

Wir konnten somit den Porphobilinogenvorläufer **11** konvergent aus zwei leicht zugänglichen Bausteinen erhalten. Der zentrale Schritt ist die Verknüpfung des regioselektiv hergestellten Silylenolethers **4** als Nucleophil mit dem Acylcyanid **7** als Elektrophil. Die Reduktion des acetylgeschützten Aldolproduktes *rac*-**10** führt direkt zum geschützten Porphobilinogen **11**. Die Synthesesequenz folgt dem von Nandi und Shemin vor rund 30 Jahren gemachten Vorschlag für die Biosynthese. Anders als in allen bereits publizierten Arbeiten werden die korrekt funktionalisierten Seitenketten mit Hilfe der beiden Edukte eingeführt; eine nachträgliche Funktionalisierung ist nicht nötig. Zusätzlich werden in unserer Synthese die Bindungen gebildet, welche in der Biosynthese unter dem Einfluß des Enzyms zustande kommen. Die Gesamtausbeute ausgehend vom 5-Phthalimidolävulinsäuremethylester beträgt 25%. Die Synthese ist darüber hinaus dazu geeignet, selektiv markierte Porphobilinogene herzustellen.

Eingegangen am 21. Juli 1997 [Z10707]

Stichwörter: Aldolreaktionen · Biomimetische Synthese · Bioorganische Chemie · Porphobilinogen · Porphyrinoide

- [1] B. Franck, A. Nonn, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1941–1957; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1795–1811.
- [2] a) R. Neier in *Advances in Nitrogen Heterocycles*, Vol. 2 (Hrsg.: C. J. Moody), JAI Press, Greenwich, **1996**, S. 35–146; b) P. M. Jordan in *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Hrsg.: P. M. Jordan), Elsevier, Amsterdam, **1991**, S. 1–66; c) F. J. Leeper in *Chlorophylls* (Hrsg.: H. Scheer), CRC Press, Boca Raton, **1991**, S. 407–464; d) A. R. Battersby, F. J. Leeper, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1261–1274.
- [3] a) D. Mauzerall, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2605–2609; b) *ibid.* **1960**, *82*, 2601–2605; c) L. F. Tietze, H. Geissler, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1087–1090; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1038–1040.
- [4] a) E. K. Jaffe, J. S. Rajagopalan, *Bioorg. Chem.* **1990**, *18*, 381–394; b) B. Franck, H. Stratman, *Heterocycles* **1981**, *15*, 919–923; c) A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1973**, *35*, 72–79.
- [5] a) D. Shemin in *The Enzymes* (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1972**, S. 323–337; b) D. L. Nandi, D. Shemin, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 1236–1242.
- [6] a) H. Bertschy, A. Meunier, R. Neier, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 828–830; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 777–778; b) A. Meunier, R. Neier, *Synthesis* **1988**, 381–383; c) H. Bertschy, Dissertation, Universität Freiburg im Uechtland, **1991**; d) A. Meunier, Dissertation, Universität Freiburg im Uechtland, **1989**.
- [7] a) T. Mukaiyama, *Org. React.* **1982**, *28*, 203–331; b) *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 858–866; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 817–825; c) K. Banno, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1975**, 741.
- [8] R. B. Frydman, B. Frydman, A. Valasinas in *The Porphyrins*, Vol. VI (Hrsg.: D. Dolphin), Academic Press, New York, **1979**, S. 1–123.
- [9] a) C. Y. De Leon, B. Ganem, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7731–7752; b) *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8730–8731; c) M. Adameczyk, R. E. Reddy, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14689–14700; d) *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9121–9124.
- [10] R. D. Miller, D. R. McKean, *Synthesis* **1979**, 730–732.
- [11] a) S. Murata, R. Suzuki, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3248; b) C. Mukai, S. Hashizume, K. Nagami, M. Hanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1509–1512.
- [12] A. P. Davis, M. Jaspars, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 475–477; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 470–471.
- [13] NMR-Daten des geschützten Porphobilinogens **11**: ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 8.56 (s_{br}, 1H, NH), 7.83–7.76 (m, 2H, HC5⁴, HC5⁴), 7.73–7.67 (m, 2H, HC5⁵, HC5⁵), 6.49 (d, J = 2.7 Hz, 1H, HC2), 4.80 (s, 2H, H₂C5¹), 3.67 (s, 3H, H₃C3⁴), 3.65 (s, 3H, H₃C3⁵), 3.64 (s,

