

**Glyceroglycophospholipid (Glc-PC),
ein neuartiges glucosidisches Phospholipid****

Michael Mickeleit, Thomas Wieder, Klaus Buchner,
Christoph Geilen, Johann Mulzer* und
Werner Reutter*

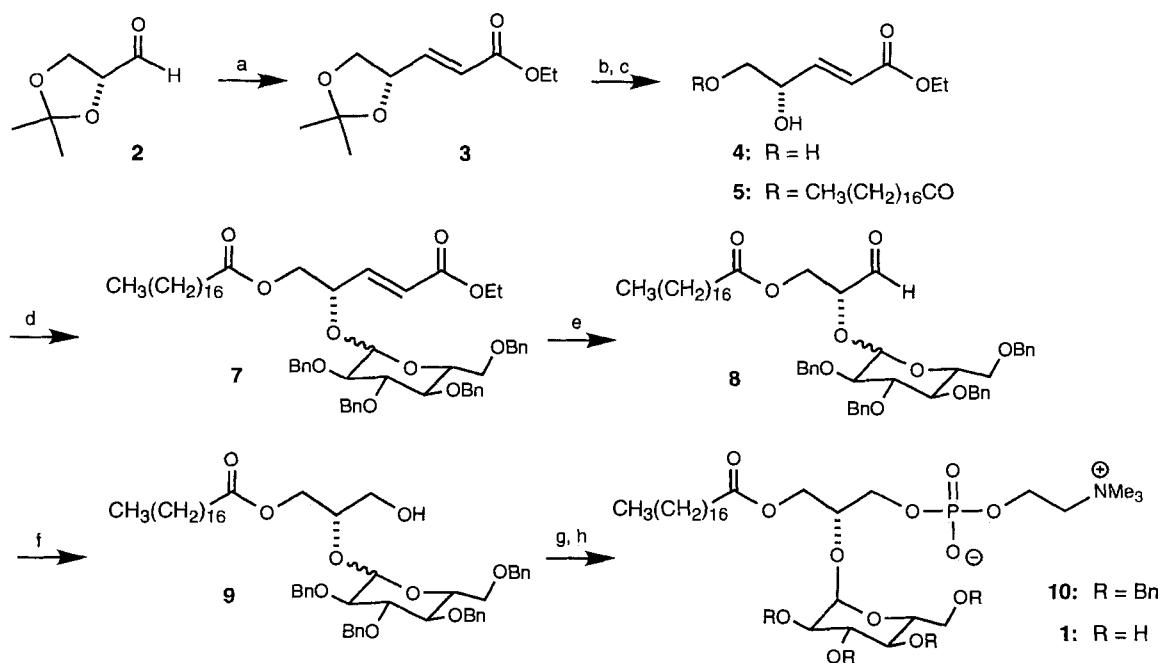
Professor Richard R. Schmidt zum 60. Geburtstag gewidmet

Phospholipide wie das Phosphatidylcholin(PC) sind Grundbausteine biologischer Membranen. Neben ihren strukturbildenden Eigenschaften besitzen Phospholipide wichtige Funktionen bei der zellulären Signaltransduktion^[1] und bei der Regulation von Enzymaktivitäten^[2]. Die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von 2-O-Alkyl- und 2-O-Acyl-Derivaten des 2-Lysophosphatidylcholins ist schon seit längerer Zeit bekannt^[3]; insbesondere der antiproliferative Effekt dieser Substanzen hat den Anstoß zur Entwicklung von Wirkstoffen zur Bekämpfung von Hautkrankheiten (z.B. Hautmetastasen) gegeben^[4]. Die Unterdrückung der cytotoxischen Aktivität ohne Beeinträchtigung der Proliferationshemmung war bislang ein großes Problem. Es gelang uns jetzt, mit der Synthese des neuartigen Glyceroglycophospholipids (Glc-PC) **1** eine Lösung dieses Problems zu finden (Schema 1). Als Ausgangsstoff dient der

(*R*)-Isopropylidenglycerinaldehyd **2**^[5], der zur besseren Differenzierung der quasi-enantiotopen Endgruppen ins Olefin **3** umgewandelt wird. Diese ungewöhnliche „Schutzgruppe“ vermindert bei der späteren 2-Glycosidierung vorteilhaft die sterische Hinderung und kann unter äußerst milden Bedingungen (Ozonolyse/Reduktion) ohne Gefahr einer 1,3-Acylwanderung abgespalten werden. Nach saurer Hydrolyse des Acetonidrings zum Diol **4** gelingt die hochselektive Monoacylierung der primären OH-Funktion zum Ester **5**, der nach Mukaiyama^[6] mit dem Glycosylfluorid **6**^[7] in das Anomerengemisch **7** ($\alpha:\beta = 9:1$) überführt wird.

Bevor das Phosphat als letzter Glycerinsubstituent eingeführt werden kann, wird die anfangs erzeugte Doppelbindung zum Aldehyd **8** oxidiert und dieser zum Alkohol **9** reduziert. Die selektive Reduktion von **8** ohne Gefährdung des Stearoylestesters^[8] gelingt mit Zinkboranat in Ether als Reduktionsmittel^[9]. Der Alkohol wird mit Phosphorylchlorid verestert und der Dichlorester direkt mit Cholintosylat zum Phosphocholin **10** umgesetzt^[10, 11].

Nicht ganz überraschend bereitet die Entfernung der Benzylschutzgruppen erhebliche Probleme, da sich die Stearoylgruppe unter hydrogenolytischen Bedingungen als labil erwies. Erst nach sorgfältiger Optimierung gelingt die Reaktion mit guten Ausbeuten. Man erhält **1** über insgesamt acht Stufen mit 22 %



Schema 1. Synthese von **1** und **10**; a) Triethylphosphonoacetat, NaH, THF, -20 °C (84%); b) AcOH/H₂O (60/40) (81%); c) CH₃(CH₂)₁₆COCl, DMAP, py, 0 °C (75%); d) 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-β-D-glucopyranosylfluorid **6**, AgClO₄, SnCl₂, Molekularsieb 4 Å, Et₂O, -15 °C (89%); e) 1. O₃, CH₂Cl₂, -78 °C; 2. Ph₃P (89%); f) Zn(BH₄)₂, Et₂O, 0 °C (75%); g) 1. POCl₃, Et₃N, CHCl₃, 0 °C; 2. Cholintosylat, py, 0 °C (67%). h) H₂ (2 atm), Pd/C (5%), CH₃OH, 12 d (81%); DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, py = Pyridin.

[*] Prof. Dr. J. Mulzer, Dr. M. Mickeleit
Institut für Organische Chemie der Universität
Marie-Curie-Straße 11, D-60439 Frankfurt am Main
Telefax: Int. + 69/798 2 94 64

Prof. Dr. W. Reutter, Dr. T. Wieder, Dr. Dr. C. Geilen
Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität
Arnimallee 22, D-14195 Berlin-Dahlem
Telefax: Int. + 30/8 38 21 41

Dr. Klaus Buchner, Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin
[*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Sonnenfeld-Stiftung unterstützt.

Gesamtausbeute im Grammaßstab. Die Acyl- und Glycosylreste dürfen weitgehend variabel sein (spektroskopische Daten siehe Tabelle 1).

Im biologischen Test wurde die Cytotoxizität in einem serumfreien Zellkultursystem bestimmt. Abbildung 1B zeigt, daß Glc-PC **1** bis 10 μmol L⁻¹ nicht toxisch ist (Viabilität > 95%). Das geschützte Zwischenprodukt **10** (Bn-PC) ist selbst in Konzentrationen von 1000 μmol L⁻¹ nur von geringer Wirkung (Abb. 1A).

Bei nicht-toxischen Konzentrationen hemmt **1** die Proliferation von Human-Keratinocyten(HaCaT)-Zellen. Bei 10 μmol L⁻¹

Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Eigenschaften und spektroskopische Daten von **10** und **1**.

10: farbloses Öl; $[\alpha]_D^{20} = +53.7$ ($c = 1.35$ in CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (t, $J = 6.25$ Hz, 3H), 1.18–1.30 (m, 28H), 1.53 (m, 2H), 2.23 (t, $J = 6.25$ Hz, 2H), 3.18 (s, 9H), 3.44–3.54 (m, 2H), 3.56 (dd, $J = 10.0, 3.75$ Hz, 1H), 3.61–3.64 (m, 1H), 3.64–3.69 (dd, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.71–3.75 (dd, $J = 10.0, 3.75$ Hz, 1H), 3.89–3.94 (dd, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.96–4.03 (m, 3H), 4.09–4.14 (m, 1H), 4.14–4.21 (m, 3H), 4.30 (dd, $J = 10.0, 3.75$ Hz, 1H), 4.42–4.93 (m, 8H), 5.21 (d, $J = 3.75$ Hz, 1H), 7.12–7.40 (m, 20H); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2925, 2853, 1731, 1456, 1453, 1249, 1091, 1069 \text{ cm}^{-1}$; MS (FAB $^+$): m/z (%): 1047 (0.7), 524 (3.2), 224 (4.8), 91 (100).

1: farbloser, amorpher Feststoff; Schmp. 185 °C; $[\alpha]_D^{20} = +61.3$ ($c = 1$ in CH_3OH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.90$ (t, $J = 6.25$ Hz, 3H), 1.23–1.36 (m, 28H), 1.60 (m, 2H), 2.36 (t, $J = 6.25$ Hz, 2H), 3.23 (s, 9H), 3.30 (m, 1H), 3.32 (dd, $J = 8.75$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 10.0, 3.75$ Hz, 1H), 3.59–3.65 (m, 3H), 3.67–3.78 (m, 2H), 3.97–4.04 (m, 2H), 4.08 (m, 1H), 4.21–4.33 (m, 4H), 5.04 (d, $J = 3.75$ Hz, 1H); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3387, 2922, 1794, 1645, 1467, 1229, 1086, 1053 \text{ cm}^{-1}$; MS (FAB $^+$): m/z (%): 686 (8.5), 524 (4.9), 420 (4.6), 241 (5.2), 224 (19.1), 184 (74.0), 166 (20.7), 86 (54.9)

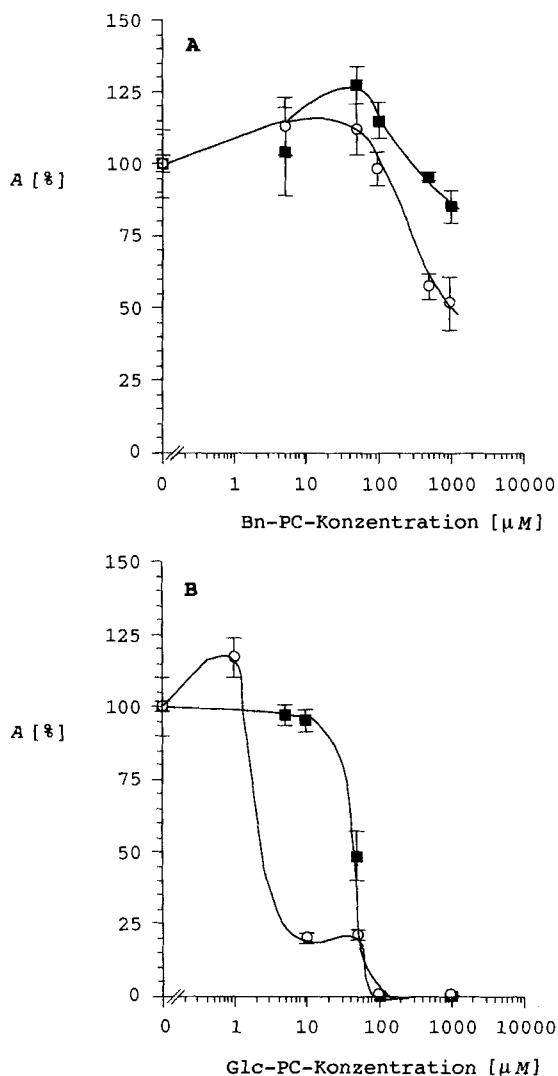


Abb. 1. Einfluß von **1** und **10** auf die Viabilität (■) und Proliferation (○) von HaCaT-Zellen. Konfluente HaCaT-Zellen wurden 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Bn-PC **10** (A) oder Glc-PC **1** (B) behandelt. Kontrollen enthielten Dimethylsulfoxid (DMSO) (A) oder keine Zusätze (B). Nach der Inkubationszeit wurde die Viabilität der Zellen wie unter *Experimentelles* beschrieben bestimmt (■). Angegeben ist der prozentuale Anteil A des Kontrollperiments \pm Standardabweichung ($n = 4$). HaCaT-Zellen (20 000 Zellen/ cm^2) wurden 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen **10** (A) oder **1** (B) behandelt. Kontrollen enthielten DMSO (A) oder keine Zusätze (B). Nach der Inkubation wurde die Zellzahl anhand der Kristallviolett-Methode bestimmt (○). Angegeben ist der prozentuale Anteil A des Kontrollperiments \pm Standardabweichung ($n = 4$).

betrug die Hemmung der Proliferation 80% (Abb. 1 B). Ähnlich den Cytotoxizitätsstudien wirkte **10** nur bei Konzentrationen $> 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ antiproliferativ, was wahrscheinlich auf eine unspezifische Zellschädigung zurückzuführen ist (Abb. 1 A).

Eine Enzymfamilie, die eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation spielt, wird von Isoformen der Proteinkinase C (PKC) gebildet^[12]. Es lag daher nahe, den Effekt von **1** auf die PKC-Aktivität zu untersuchen. Wie bereits früher für 2-Lysophosphatidylcholin^[13] gezeigt, wurde die PKC-Aktivität bei niedrigen Konzentrationen von **1** um bis zu 70% gesteigert. Diese Aktivierung nahm bei hohen Konzentrationen wieder ab (Abb. 2). Im Gegensatz zu 2-Lysophosphatidylcholin wurde die PKC-Aktivität *in vitro* auch bei hohen, toxischen Konzentrationen von **1** nicht gehemmt. Auch die Basalaktivität^[14] wurde nicht beeinflußt.

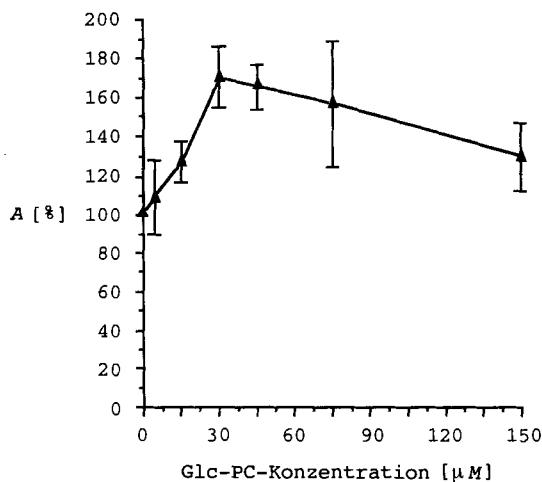


Abb. 2. Einfluß von **1** auf die Aktivität der Proteinkinase C. Die Aktivität der PKC in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Glc-PC **1** wurde bestimmt und als Prozentsatz A der Aktivität unter Kontrollbedingungen aufgetragen. **1** verursacht in Konzentrationen bis zu $100 \mu\text{g L}^{-1}$ eine Erhöhung der Proteinkinase-C-Aktivität mit einer maximalen Aktivierung auf das ca. 1.7fache des Kontrollwertes bei $20\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$. Pro Punkt wurden 4–6 Experimente durchgeführt.

