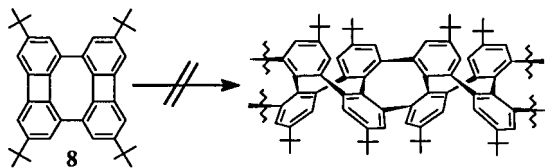


und 294 nm für Biphenyl, Terphenyl bzw. Quaterphenyl).^[22] Die Absorptionen von **2** sind zwar gegenüber **1** bathochrom verschoben, was auf die Ausdehnung der Konjugation zurückzuführen ist, doch ist die Verschiebung kleiner als die bei Oligo-*p*-phenylenen. Demzufolge ist die π -Konjugation in **1**, wo sowohl die helicale Verdrehung als auch *meta*- und *ortho*-Verknüpfungen zwischen den Benzolringen auftreten, zwar geringer als bei den Oligo-*p*-phenylenen, aber noch vorhanden.

Die Ausbeuten an isoliertem, symmetrischem Tetraphenyl (mit zwei neu geknüpften C-C-Bindungen) nehmen in der Reihenfolge **2** (69%), **3** (17%), **1** (4%) stark ab, während der Anteil an solchen Nebenprodukten zunimmt, die nur eine neu geknüpfte C-C-Bindung aufweisen (wie das von 2,2',6,6'-Tetrabrom-4,4'-di-*tert*-butylbiphenyl abgeleitete Dimer und das Tetraphenylendimer **7**). Formal erfordert die Bildung von Tetraphenylen zwei homochirale Biphenyl-2,2'-diylmetall-Fragmente; deshalb überwiegen in einem racemischen Gemisch die Konkurrenzreaktionen immer dann, wenn heterochirale Fragmente verknüpft werden (Bildung einer C-C-Bindung) und die Barriere für die Inversion der Konfiguration hoch ist.

Eine Herausforderung für synthetisch arbeitende Chemiker ist die Herstellung der höheren Homologen von **1** und insbesondere des entsprechenden doppelhelicalen Polymers, die hohe Ausbeuten bei der Bildung des Tetra-*o*-phenylen-Rings, die Verwendung homochiraler Bausteine und/oder hohe Enantioselektivität erfordert. Das kürzlich hergestellte Biphenylendimer **8**



erfüllt teilweise diese Anforderungen,^[11] liefert allerdings unter den für die Umsetzung von Biphenylen zu Tetra-*o*-phenylen typischen Reaktionsbedingungen^[23] als Produkte weder **1** noch dessen höhere Homologe.^[24]

Die Entwicklung effizienter enantioselektiver Methoden zum Aufbau von Tetra-*o*-phenylenen und sterisch weniger gespannten Biphenylendimeren ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Eingegangen am 4. September 1996 [Z9528]

Stichworte: Arene · Chiralität · Doppelhelices · Polymere

- [1] E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, 1994, Kap. 14.
- [2] J. D. Wallis, A. Karrer, J. D. Dunitz, *Helv. Chim. Acta* **1986**, 69, 69.
- [3] M. M. W. Langeveld-Voss, R. A. J. Janssen, M. P. T. Christiaans, S. C. J. Meesters, H. P. J. M. Dekkers, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4908.
- [4] Y. Miyamoto, S. G. Louie, M. L. Cohen, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76, 2121.
- [5] J. Gibson, M. Holohan, H. L. Riley, *J. Chem. Soc.* **1946**, 456; M. O'Keeffe, G. B. Adams, O. F. Sankey, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, 68, 2325; F. Diederich, Y. Rubin, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1123; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1101.
- [6] D. L. Gin, V. P. Conticello, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10934; M. A. Keegstra, S. D. Feyter, F. C. D. Schryver, K. Müllen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 830; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 774.
- [7] V. Enkelmann, *J. Phys. C* **1983**, 44, 3; G. Grem, G. Leditzky, B. Ulrich, G. Leising, *Adv. Mater.* **1992**, 4, 36; M. Hamaguchi, H. Sawada, J. Kyokane, K. Yoshino, *Chem. Lett.* **1996**, 527.
- [8] Für ein Tetra-*o*-phenylen wurde eine Racemisierungsbarriere von mehr als 60 kcal mol⁻¹ festgestellt: P. Rashidi-Ranjbar, Y.-M. Man, J. Sandström, H. N. C. Wong, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4888.
- [9] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304; *Supramolecular Chemistry*, VCH, New York, 1995.
- [10] D. B. Amabilino, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2725.

- [11] A. Rajca, A. Safronov, S. Rajca, C. R. Ross II, J. J. Stezowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7272.
- [12] G. Wittig, G. Klar, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 704, 91.
- [13] Gewöhnlich werden geringe Mengen an Biphenylen gebildet, aber nicht isoliert. 2,2'-Dibrom-4,4'-di-*tert*-butylbiphenyl: M. Tashiro, T. Yamato, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 3037.
- [14] Übersichtsartikel über die Chemie der Tetra-*o*-phenylene: T. C. W. Mak, H. N. C. Wong, *Top. Curr. Chem.* **1987**, 140, 141.
- [15] U. Schubert, W. Neugebauer, P. v. R. Schleyer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 1184; W. Neugebauer, A. J. Kos, P. v. R. Schleyer, *J. Organomet. Chem.* **1982**, 228, 107.
- [16] A. Streitwieser, *Acc. Chem. Res.* **1984**, 17, 353.
- [17] O. Desponds, M. Schlosser, *Tetrahedron* **1994**, 50, 5881.
- [18] Die größten, bislang erhaltenen Kristalle von **1** (90 × 90 × 180 mm) waren für eine Analyse mit einem gewöhnlichen Röntgendiffraktometer zu klein.
- [19] A. A. