F. Roelen, G. A. van de

- Marel, J. H. van Boom, T. J. C. van Berkel, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1538–1546; c) L. W. Seymour, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1994**, *14*, 89–111; d) M. Hashida, M. Nishikawa, Y. Takakura, *J. Controlled Release* **1995**, *36*, 99–107.
- [4] a) H.-J. Gabius, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1071*, 1–18; b) M. Monsigny, A. C. Roche, C. Kieda, P. Midoux, A. Obrénovitch, *Biochimie* **1988**, *70*, 1633–1649.
- [5] J. Stueben, B. Bertram, M. Wießler, *Int. J. Oncol.* **1995**, *7*, 225–231.
- [6] R. W. Jansen, G. Molema, T. L. Ching, R. Oosting, G. Harms, F. Moolenaar, M. J. Hardonk, D. K. F. Meijer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3343–3348.
- [7] a) H.-J. Gabius, R. Engelhardt, T. Hellmann, P. Midoux, M. Monsigny, G. A. Nagel, K. Vehmeyer, *Anticancer Res.* **1987**, *7*, 109–112; b) S. Gabius, N. Yamazaki, W. Hanewacker, H.-J. Gabius, *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 1005–1012; c) M. Monsigny, A.-C. Roche, P. Midoux, *Biol. Cell* **1984**, *51*, 187–196.
- [8] a) Y. C. Lee, R. T. Lee in *Glycoconjugates* (Hrsg.: H. J. Allen, E. C. Kasailus), Marcel Dekker, New York, **1992**, S. 121–165; b) Y. C. Lee, R. T. Lee in *The Glycoconjugates* (Hrsg.: M. I. Horowitz), Academic Press, New York, **1982**, S. 85–104.
- [9] D. T. Connolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, W. R. Bell, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 939–945.
- [10] a) R. Schauer in *Carbohydrates – Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: H. Ogura, A. Hasegawa, T. Suami), VCH, Weinheim, **1992**, S. 340–354; b) Y. C. Lee, R. T. Lee, K. Rice, Y. Ichikawa, T. C. Wong, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 499–506; c) D. Solis, P. Fernández, T. Díaz-Maurino, J. Jiménez-Barbero, M. Martín-Lomas, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 677–683.
- [11] J. Plowman, K. D. Paull, G. Atassi, S. D. Harrison, Jr., D. J. Dykes, H. J. Kabbe, V. L. Narayanan, O. C. Joder, *Invest. New Drugs* **1988**, *6*, 147–153.
- [12] a) S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643–663; b) M. E. Haque, T. Kikuchi, K. Yoshimoto, Y. Tsuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 2243–2255; c) G. Yang, F. Kong, S. Zhou, *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 179–1882; d) W. Liao, Y. Liu, D. Lu, *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 151–154.
- [13] a) R. U. Lemieux, H. Driguez, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4069–4075; b) T. K. Lindhorst, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1991**, *209*, 119–129.
- [14] T. K. Lindhorst, J. Thiem, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, *12*, 1237–1241.
- [15] V. Kolb-Bachofen, J. Schlepper-Schäfer, W. Vogell, H. Kolb, *Cell* **1982**, *29*, 859–866.

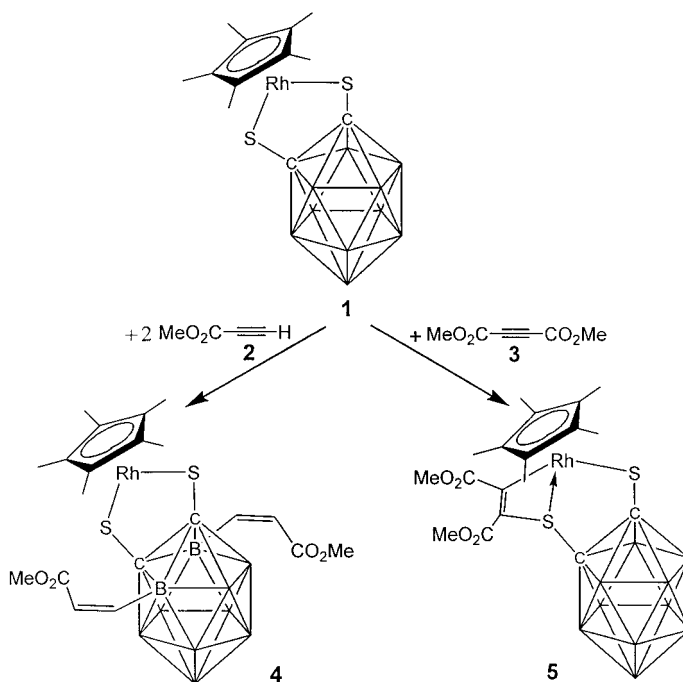
Rhodiuminduzierte selektive B(3)/B(6)-Disubstitution an einem ortho-Carboran-1,2-dithiolat**

Max Herberhold,* Hong Yan, Wolfgang Milius und Bernd Wrackmeyer*

Professor Hubert Schmidbaur zum 65. Geburtstag gewidmet

Seit der Entdeckung des 1,2-Dicarba-closo-dodecaborans(12) hat die Chemie dieses außergewöhnlich stabilen Carborans sowie seiner 1,7- und 1,12-Isomere beträchtliches Interesse gefunden. Obwohl die C-Funktionalisierung schon frühzeitig leicht verwirklicht werden konnte^[1] und in jüngster

Zeit sogar die vollständige Substitution an allen Boratomen gelang,^[2] hat sich die selektive Synthese von B-substituierten Derivaten als schwierig erwiesen.^[3] Wir haben kürzlich über den 16e-Rhodiumkomplex $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{S}_2\text{C}_2(\text{B}_{10}\text{H}_{10}))]$ **1** berichtet^[4] und auf das Synthesepotential solcher Komplexe hingewiesen. Dabei sollten das Elektronendefizit am Rhodiumzentrum, die Reaktivität der Rhodium-Schwefel-Bindungen und die potentielle Aktivierung der B-H-Bindungen des Carboran-Käfigs^[5] in der Nähe des Rhodiumatoms eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang haben wir jetzt die Reaktion von **1** mit Acetylcyclobutylmethylester **2** und Acetylcyclobutylmethylester **3** untersucht (Schema 1).



Schema 1. Umsetzung von **1** zu **4** und **5**.

Im Fall von **2** wurde der B(3)/B(6)-disubstituierte 16e-Komplex **4** isoliert und charakterisiert.^[6] Dagegen führte die Reaktion von **1** mit **3** zum 18e-Komplex **5** als einzigem Produkt.^[7] Bereits früher war bei einer rhodiumkatalysierten Reaktion die Entstehung eines 16e-CpRh-Dithiolen-Komplexes als Zwischenstufe vorgeschlagen worden, die mit **3** ein zu **5** analoges Addukt gibt.^[8] Vor kurzem wurde der 16e-Komplex $[\text{CpCo}(\text{S}_2\text{C}_2(\text{B}_{10}\text{H}_{10}))]$ beschrieben,^[9] der zu **1** analog ist. Die Reaktionen dieses CpCo-Komplexes sowohl mit **3** als auch mit terminalen Alkinen haben Addukte ergeben, deren Molekülstrukturen der von **5** ähneln und die sich – ebenso wie **5** – nicht weiter umlagern. Deshalb liegt es nahe, die Molekülstruktur von **5** als typisch für eine Zwischenstufe anzusehen, die auch bei der Reaktion von **1** mit dem monosubstituierten Acetylen **2** durchlaufen wird, aber nicht detektiert wurde.

Die Molekülstrukturen von **4**^[10] und **5**^[10] sind in den Abbildung 1 und 2 gezeigt. In **4** liegt ein planarer Rhodadi-thiolen-Fünfring vor, wie er für einen 16e-Komplex zu erwarten ist.^[9, 11, 12] Diese Elektronenbilanz ist auch im Einklang mit der magnetischen Entschirmung des ¹⁰³Rh-Kerns

[*] Prof. Dr. M. Herberhold, Dr. H. Yan, Dr. W. Milius, Prof. Dr. B. Wrackmeyer
Laboratorium für Anorganische Chemie der Universität
D-95440 Bayreuth
Fax: (+49) 921-552157
E-mail: max.herberhold@uni-bayreuth.de
b.wrack@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.