2H, H₂C4¹), 2.72 (triplettoid, J ≈ 7.6 Hz, 2H, H₂C3¹), 2.53 (triplettoid, J ≈ 7.3 Hz, 1H, H₂C3²); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.4 (s, C3³), 173.1 (s, C4²), 169.0 (s, C5², C5²), 134.7 (d, C5⁵, C5⁵), 132.7 (s, C5³, C5³), 125.3 (s, C5), 124.0 (s, C5⁴, 5⁴), 122.2 (s, C4), 116.0 (d, C2), 113.7 (s, C3), 52.6 (q, C3⁴), 52.1 (q, C4³), 35.3 (t, C3²), 33.0 (t, C5¹), 30.3 (t, C4¹), 21.2 (t, C3¹).

- [14] G. W. Kenner, J. Rimmer, K. M. Smith, J. F. Unsworth, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 332–340.

Ein Glucose-haltiges Etherlipid (Glc-PAF) als antiproliferatives Analogon zum Plättchen-aktivierenden Faktor**

Michael Mickleit, Thomas Wieder, Michael Arnold, Christoph C. Geilen, Johann Mulzer und Werner Reutter*

Der Plättchen-aktivierende Faktor (platelet activating factor, PAF) ist schon lange als biologisch hochaktives Phosphoglycerid bekannt,^[1] und PAF-Analoga wurden als Proliferationshemmstoffe beschrieben.^[2] Wegen ihrer starken Cytotoxizität ist der therapeutische Einsatz von synthetischen Phospholipiden bislang allerdings auf das Indikationsgebiet der Haut beschränkt.^[3] Nachdem wir über die Synthese eines neuartigen Glyceroglucolecithins (Glc-PC) berichtet haben,^[4] welches bei Konzentrationen ≤ 10 μmol L⁻¹ antiproliferative Wirkung zeigt und dabei nicht cytotoxisch ist, stellen wir nun das glycosidierte Etheranalogon [1-*O*-Octadecyl-2-*O*- α -D-glucoopyranosyl-*sn*-glycero(3)]phosphocholin (Glc-PAF) **1** vor. Glc-PAF läßt sich aus dem PAF durch Austausch der 2-Acylgruppe gegen ein Glucosemolekül ableiten.

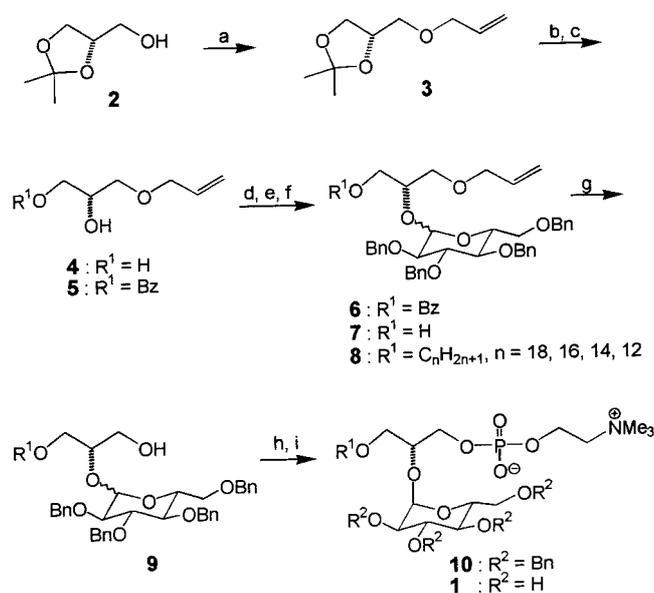
Die Ausgangsverbindung der Synthese, (*S*)-Isopropylidenglycerin **2**,^[5] enthält bereits das Glyceringrundgerüst (Schema 1). Sie wird zur Differenzierung der Endgruppen als Allylether **3** geschützt. Das durch saure Hydrolyse freigesetzte Diol **4** kann nicht direkt an der primären Position verethert werden, so daß zunächst endständig der Benzoatester **5** hergestellt wird.^[6] Dieser wird dann nach Mukaiyama et al.^[7] mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- β -D-glucoopyranosylfluorid^[8] ins Glycosid **6** überführt.^[9] Nach Benzoatverseifung zu **7** erfolgt eine Veretherung mit den entsprechenden Alkylbromiden. Die Kettenlänge der linearen Alkylgruppen (C₁₈, C₁₆, C₁₄ und C₁₂) am Ether orientiert sich an den biologisch relevanten Derivaten, da die Wirkung cholinhaltiger Phos-

[*] Prof. Dr. W. Reutter, Dr. T. Wieder
Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität
Arnimallee 22, D-14195 Berlin
Telefax: Int. + 30/8382141

Prof. Dr. J. Mulzer
Institut für Organische Chemie der Universität Wien
Dr. M. Mickleit
Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin
Priv.-Doz. Dr. Dr. C. Geilen, M. Arnold
Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin
Freie Universität Berlin

[**] Die Untersuchungen wurden von dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (WR), zentralen Mitteln der Freien Universität Berlin, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ge 641/3-3) unterstützt.

pholipidanaloga sehr von dieser Länge abhängt.^[10] Die Etherbildung ist stark temperaturabhängig, erst bei 80 °C findet eine vollständige Umsetzung zu **8** statt. Die anfangs



Scheme 1. Synthese von **1**. a) NaH, Allylbromid, THF, 0 °C; 98%; b) AcOH/H₂O (60/40); 73%; c) BzCl, DMAP, py, 0 °C; 76%; d) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosylfluorid, AgClO₄, SnCl₂, 4 Å Molekularsieb, Et₂O, -15 °C; 81%; e) KOH/MeOH (30%), MeOH; 91%; f) NaH, RBr, THF, 80 °C; 83%–98%; g) Pd/C (10%), *p*-Toluolsulfonsäure, MeOH/*i*PrOH/H₂O (4/4/1), 80 °C; 70%–94%; h) 1. POCl₃, Et₃N, CHCl₃, 0 °C; 2. Cholintosylat, py, 0 °C; 47%–74%; i) H₂ (2 atm), Pd/C (5%), MeOH; 71%–97%. Bn = Benzyl, Bz = Benzoyl, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, py = Pyridin, R = C_nH_{2n+1}, n = 18, 16, 14, 12.

erzeugte Allyletherfunktion wird dann hydrogenolytisch^[11] gespalten, wobei der Alkohol **9** erhalten wird. Dieser wird mit Phosphorylchlorid verestert und der Dichlorester unverzüglich mit Cholintosylat zum Phosphocholin-Derivat **10** umgesetzt.^[12, 13] Die Abspaltung der Benzylschutzgruppen bereite bei der analogen Esterverbindung Glc-PC erhebliche Probleme. Die Ether erweisen sich jedoch als wesentlich reaktiver und liefern die Produkte in guten Ausbeuten schon nach kurzer Hydrierdauer. **1** läßt sich somit aus **2** in neun Stufen mit 25% Gesamtausbeute im Grammaßstab synthetisieren.^[14]

Die biologische Wirkung von **1** wurde in einem serumfreien Zellkultursystem an humanen Keratinocyten (HaCaT-Zellen) durch Messung dreier typischer Zellparameter bestimmt. Zunächst zeigte sich, daß **1** (n = 18) bei Konzentrationen < 4 μmolL⁻¹ nicht toxisch ist (Abb. 1a). Bei höheren Konzentrationen ist allerdings eine deutliche Zellschädigung zu erkennen, wobei die mittlere tödliche Dosis (LD₅₀) 9 μmolL⁻¹ beträgt.

In einem weiteren Versuch prüften wir die wachstumshemmenden Eigenschaften. **1** (n = 18) wirkt bereits bei nicht-toxischen Konzentrationen ≤ 4 μmolL⁻¹ antiproliferativ (Abb. 1b), und es läßt sich aus der Hemmkurve eine halbmaximale Inhibitorkonzentration (IC₅₀) von 4.8 μmolL⁻¹ ermitteln. Diese liegt deutlich unterhalb des LD₅₀-Werts. Wegen der detergensartigen Struktur von **1** kann der cytotoxische Effekt einerseits auf einer Lyse der Zellen beruhen, andererseits aber auch durch Einleitung eines definierten Zell-

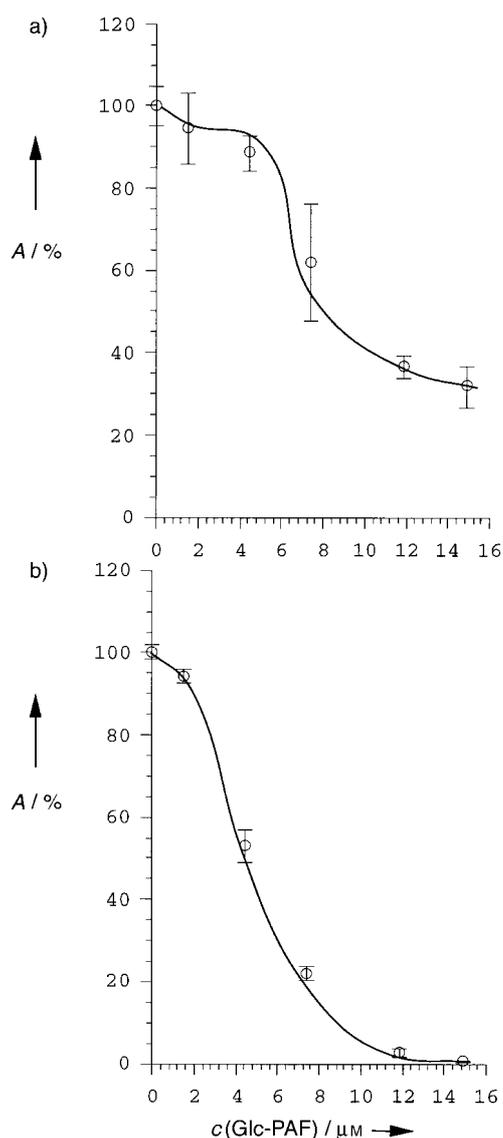


Abb. 1. Einfluß von **1** (n = 18) auf die Viabilität (a) und Proliferation (b) von HaCaT-Zellen. Aufgetragen ist jeweils der prozentuale Anteil *A* der Meßgröße bezogen auf das Kontrollexperiment bei verschiedenen Konzentrationen *c*. Durchgeführt wurden vier Experimente pro Meßpunkt. Für Details siehe *Experimentelles*.

todprogramms, der sogenannten Apoptose,^[15] hervorgerufen werden, die sich durch das Auftreten von regelmäßigen, internucleosomalen DNA-Bruchstücken^[16] identifizieren läßt. Um den durch **1** verursachten Zelltod näher zu charakterisieren, bestimmten wir daher den Anteil apoptotischer HaCaT-Zellen durch Messung cytosolischer Nucleosomen nach 20 h Behandlung mit dem synthetischen Etherlipid. Es zeigte sich, daß **1** (n = 18) bei niedrigen, bereits antiproliferativ wirksamen Konzentrationen von 1.5, 4.5 und 7.4 μmolL⁻¹ die Zahl apoptotischer Zellen bis auf das zehnfache erhöht (Abb. 2). Höhere Konzentration (14.9 und 29.8 μmolL⁻¹) führten zu einem stark verringerten Nachweis cytosolischer Nucleosomen und damit apoptotischer Zellen, was darauf hinweist, daß die Zellen bei diesen Konzentrationen lytisch geschädigt wurden. **1** ist demnach ein Proliferationsinhibitor, der bei Konzentrationen < 7.5 μmolL⁻¹ den programmierten Zelltod in Keratinocyten auslöst. Im Ver-