1 ist demnach ein nicht cytotoxischer Proliferationsinhibitor, dessen Hemmwirkung nicht durch Proteinkinase C vermittelt ist. Es muß sich erst noch zeigen, ob diese Besonderheit auf den Glucosidrest zurückzuführen ist, so daß sich die Synthese von weiteren 2-glycosidischen Derivaten anbietet.

Experimentelles

Zellkultur: Die HaCaT-Zellen [15] wurden in Flüssigkulturmöglichkeiten gehalten [16]. Konfluente Zellen wurden mittels einer Lösung (0.1% Trypsin/0.02% Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA)) von der Platte abgelöst und passagiert. Für die Dauer des Experiments wurden die Zellen in serumfreiem Keratinozyten-Wachstumsmedium gehalten. **10** wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (85 mmol L^{-1}) und anschließend mit Keratinozyten-Wachstumsmedium auf die gewünschte Konzentration gebracht. **1** wurde direkt in Keratinozyten-Wachstumsmedium gelöst.

Cytotoxizitätstest: Die Cytotoxizität von **10** und **1** gegenüber HaCaT-Zellen wurde mit dem Trypanblau-Ausschluß-Verfahren gemessen. Konfluente HaCaT-Zellen wurden für 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden synthetisierten Lipide inkubiert. Die Medien wurden abgesaugt, und die Zellen wurden mit phosphatgepuffter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Dann wurde eine Trypanblau-Lösung (0.1% in PBS) zugegeben und blaugefärbte (tote) und ungefärbte (lebende) Zellen unter einem Diavert-Mikroskop gezählt. Pro Experiment wurden mindestens 200 Zellen gezählt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle die Cytotoxizität von **10** und **1** gegenüber HaCaT-Zellen durch Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt [17].

Messung der Proliferation: Der Einfluß von **10** und **1** auf die Proliferation von HaCaT-Zellen wurde mit der Kristallviolett-Methode gemessen [18]. HaCaT-Zellen wurden in einer Zeldichte von ca. 20 000 Zellen/ cm^2 ausgesetzt. Nach Adhäsion der Zellen wurden diese für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen **10** und **1** inkubiert.

biert. Die Medien wurden abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl durch Färbung der Zellen mit einer 0.1%igen Kristallviolettlösung bestimmt [19].

Messung der Proteinkinase-C-Aktivität: Proteinkinase C wurde aus Rinderhirn isoliert [20]. Die Enzymaktivität wurde in einem Reaktionsansatz (Gesamtvolume: 50 μL) bestimmt, der 20 mM Triethanolamin (pH 7.4), 4 mM Mg-Acetat, 0.1 mM CaCl_2 , 50 mM Mercaptoethanol, 0.1 g L^{-1} Histon III S, 50 g L^{-1} Phosphatidylserin, 5 g L^{-1} Diolein und 20 mM ATP, ergänzt mit [γ - ^{32}P]ATP (Gesamtmenge an Radioaktivität 2×10^5 cpm), enthielt. Phosphatidylserin, Diolein und 1 wurden in Methanol/Chloroform (1:1) gelöst. Vor Zugabe zum Reaktionsansatz wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt und der Rückstand in einem geeigneten Volumen von 20 mM Triethanolamin durch Ultraschallbehandlung resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym (10–20 ng) gestartet. Nach 2 min Inkubation bei 30 °C wurden 40 μL des Reaktionsansatzes auf ein Whatman-P81-Filter aufgetragen. Die Filter wurden dreimal in 0.5%iger Phosphorsäure gewaschen und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung in Wasser bestimmt [21, 22].

Eingegangen am 9. Juni 1995 [Z 8079]

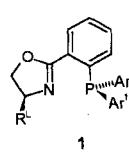
Stichworte: Glycerinaldehyd · Glycosidierungen · Phospholipide · Proliferationsinhibitoren · Proteinkinase C

- [1] D. E. Vance, *Biochem. Cell Biol.* **1990**, *68*, 1151–1165; J. H. Exton, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1–4; S. H. Zeisel, *FASEB J.* **1993**, *7*, 551–557.
- [2] P. C. Choy, D. E. Vance, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 5163–5167; K. Oishi, R. L. Raynor, P. A. Sharp, J. F. Kuo, *ibid.* **1988**, *263*(14), 6865–6871; C. C. Geilen, T. Wieder, W. Reutter, *ibid.* **1992**, *267*, 6719–6724; M. Mosior, R. M. Epand, *Biochemistry* **1993**, *32*, 66–75; C. C. Geilen, A. Haase, T. Wieder, D. Arndt, R. Zeisig, W. Reutter, *J. Lipid Res.* **1994**, *35*, 625–632.
- [3] H. U. Weltzien, O. Westphal, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *709*, 240–243; R. Andreesen, M. Modolell, H. U. Weltzien, H. Eibl, H. H. Common, G. W. Lör, P. G. Munder, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3894–3899; W. E. Berdel, W. R. E. Bausert, V. Fink, J. Rastetter, P. G. Munder, *Anticancer Res.* **1981**, *1*, 345–352; C. C. Geilen, R. Haase, K. Buchner, T. Wieder, F. Hucho, W. Reutter, *Eur. J. Cancer* **1991**, *27*, 1650–1653.
- [4] C. Unger, H. Eibl, H. W. von Heyden, M. Peukert, H. Sindermann, G. A. Nagel, *Oncologie* **1990**, *13*, 56.
- [5] J. Mulzer, A. Angermann, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2843–2846; J. Jurczak, S. Pikul, T. Bauer, *ibid.* **1986**, *42*, 447–488; J. Mann, N. K. Partlett, A. Thomas, *J. Chem. Res.* **1987**, 369.
- [6] T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431–432.
- [7] G. H. Posner, S. H. Haines, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 5–8.
- [8] Unumgänglich ist hier die Verwendung von Benzylschutzgruppen am Kohlenhydrat. Die in der Zuckerchemie häufig benutzten Acetate liefern nur geringe Ausbeuten.
- [9] B. C. Ranu, *Synlett* **1993**, 885–892; W. J. Gensler, F. A. Johnson, A. D. B. Sloan, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6074–6079.
- [10] G. Hirth, H. Saroka, W. Bannwarth, R. Barner, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 1210–1240.
- [11] Auf dieser Stufe lassen sich die bei der Glycosidierung entstandenen Anomere mittels HPLC trennen ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 4:1). Die Endverbindung ist reines α -Anomer.
- [12] M. J. Clemens, I. Trayner, J. Menaya, *J. Cell Sci.* **1992**, *103*, 881–887; Y. Nishizuka, *Science* **1992**, *258*, 607–614.
- [13] K. Oishi, R. L. Raynor, P. A. Sharp, J. F. Kuo, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*(14), 6865–6871.
- [14] Die Messung der Basalaktivität erfolgt ohne Zusatz von Phosphatidylserin/Diolein.
- [15] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N. E. Fusenig, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 761–771.
- [16] Die spontan immortalisierte menschliche Keratinozyten-Zelllinie HaCaT [14] wurde von Dr. N. E. Fusenig (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
- [17] J. G. Culvenor, A. W. Harris, T. E. Mandel, A. Whitelaw, E. Ferber, *J. Immunol.* **1981**, *126*, 1974–1977.
- [18] R. J. Gillies, N. Didier, M. Denton, *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 109–113.
- [19] C. C. Geilen, R. Haase, K. Buchner, T. Wieder, F. Hucho, W. Reutter, *Eur. J. Cancer* **1991**, *27*, 1650–1653.
- [20] H. Krüger, W. Schröder, K. Buchner, F. Hucho, *J. Protein Chem.* **1990**, *9*, 467–473.
- [21] Aufgrund des verwendeten Substrats (Histon) ist die gemessene Aktivität ganz überwiegend auf die „klassischen“ Isoformen der Proteinkinase C (α , β , γ) zurückzuführen. Das Testsystem besteht aus gereinigten Komponenten und enthält daher außer PKC keine anderen Enzyme. Eine Prodrug-Rolle des Glc-PC in bezug auf 2-Lysophosphatidylcholin (LPC) kann daher ausgeschlossen werden.
- [22] M. Liyanage, D. Frith, E. Livneh, S. Stabels, *Biochem. J.* **1992**, *283*, 781–787.

Palladiumkomplex-katalysierte asymmetrische allylische Substitutionen mit Nitromethan: Enantioselektivität mit ee-Werten von über 99.9%**

Heiko Rieck und Günter Helmchen*

Die Umsetzung von Allylacetaten oder -carbonaten mit stabilisierten, weichen Carbanionen wie Malonaten gehört zu den wichtigsten Methoden zur asymmetrischen C-C-Verknüpfung^[1]. In Reaktionen dieses Typs konnte mit Palladiumkomplexen von 4,5-Dihydrooxazolen **1**, die von uns und anderen vor kurzem als chirale Liganden eingeführt wurden, in einigen Fällen ee-Werte > 98% erreicht werden^[2].



	R ^L	Ar ¹	Ar ²
1a	iPr	Ph	Ph
1b	Ph	Ph	Ph
1c	tBu	Ph	Ph
1d	(iBuSCH ₂)Me ₂ C	Ph	Ph
1e	iPr	1-(C ₁₀ H ₇)	Ph
1f	iPr	Ph	1-(C ₁₀ H ₇)
1g	iPr	1-(C ₁₀ H ₇)	1-(C ₁₀ H ₇)

Die konfigurativen Zusammenhänge dieser Substitution am Allylsystem lassen sich allgemein durch einen Übergangszustand beschreiben, der dem Angriff des Nucleophils auf das C-Atom des Allylsystems in *trans*-Position relativ zum Phosphoratom des *exo*-Isomers entspricht^[3] (Abb. 1).

Wir haben nun Nitromethan als Nucleophil eingesetzt, das bisher wegen Mehrfachalkylierung und Nebenproduktbildung wenig untersucht wurde, und dabei die Nitronate **3a–c** mit zum Teil bemerkenswert hohen ee-Werten erhalten. Nitronate sind interessante Nucleophile^[4], weil ihre Reaktionsprodukte in eine Vielzahl synthetisch bedeutsamer Folgeprodukte überführt werden können. Trotzdem wurden Umsetzungen mit chiralen Katalysatoren nur an einer speziellen intramolekularen Reaktion studiert, bei der mit klassischen *C*₂-symmetrischen Diphenosphanen maximal 70% ee erreicht wurden^[5].

Als Allylverbindungen dienten die Carbonate **2a–2c** (Schema 1 und 2). Die Analyse der relativ komplizierten Reaktionsgemische gelang einwandfrei durch Chromatographie (siehe *Experimentelles*). Die für die unkatalysierte Reaktion typische O-Alkylierung von Nitronaten wurde mit Palladiumkomplexen der Dihydrooxazole **1** als Katalysatoren nicht beobachtet. Mit analogen N,S- bzw. N,Se-Liganzen^[3] ließ sich kein oder nur minimaler Umsatz erreichen.

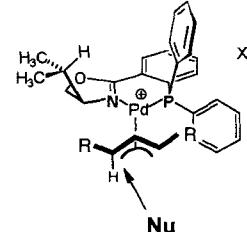


Abb. 1. Postulierter Übergangszustand für die Reaktion eines Nucleophils Nu mit einem Allylpalladiumkomplex des Liganden **1a**.

* Prof. Dr. G. Helmchen, H. Rieck

Organisch-chemisches Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 270, D-69120 Heidelberg
Telefax: Int. + 6221/564205
E-mail: en4@ix.urz.uniheidelberg.de

** Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 247) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. We sentliche Ergebnisse wurden bereits im Poster A-8 des 9th International Symposium on Homogeneous Catalysis, Jerusalem, 21.–26. August 1994, präsentiert.