

Schema 2. a) TMSCl, NaI, Et₃N, CH₃CN, 50 °C, 3 h; b) 1.1 Äquiv. *m*-CPBA, Hexan-CH₂Cl₂ (2:1), -15 °C → RT, 2 h; c) H₅IO₆, THF-H₂O (2:1), RT, 2 h, dann I₂, NaHCO₃, RT, 40 h, 50% (drei Stufen); d) 0.05 Äquiv. Camphersulfonsäure (CSA), CH(OOMe)₃, MeOH, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 90%; e) 3 Äquiv. Allyltributylzinn, 0.15 Äquiv. Azobisisobutyronitril (AIBN), Toluol, 80 °C, 4 h, 80%; f) Lithiumdiisopropylamid (LDA), HMPA, THF, -78 °C, 30 min, dann MeI, -78 °C, 1.5 h, 73%; g) 5 Äquiv. Et₃SiH, 2.2 Äquiv. BF₃ · OEt₂, CH₃CN, 0 °C, 50 min, 82%; h) kat. OsO₄, NaIO₄, THF-H₂O (2:1), RT, 1 h, 75%; i) 1,2-Ethandithiol, BF₃ · OEt₂, CH₂Cl₂, -15 °C, 45 min, 81%; j) Raney-Ni (W-2), EtOH, Rückfluß, 2 h, 85%; k) Methansulfonsäurechlorid (MsCl), Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 30 min, 88%; l) NaI, Aceton, Rückfluß, 2 h, 98%; m) 10 Äquiv. TMSI, CH₂Cl₂, RT, 5 h; n) CH₃CN, Rückfluß, 1 h, 70% (zwei Stufen).

leicht zugänglichen Komponenten **7**, **8** und **9** in konvergenter Weise hergestellt wird sowie durch den effizienten Aufbau des tricyclischen A,B,D-Gerüstes **16**. Die asymmetrische Synthese von Tuberostemonin **2** nach diesem Konzept wird zur Zeit untersucht.

Eingegangen am 27. November 1995 [Z 8598]

Stichworte: Alkaloide · Asymmetrische Synthesen · (-)-Stenin
Totalsynthesen

- [1] a) M. Gotz, O. E. Edwards in *The Alkaloids*, Vol. IX (Hrsg.: R. H. F. Manske), Academic Press, New York, 1967, S. 545; b) M. Gotz, G. M. Strunz in *Alkaloids: MTP International Review of Sciences, Series One*, Vol. IX (Hrsg.: K. Wiesner), Butterworth, London, 1973, S. 143.
- [2] a) S. Uyeo, H. Irie, H. Harada, *Chem. Pharm. Bull.* **1967**, *15*, 768–770; b) H. Harada, H. Irie, N. Masaki, K. Osaki, S. Uyeo, *Chem. Commun.* **1967**, 460–462; c) O. E. Edwards, G. Feniak, K. L. Handa, *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 455–462; d) W.-H. Lin, Y. Ye, R.-S. Xu, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 571–576.
- [3] H. Shinozaki, M. Ishida, *Brain Res.* **1985**, *334*, 33–40.
- [4] Totalsynthesen von *Stemona*-Alkaloiden: a) D. R. Williams, D. L. Brown, J. W. Benbow, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1923–1925; b) C.-Y. Chen, D. J. Hart, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3840–3849; c) D. R. Williams, J. P. Reddy, G. S. Amato, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6417–6420; Synthesekonzepte für *Stemona*-Alkaloiden: d) M. Haruna, T. Kobayashi, K. Ito, *Tennen Yuki Kagoubutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1985**, *27*, 200–207 [*Chem. Abstr.* **1986**, *105*, 79195k]; e) L. Xiang, A. P. Kozikowski, *Synlett* **1990**, 279–281; f) S. F. Martin, J. W. Corbett, *Synthesis* **1992**, 55–57; g) R. L. Beddoes, M. P. H. Davies, E. J. Thomas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 538–540; h) P. Wipf, Y. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5477–5480; i) Y. Morimoto, K. Nishida, Y. Hayashi, H. Shirahama, *ibid.* **1993**, *34*, 5773–5776; j) Y. Morimoto, M. Iwahashi, *Synlett* **1995**, 1221–1222.
- [5] Während unser Manuskript bei dieser Zeitschrift eingereicht wurde, veröffentlichten Wipf et al. eine weitere Totalsynthese von (-)-Stenin 1: P. Wipf, Y. Kim, D. M. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11106–11112.
- [6] Bemerkenswert ist die Arbeit von Overman auf dem Gebiet der enantioselektiven Synthese komplizierter Alkaloide. Vgl. beispielsweise die folgenden neueren Veröffentlichungen: a) L. E. Overman, M. H. Rabinowitz, P. A. Renhowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2657–2658; zit. Lit.; b) C. Y. Hong, N. Kado, L. E. Overman, *ibid.* **1993**, *115*, 11028–11029; zit. Lit.; c) S. D. Knight, L. E. Overman, G. Paireaudieu, *ibid.* **1993**, *115*, 9293–9294, zit. Lit.
- [7] Ein weiteres, dieser Methode eng verwandtes Beispiel gibt Lit. [4f]. Wir danken Prof. S. F. Martin (The University of Texas, Austin) für einen Nachdruck.

- [8] Übersichtsartikel über intramolekulare Diels-Alder-Reaktionen: E. Ciganek in *Organic Reactions*, Vol. 32 (Hrsg.: W. G. Dauben), Wiley, New York, 1984, S. 1; Übersichtsartikel über asymmetrische Diels-Alder-Reaktionen: W. Oppolzer, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 840–854; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 876–889.

- [9] D. A. Evans, K. T. Chapman, J. Bisaha, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1238–1256.

- [10] Das Dithian **8** wurde aus 2-(3-Hydroxypropyl)-1,3-dithian [11] durch Schützen als THP-Ether hergestellt.

- [11] Y. Wu, E. Ohlsson, *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 422–424.

- [12] Das Dienylichlorid **7** wurde in fünf Stufen aus kommerziell erhältlichen 1,5-Pentandiol durch die folgende konventionelle Sequenz erhalten werden: a) NaH, MPNCl, 73%; b) Swern-Oxidation, 89%; [13]; c) LDA, Triethyl-4-phosphonocrotonat, HMPA, THF, 70%; d) DIBALH, 98%; e) *n*BuLi, MsCl, THF.

- [13] A. J. Mancuso, S.-L. Huang, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480–2482.

- [14] M. W. Rathke, M. Nowak, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2624–2626.

- [15] Das chirale Phosphonat **9**, $[\alpha]_D^{28} = +16.4$ ($c = 0.560$ in CHCl₃), wurde aus Evans' chiralem Oxazolidinon [9] über die folgende Sequenz in quantitativer Ausbeute hergestellt: a) *n*BuLi, BrCH₂COCl, THF, -78 °C; b) (EtO)₃P, Benzol, Rückfluß.

- [16] Die Stereochemie von **11** wurde wie gezeigt anhand der Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum von **12** zugeordnet ($J(a,b) = 11.6$ Hz, $J(b,c) = 11.0$ Hz, $J(c,d) = 5.5$ Hz). Ein ähnliches Beispiel einer intramolekularen Diels-Alder-Reaktion mit vollständiger *endo*-Selektivität findet sich in: K. Narasaka, M. Saitou, N. Iwasawa, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 1305–1318 und zit. Lit.

- [17] R. E. Damon, G. M. Coppola, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2849–2852. Die direkte Hydrolyse dieses Carboximid mit LiOH oder LiOOH führte zur Spaltung des Oxazolidinringes.

- [18] T. Fukuyama, S.-C. Lin, L. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7050–7051.

- [19] T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203–6205.

- [20] M. E. Duggan, J. S. Imagire, *Synthesis* **1989**, 131–132.

Synthese Bor-reicher Lysindendrimere zur Proteinmarkierung in der Elektronenmikroskopie**

Britta Qualmann*, Michael Manfred Kessels*, Hans-Jürgen Musiol, Walter Daniel Sierralta, Peter Wilhelm Jungblut und Luis Moroder

Das Design und die Synthese Bor-reicher Verbindungen für die Borneutroneneinfangtherapie (BNCT)^[11] und zunehmend auch für neue elektronenmikroskopische Techniken wie die Elektronenenergieverlust-Spektroskopie (EELS) und die abbildende Elektronenspektroskopie (ESI)^[21] finden gegenwärtig großes Interesse. In beiden Anwendungsbereichen werden hohe lokale Bor-Konzentrationen und reaktive Gruppen im Molekül benötigt, die der selektiven Kupplung von Carboranclustern an Moleküle, welche Ziel-erkennend wirken, dienen.

[*] Dipl.-Biochem. B. Qualmann, Dipl.-Biochem. M. M. Kessels, Dr. W. D. Sierralta, Prof. Dr. Dr. P. W. Jungblut Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie Feodor-Lynen-Straße 7–9, D-30625 Hannover Telefax: Int. + 511/5359-203

H.-J. Musiol, Prof. Dr. L. Moroder Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

[**] Die Autoren danken Dr. C. Eckerskorn, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die ES-MS-Messungen sowie Dr. H.-U. Baier und Dr. G. Paulus, Shimadzu, Duisburg, für die MALDI-MS-Messungen.

Die Nachteile von multiplen Anheftungen kleiner Bor-haltiger Moleküle an Trägerproteine wurden bereits beschrieben; im Falle von Antikörpern wurden verminderte Löslichkeiten und Immunreaktivitäten beobachtet^[3]. Statistisch borierte Polymere wie Poly-D,L-Lysin^[4], Poly-L-Ornithin^[5], Dextrane^[6] und Starburst-Dendrimere^[7] sind inhärent heterogen. Dies erforderte das Design und die Synthese von strenger definierten Molekülen, z.B. von Carboranylaminosäuren enthaltenden Peptiden^[8]. Die in den Peptidsynthesen hauptsächlich aufgetretenen Schwierigkeiten waren auf die wegen der sterischen Hindernisse durch den voluminösen 1,2-Dicarbadodecaboranylrest langsamem und unvollständigen Kupplungen von Carboranylaminosäuren am C- und teilweise auch am N-Terminus zurückzuführen. Darüber hinaus erwiesen sich sowohl Intermediate als auch Endprodukte als schwer löslich^[8].

Die Schwierigkeiten bei der Synthese dieser linearen Peptidkonstrukte sollten durch Verwendung sphärischer, dendritischer Strukturen überwunden werden können. Dendrimere, bestehend aus einem Poly-(α,ϵ -L-Lysin)-Gerüst^[9] und mit Carboranclustern auf ihrer Oberfläche, böten zudem den Vorteil, daß für eine multiple Anheftung von Carboranylaminosäuren an die in diesen Molekülen sphärisch angeordneten und quantitativ derivatisierbaren Aminogruppen^[10] nur ein einziger, finaler Acylierungsschritt notwendig wäre. Die spezifisch an eine bestimmte Stelle von Antikörperfragmenten (Fab'), d.h. an deren Thiolfunktion, zu koppelnden Marker A und B, denen eine Kugel-und-Stiel-Struktur zugrunde liegt (Abb. 1), wurden daher entworfen, daß sie folgenden Ansprüchen genügen:

1) Eine hohe Bor-Beladung zur Überschreitung der ESI-Dektionsgrenze für Bor in biologischen Proben sollte erzielt werden. Obwohl das Limit für Bor noch nicht bestimmt wurde, sollten 80 inkorporierte Boratome ausreichen. Dies ist mit einem Heptalysinbaum (Dendrimer der zweiten Generation)

möglich, der eine simultane Kopplung von acht Carboranylaminosäuren ermöglicht und somit zu Dendrimeren führt, die 80 Boratome an ihrer Oberfläche tragen. Die resultierenden, näherungsweise kugelförmigen Moleküle, deren Radius sich in Analogie zu dem eines Lysindendrimers der dritten Generation (11.4 Å^[11]) auf ca. 13 Å belaufen sollte, sind homogene Markermoleküle definiter Größe und wären sehr wertvolle Werkzeuge in der auf ESI basierenden Immuncytochemie^[12].

2) Eine gut zugängliche reaktive Gruppe, wie die Thiolfunktion eines an einen flexiblen Spacer gekoppelten Cysteins, sollte eine selektive Anheftung der Bor-reichen Marker an definierte Stellen des Trägerproteins gewährleisten.

3) Die spektroskopische Verfolgung der Konjugationsreaktion sollte durch den Einbau einer fluoreszierenden Gruppe, in diesem Fall von ϵ -N-Dansyl-Lysin, erreicht werden.

4) Eine erhöhte Wasserlöslichkeit der hydrophoben, Bor-reichen Gruppen wurde durch den hydrophilen, positiv geladenen Lys-Lys-Spacer und, im Falle des Peptids B, einen zusätzlich angehängten PEG-Schwanz (PEG = Polyethylenglycol) angestrebt. Die Peglyierung von Peptiden ist eine bekannte Methode, um die Löslichkeit sowohl geschützt als auch ungeschützter Peptide zu steigern^[13]. Sie erhöht die kritische micellare Konzentration von Amphiphilen merklich^[14].

In kürzlich beschriebenen Synthesen potentiell für BNCT geeigneter Substanzen wurden dendritische Polyalkohol-Strukturen mit einem einzelnen Carborancluster verknüpft^[15a] oder Carboranylgruppen in eine dendritische Micelle eingeführt^[15b]; keine dieser Verbindungen ist jedoch spezifisch an Proteine koppelbar.