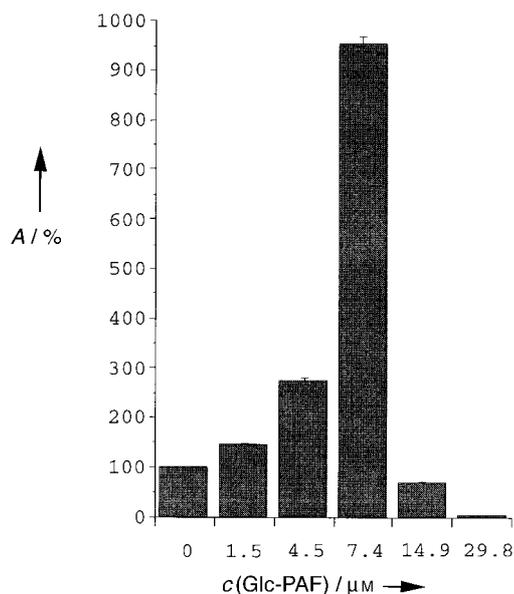


Abb. 2. Einfluß von **1** ($n=18$) auf die Apoptose von HaCaT-Zellen. Angegeben ist die prozentuale Anreicherung A an apoptotischen Zellen im Vergleich mit dem Kontrollexperiment bei verschiedenen Konzentrationen c . Durchgeführt wurden vier Experimente pro Meßpunkt. Für Details siehe *Experimentelles*.

gleich mit dem bereits erwähnten Glc-PC ($\text{LD}_{50} = 17 \mu\text{molL}^{-1}$ und $\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{molL}^{-1}$ unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen) ist **1** ($n=18$) die biologisch aktivere, jedoch auch stärker toxische Substanz. Zur Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser neuartigen Verbindungen müssen weitere Derivate mit anderen 2-glycosidischen Substituenten und unterschiedlichen Alkylseitenketten synthetisiert werden.

Experimentelles

Zellkultur: Die spontan immortalisierte humane Keratinocyten-Zelllinie HaCaT^[17] wurde für die Dauer des Experiments in serumfreiem Keratinocyten-Wachstumsmedium^[18] inkubiert. **1** wurde direkt darin gelöst.

Kontrolle: Die Kontrollexperimente enthielten kein **1**.

Cytotoxizitätstest: Konfluente HaCaT-Zellen wurden 6 h mit **1** in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Cytotoxizität von **1** für HaCaT-Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurde durch Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wie beschrieben^[19] bestimmt.

Messung der Proliferation: HaCaT-Zellen wurden in einer Zelldichte von ca. 20000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurden diese 48 h mit **1** in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl durch Färbung mit einer 0.1proz. Kristallviolett-Lösung in Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) im Vergleich zur Kontrolle wie beschrieben^[20] bestimmt.

Messung der Apoptose: Konfluente und an Keratinocyten-Wachstumsmedium adaptierte HaCaT-Zellen wurden 20 h mit **1** in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Das Medium wurde abgenommen, die adhären Zellen wurden mit einer Lösung (0.1% Trypsin/0.02% Ethylen-diamintetraessigsäure, EDTA) von der Schale gelöst, mit serumhaltigem Medium (10% fötales Kälberserum in Rosewell-Park-Memorial-Institute(RPMI)-Medium) abgespült und mit dem abgenommenen Medium vereinigt. Die Zellen wurden 5 min bei 300 g pelletiert, einmal mit serumhaltigem RPMI-Medium gewaschen und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Lysispuffer 30 min inkubiert und das Lysat 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Danach wurden die im Lysat enthaltenen Nucleosomen mit einem käuflichen Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) der Firma Boehringer Mannheim nach den Angaben des

Herstellers im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Dazu wurden 20 μL der jeweiligen Probe in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert, 80 μL Immunreagens (bestehend aus 1 Teil Peroxidase-konjugiertem Anti-DNA-Antikörper, 1 Teil biotinyliertem Anti-Histon-Antikörper und 18 Teilen Inkubationspuffer) hinzugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer wurde die Menge an gebundenem Peroxidase-konjugiertem Anti-DNA-Antikörper durch eine Peroxidase-katalysierte Farbreaktion bei 405 nm im ELISA-Reader bestimmt. Die Anreicherung an apoptotischen Zellen wurde aus der Extinktion der behandelten Proben bezüglich der der Kontrolle berechnet. Die Spezifität der Methode wurde mit Apoptose-induzierenden Substanzen (zellmembrangängige Ceramide) und der Elektronenmikroskopie (zur Feststellung Apoptose-spezifischer morphologischer Veränderungen) überprüft.

Eingegangen am 2. Juli 1997 [Z10624]

Stichwörter: Apoptose • Glycoside • Phospholipide • Plättchen-aktivierender-Faktor • Proliferationsinhibitoren

- [1] D. J. Hanahan, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 483–509.
- [2] M. Modollel, R. Andreesen, W. Pahlke, U. Brugger, P. G. Munder, *Cancer Res.* **1979**, 39, 4681–4686; E. M. Scholar, *Cancer Lett.* **1986**, 33, 199–204; T. Wieder, A. Haase, C. C. Geilen, C. E. Orfanos, *Lipids* **1995**, 30, 389–393.
- [3] C. Unger, W. Damenz, E. A. M. Fleer, D. J. Kim, A. Breiser, P. Hilgard, J. Engel, G. Nagel, H. Eibl, *Acta Oncol.* **1989**, 28, 213–217; S. Clive, R. C. F. Leonard, *Lancet* **1997**, 349, 621–622.
- [4] M. Mickleit, T. Wieder, K. Buchner, C. Geilen, J. Mulzer, W. Reutter, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2879–2881; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2667–2669.
- [5] R. M. Hanson, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 437–475.
- [6] Zu 9% entsteht das Dibenzoat, zu 12% das regioisomere Monobenzoat. Die Regioisomere lassen sich durch präparative HPLC trennen.
- [7] T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431–432.
- [8] G. H. Posner, S. H. Haines, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5–8.
- [9] Die Anomere entstehen im Verhältnis $\alpha:\beta = 9:1$.
- [10] C. C. Geilen, A. Haase, T. Wieder, D. Arndt, R. Zeisig, W. Reutter, *J. Lipid Res.* **1994**, 35, 625–632.
- [11] R. Boss, R. Scheffold, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 578–579; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 558–559.
- [12] G. Hirth, H. Saroka, W. Bannwarth, R. Barner, *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 1210–1240.
- [13] An dieser Stelle werden die Anomere mittels HPLC getrennt ($\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 4:1$). Die Endverbindung **1** ist reines α -Anomer.
- [14] Ausgewählte physikalische Eigenschaften und spektroskopische Daten von **1** ($n=18$): farblos, amorpher Feststoff; Schmp. 225 °C, $[\alpha]_D^{20} = +50.9$ ($c = 0.7$ in CH_3OH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.90$ (t, $J = 6.25$ Hz, 3 H), 1.18–1.38 (m, 30 H), 1.56 (m, 2 H), 3.20 (s, 9 H), 3.31–3.49 (m, 4 H), 3.58–3.80 (m, 8 H), 3.95–4.08 (m, 3 H), 4.30 (m, 2 H), 5.06 (d, $J = 3.75$ Hz, 1 H); MS (FAB⁺): m/z (%): 672 (4.0), 510 (5.6), 224 (9.4), 184 (39.4), 166 (26.4), 86 (100), 58 (65.7).
- [15] J. Kerr, A. Wyllie, A. Currie, *Br. J. Cancer* **1972**, 26, 239–257.
- [16] A. Wyllie, *Nature* **1980**, 284, 555–556.
- [17] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N. E. Fusenig, *J. Cell Biol.* **1988**, 106, 761–771. Die Zellen wurden von Dr. N. E. Fusenig (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt und in Flüssigkulturmedium gehalten.
- [18] C. C. Geilen, M. Bektas, T. Wieder, C. E. Orfanos, *FEBS Lett.* **1996**, 378, 88–92.
- [19] J. G. Culvenor, A. W. Harris, T. E. Mandel, A. Whitelaw, E. Ferber, *J. Immunol.* **1981**, 126, 1974–1977.
- [20] R. J. Gillies, N. Didier, M. Denton, *Anal. Biochem.* **1986**, 159, 109–113; C. C. Geilen, R. Haase, K. Buchner, T. Wieder, F. Hucho, W. Reutter, *Eur. J. Cancer* **1991**, 27, 1650–1653.