Die beiden hier vorgestellten peptidischen Proteinmarkierungskonstrukte A und B wurden unter Übernahme der Fmoc/tBu-Strategie (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) mit Standardverfahren der Peptid-Festphasensynthese an pegyierte Polystyrol-Harzen synthetisiert. Letztere sollten in der Lage sein,

zum einen den hydrophoben Kollaps der Dendrimere durch die Erhöhung ihrer Löslichkeit zu vermeiden^[16] und zum anderen direkt die gewünschten Verbindungen mit oder ohne Polyetherkette zu liefern. Als Carboranylaminosäure wurde im finalen Acylierungsschritt am Lysinbaum (*S*)-(2-Methyl)-1,2-dicarba-*closododecaboran*(12)-1-yl)-2-aminopentansäure (L-MeCBA)^[17], für welche wir kürzlich eine neue und bequeme Synthese entwickelt haben^[18], eingesetzt.

Die Abspaltung und Entschützung der Harz-gebundenen, vollständig geschützten Peptidkonstrukte vom TentaGel-S-PHB- oder vom TentaGel-PAP-Harz führte zu den Verbindungen A und B in 88 bzw. 81% Ausbeute. Für Produkt A ergab die HPLC-Untersuchung (HPLC = Hochleistungslflüssigchromatographie) einen dominierenden Produktpeak der erwarteten Masse, bestimmt per Elektrospray-Massenspektrometrie (ES-MS) (3679.0; berechnet $[M^+]$ = 3679.2 für $C_{139}H_{306}N_{30}O_{22}S_2B_{80}$), ein Beleg dafür, daß die Inkorporation der acht L-MeCBA-Einheiten mit hoher Effizienz verläuft. Für Peptid B er-

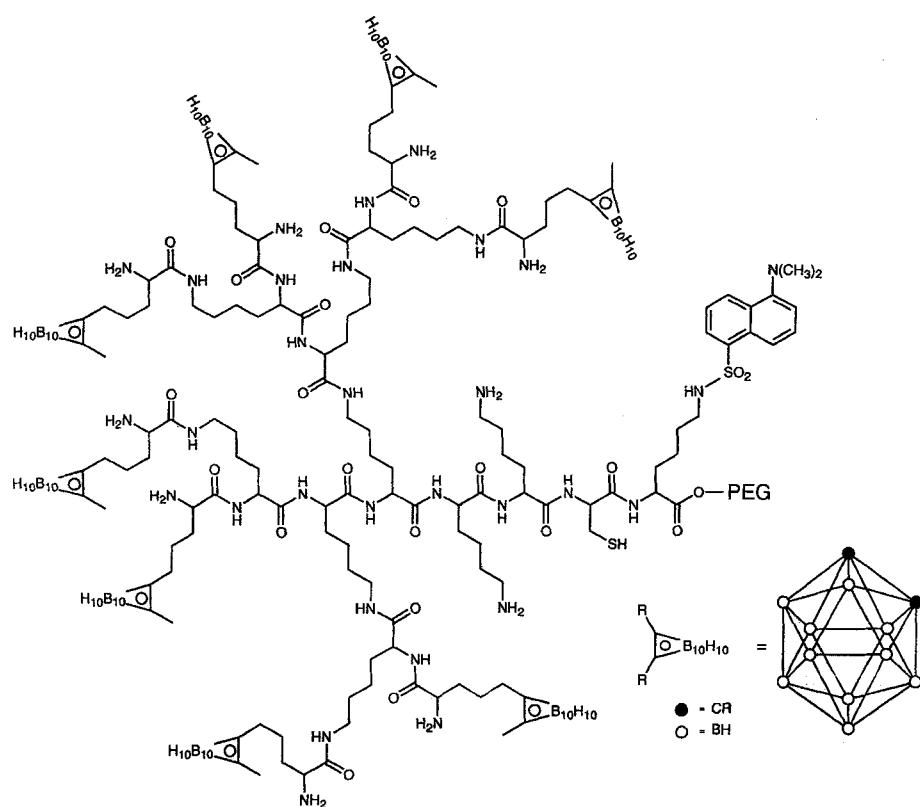


Abb. 1. Struktur des Poly-(α,ϵ -L-Lys)-Dendrimers B. Peptid A unterscheidet sich von B durch das Fehlen des Polyetheranteils am C-Terminus. PEG = Polyethylenglycol (mit $\bar{x} = 68$ Glycoleinheiten).

gab die HPLC-Untersuchung ebenfalls ein Hauptproduktignal; Massebestimmungen durch FAB-MS (FAB = Fast Atom Bombardment) und ES-MS waren wegen der bekannten Schwierigkeiten bei pegyierte Peptiden nicht erfolgreich^[19]. Das MALDI-MS-Spektrum (MALDI = Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation) zeigte eine mit den variierenden Molekulargewichten des PEG-Anteils korrespondierende, glockenförmige Massenverteilung mit einem Apex bei 6649.7 Da, welcher relativ gut mit dem berechneten Wert (6675 Da) übereinstimmt und mit den Ergebnissen früherer MALDI-MS-Messungen pegyierte Peptide in Einklang steht^[20]. Die Verbindungen **A** und **B** sind in einer Reihe von polaren, organischen Lösungsmitteln wie *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und Alkoholen sowie in wäßriger-organischen Gemischen gut löslich; dies ermöglichte ihre Konjugation mit der freien SH-Gruppe von Antikörperfragmenten (Fab'). Die Ausbeuten waren im Fall von **A** mäßig, die Konjugationsreaktion von Verbindung **B** verlief dagegen – wahrscheinlich wegen der guten Wasserlöslichkeit von **B** – mit beiden verwendeten Crosslinkern (Bismaleimidohexan oder 1,4-Di-[3-(2'-pyridyl)dithio]-propionamido]butan) glatt.

Die beiden neuartigen Markermoleküle sollten dem von uns in vorherigen Experimenten synthetisierten, sequentiellen Polypeptid, einem aus alternierenden racemischen Carboranylaminosäuren und Serinen sowie einem Lysylrest für die Anheftung an Fab' durch heterodifunktionelle Reagentien bestehenden Undecapeptid^[8c], überlegen sein. Diese neuartigen Fab'-(**A,B**)-Konjugate zeigten in EELS-Experimenten unter Verwendung eines Zeiss-902-Elektronenmikroskops mit einem integrierten Energieverlustspektrometer deutliche Borsignale, wie exemplarisch in Abbildung 2 für das Fab'-**B**-Addukt gezeigt. Die ultrakleinen Immunreagentien mit der Antigenbindungsdomäne an einem Ende und dem Bor-reichen, dendritischen Marker am entgegengesetzten Ende des Moleküls wurden außerdem in auf ESI basierender Immuncytochemie eingesetzt. Erste Ergebnisse zeigen deren hochauflösende Fähigkeiten^[21, 22] und belegen die Zuverlässigkeit des neuartigen Ansatzes in bezug auf die Über-

schreitung der Detektionsgrenze durch die in die Marker inkorporierten 80 Bor-Atome und eine durch die Pegylierung des Marker-Anteils induzierte gute Löslichkeit. Dieses innovative Verfahren könnte darüber hinaus auch ein Weg zur Konstruktion von kovalent anhängbaren, multiplen Gold- oder anderen Markern sein; weiterhin könnten homogene, funktionelle Dendrimere mit definierten Kopplungsstellen, wie die hier beschriebenen, wertvolle Träger für „Drug Targeting“ sein.

Experimentelles

Synthese von **A** und **B**: Fmoc-Lys(Dansyl)-OH [23] wurde nach Präaktivierung mit O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) (5 min) und Zugabe von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) ca. 18 h an TentaGel-PAP bzw. TentaGel-S-PHB (Rapp Polymere, Tübingen) in DMF gekuppelt. Freie Hydroxymethylphenoxy-Linker wurden mit Essigsäureanhydrid blockiert. Die Beladung der Harze betrug 0.079 mmol g⁻¹ TentaGel-S-PHB und 0.106 mmol g⁻¹ TentaGel-PAP, spektralphotometrisch bestimmt über das Fluoren/Piperidin-Addukt aus der Fmoc-Abspaltung mit 20% Piperidin in DMF. Sukzessive Kupplungen von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp/HOBt und zweimal Fmoc-Lys(Boc)-NCA wurden in DMF mit vierfach molarem Überschuss der Acylierungsagentien ausgeführt. Der Lysinbaum wurde durch drei sukzessive Kupplungen mit vierfach molarem Überschuss an Fmoc-Lys(Fmoc)-OH nach der TBTU/HOBt/DIEA-Methode (HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DIEA = *N,N*-Diisopropylethylamin) (1:1:2) [24] aufgebaut. Im Falle unvollständiger Kupplungen (Kaiser-Test) wurden Reacylierungen mit zweifach molarem Überschuss der Acylierungsagentien durchgeführt. Schließlich wurde Boc-McCBA [25] über die HATU/DIEA-Methode (1:2) (HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) [26] an das Dendrimer angehängt; es wurde nachgekuppelt, bis der Kaiser-Test negativ war. Verbindung **A** wurde vom TentaGel-S-PHB-Harz bei Raumtemperatur (RT) 2 h mit 95proz. wäßriger Trifluressigsäure (TFA) und 2% Triethylsilan abgespalten 2 h und Verbindung **B** vom TentaGel-PAP-Harz mit 5% Thioanisol und 1% Triethylsilan enthaltender TFA (20 h, RT). Die Harze wurden abfiltriert und die Filtrate auf kleine Volumina eingeeignet. Die Peptide wurden durch Präzipitation mit Methyl-*tert*-butylether/Petrolether (2:1) (**A**) und durch zusätzliche Lyophilisation aus entgastem, Argon-gesättigtem Wasser isoliert (**B**).

HPLC wurde auf einer C8-Nucleosil-300-Säule durchgeführt; Elution mittels eines linearen Gradienten (30 min) von 5:95 CH₃CN/2% H₃PO₄ bis 80:20 CH₃CN/2% H₃PO₄; Flussgeschwindigkeit: 1 mL min⁻¹; Detektion: UV bei 210 nm; *R*_t von **A** = 24.35 min; *R*_t von **B** = 21.75 min.

Eingegangen am 29. August 1995,
veränderte Fassung am 15. Januar 1996 [Z 8345]

Stichworte: Borverbindungen · Dendrimere · Elektronenmikroskopie · Festphasensynthese · Peptide

- [1] a) M. F. Hawthorne, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 997–1033; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 950–984; b) C. Morin, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12521–12569.
- [2] F. P. Ottensmeyer, *J. Ultrastruct. Res.* **1984**, *88*, 121–134.
- [3] a) F. Alam, A. H. Soloway, J. E. McGuire, R. F. Barth, W. E. Carey, D. Adams, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 522–525; b) E. Mizusawa, H. L. Dahlman, S. J. Bennett, D. M. Goldenberg, M. F. Hawthorne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3011–3014.
- [4] a) R. F. Barth, N. Mafune, F. Alam, D. M. Adams, A. H. Soloway, G. E. Makroglou, O. A. Oredipe, T. E. Blue, Z. Steplewski, *Strahlenther. Onkol.* **1989**, *165*, 142–145; b) R. F. Barth, A. Fazul, A. H. Soloway, D. M. Adams, Z. Steplewski, *Hybridoma* **1986**, *5*, 43–50.
- [5] S. R. Tamat, A. Patwardhan, D. E. Moore, A. Kabral, K. Bradstock, P. Hersey, B. J. Allen, *Strahlenther. Onkol.* **1989**, *165*, 145–147.
- [6] a) R. Abraham, R. Müller, D. Gabel, *Strahlenther. Onkol.* **1989**, *165*, 148–151; b) M. L. Pettersson, M.-N. Courel, N. Girard, R. Abraham, D. Gabel, M. Thellier, B. Delpach, *J. Immunol. Methods* **1990**, *126*, 95–102.
- [7] R. F. Barth, D. M. Adams, A. H. Soloway, F. Alam, M. V. Darby, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 58–66.
- [8] a) A. Varadarajan, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 242–253; b) R. R. Kane, R. H. Pak, M. F. Hawthorne, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 991–992; c) A. Leusch, P. W. Jungblut, L. Moroder, *Synthesis* **1994**, 305–308.
- [9] R. G. Denkewalter, J. Kolc, W. J. Lukasavage (Allied Corp.), US-A 4289872, 1981 [*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 79324q].
- [10] a) T. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5409–5413; b) D. N. Postnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719–1725.
- [11] S. M. Aharoni, C. R. Crosby, E. K. Walsh, *Macromolecules* **1982**, *15*, 1093–1098.

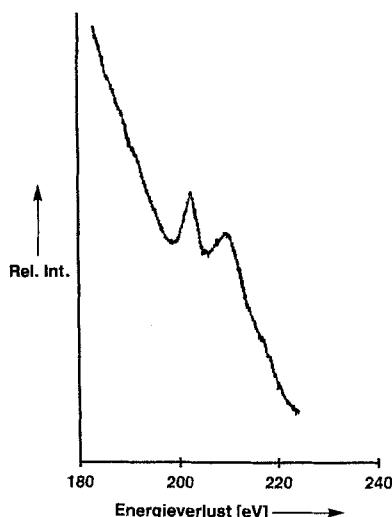


Abb. 2. Elektronenenergieverlust-Spektrum des Peptid **B** enthaltenden Immunreagens, adsorbiert aus einer wäßrigen Lösung (0.5 mg mL⁻¹) an mit Nitrocellulose beschichtete Gold „grids“. Die scharfe Bor-Absorptionskante bei einem Energieverlust von 197 eV röhrt von der elementspezifischen inelastischen Streuung von Elektronen der äußeren Schale her und wurde mit dem an einen digitalen Kompressions-X,Y-Schreiber angeschlossenen Elektronendetektor eines Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskops (EFTEM) aufgezeichnet (Zeiss EM 902, betrieben bei 80 kV; Objektivblende 90 µm; Spektromtereingangsblende 100 µm; Strahlstrom 30 µA; Spaltbreite 1–2 eV; Abtastgeschwindigkeit 1.6 eVs⁻¹; Vergrößerung 30000 ×).

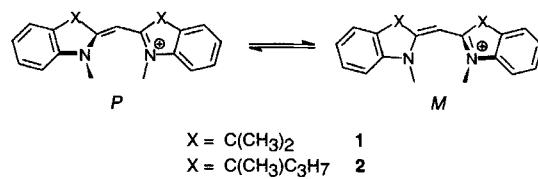
- [12] a) M. Bendayan, R. F. Barth, D. Gingras, I. Londoño, P. T. Robinson, F. Alami, D. M. Adams, L. Mattiazi, *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 573–580; b) M. M. Kessels, B. Qualmann, F. Klobasa, W. D. Sierralta, *Cell Tissue Res.* **1996**, im Druck.
- [13] a) M. Mutter, H. Oppliger, A. Zier, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1992**, *13*, 151–157; b) A. Zier, D. Ryan, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1039–1042.
- [14] T. M. Chapman, G. L. Hillyer, E. J. Mahan, K. A. Shaffer, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11195–11196.
- [15] a) H. Nemoto, J. Cai, Y. Yamamoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 577–578; b) G. R. Newkome, C. N. Moorefield, J. N. Keith, G. R. Baker, G. H. Escamilla, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 701–703; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 666–668.
- [16] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113–129.
- [17] S. Sjöberg, M. F. Hawthorne, P. Lindström, J. Malmquist, J. Carlsson, A. Andersson, O. Pettersson, *Advances in Neutron Capture Therapy* (Hrsg.: R. F. Barth, D. E. Carpenter, A. H. Soloway), Plenum, New York, **1993**, S. 269–272.
- [18] M. M. Kessels, B. Qualmann, *J. Prakt. Chem.* **1996**, 89–91.
- [19] M. Dey, J. A. Castoro, C. L. Wilkins, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1575–1579.
- [20] A. M. Felix, Y.-A. Lu, R. M. Campbell, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *46*, 253–264, zit. Lit.
- [21] B. Qualmann, M. M. Kessels, P. W. Jungblut, W. D. Sierralta, *5th European Workshop on Electron Spectroscopic Imaging, Diffraction and Analysis Techniques*, Freiburg, Deutschland, **1995**, Abstr. 39.
- [22] B. Qualmann, M. M. Kessels, F. Klobasa, P. W. Jungblut, W. D. Sierralta, *J. Microsc.* **1996**, Manuscript eingereicht.
- [23] Die Substanz wurde durch Reaktion von Fmoc-Lys-OH mit Dansylchlorid in wäßrigem Dioxan (NaHCO_3 als Hilfsbase) und Aufarbeitung durch Verteilung zwischen Sproz. KHSO_4 und Essigester und Präzipitation mit Petrolether erhalten. Fmoc-Lys(Dansyl)-OH wurde in einer Ausbeute von 96% gewonnen; homogen in DC ($\text{HAc}/n\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Pyridin}$, 29:15:6:5; $R_f = 0.80$); die $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren stimmen mit der Struktur überein; FAB-MS: $[M + \text{H}^+] = 602.1$ (602.7 berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{SO}_6$).
- [24] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [25] Die Umwandlung von H-L-MeCBA-OHxHCl [18] in H-L-MeCBA-OH wurde in Dichlormethan mit Propylenoxid ausgeführt und lieferte die freie Base durch Kristallisation aus Methanol in 81% Ausbeute; homogen in DC ($\text{AcOEt}/n\text{BuOH}/\text{HAc}/\text{H}_2\text{O}$, 5:3:1:1; $R_f = 0.6$); FAB-MS: $[M + \text{H}^+] =$ Peak-Cluster zentriert um 274.4 (274.4 berechnet für $\text{C}_{8}\text{H}_{24}\text{B}_{10}\text{NO}_2$); das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum stimmt mit der Struktur überein. H-L-MeCBA-OH wurde durch Reaktion mit (Boc)₂O in DMF (DIEA als Hilfsbase) in Boc-L-MeCBA-OH überführt. Die Reaktionsmischung wurde durch Verteilung zwischen Essigester und 5% KHSO_4 aufgearbeitet. Die organische Phase wurde eingeengt, und das verbleibende Öl kristallisierte beim Stehenlassen in der Kälte; Ausbeute: 95%; homogen im Dünnschichtchromatogramm ($\text{AcOEt}/n\text{BuOH}/\text{HAc}/\text{H}_2\text{O}$, 5:3:1:1, $R_f = 0.95$), ($\text{CHCl}_3/\text{Cyclohexan}/\text{HAc}$, 9:9:2, $R_f = 0.45$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.4$ –2.8 (10H, BH), 1.47 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.65–1.77 (m, 2H und $\gamma\text{-CH}_2$ und $\beta\text{-CH}_2$), 1.85–1.95 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.02 (s, 3H, Carb.- CH_3), 2.16–2.22 und 2.26–2.30 (2 \times m, 2 \times 1H, $\delta\text{-CH}_2$), 4.31–4.38 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 5.00–5.05 (d, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.18$ (Carb.- CH_3), 25.34 ($\gamma\text{-CH}_2$), 28.34 ($(\text{CH}_3)_3$), 32.17 ($\beta\text{-CH}_2$), 34.45 ($\delta\text{-CH}_2$), 52.44 ($\alpha\text{-CH}$), 69.77 ($C(\text{CH}_3)_3$), 74.90 und 80.56 ($2 \times \text{C}_{\text{carb}}$), 155.60 (OCN), 175.62 (COOH); FAB-MS: Peak-Cluster zentriert um 374.7 (10%) $[M + \text{H}^+]$, 318.6 (90%) $[M - i\text{Bu} + 2\text{H}^+]$, 274.6 (65%) $[M - \text{Boc} + 2\text{H}^+]$ und 228.5 (40%) $[M - (\text{Boc} \text{ und } \text{CO}_2) + 2\text{H}^+]$; $[M + \text{H}^+] = 374.7$ berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{NB}_{10}$.
- [26] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.

Der erste chirale, C_2 -symmetrische Monomethinfarbstoff – eine scheinbare Verletzung der Helicitätsregeln für die optische Rotation**

Lutz Eggers, Volker Buß* und Gerald Henkel

Professor Fritz P. Schäfer zum 65. Geburtstag gewidmet

Sterische Wechselwirkungen verhindern, daß der Chromophor des Monomethin-Cyanins **1**^[1] die von konjugierten π -Elektronensystemen bevorzugte planare Konformation einnimmt: Die Röntgenstruktur des Tetrafluoroboratsalzes von **1**^[2] zeigt eine verdrillte di-*cis*-Konformation mit einem Interplanarwinkel von 43° zwischen den beiden Indoleninendgruppen. In Lösung liegen beide verdrillten Formen im Gleichgewicht vor. Die mit dynamischer $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmte Energiebarriere^[3] beträgt 50.0 kJ mol⁻¹.



Die im Gleichgewicht vorliegenden Formen sind in achiraler Umgebung Enantiomere und lassen sich nicht unterscheiden. Erst durch chirale Wechselwirkung, z.B. durch das Einführen einer chiralen Gruppe in das Molekül, werden aus den entgegengesetzten verdrillten Enantiomeren Diastereomere, die nun mit chiroptischen Methoden untersucht werden können. Mit diesem Ziel haben wir die chiral substituierten symmetrischen Monomethin-Cyanine (*R,R*-**2** und (*S,S*)-**2**) synthetisiert und deren absolute Konfiguration durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die bei diesen Monomethinen beobachteten Cotton-Effekte sind in scheinbaren Widerspruch zu etablierten Regeln für die optische Rotation.

Die Schlüsselintermediate für die Synthese von **2** sind die chiralen Indolbasen **3**, die nach Dimethylierung von 2-Methyl-3-propylindol^[4] und anschließender Enantiomerentrennung mit Di-*O*-benzoylweinsäure erhalten wurden, ein Verfahren, das kürzlich von Reichardt et al.^[5] beschrieben wurde. Durch Reaktion mit den entsprechenden Hydroxyiminiumsalzen **4**^[1, 6] konnten beide Enantiomere von **2**, die nach Umkristallisation aus Ethanol/Diethylether diastereomerrein waren^[7], gewonnen werden (Schema 1).

Die Röntgenstrukturanalyse eines Einkristalls des Perchloratsalzes der Verbindung **2** mit, wie sich später herausstellen sollte, *R*-Konfiguration an C(3) und C(3') ergab folgende Struktur (Abb. 1)^[8]: Die Moleküle nehmen im Kristall eine *cis,cis*-Konfiguration entlang der Cyaninkette von N(1) nach N(1') ein, ähnlich der für **1** bestimmten^[2]. Die Diederwinkel zwischen den nahezu planaren Indoleninendgruppen und der Ebene, die von den Atomen C(2)-C(8)-C(2') aufgespannt wird, betragen 26.8°.

[*] Prof. Ph.D V. Buß, Dr. L. Eggers
Fachgebiet Theoretische Chemie der Universität
Lotharstraße 1, D-47048 Duisburg
Telefax: Int. + 203/379-2772
E-mail: theobuss@uni-duisburg.de

Prof. Dr. G. Henkel
Fachgebiet Festkörperchemie der Universität Duisburg

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Herrn Prof. Dr. W. Grahn, Braunschweig, danken wir für die Möglichkeit zur Nutzung von NMR-Spektometern.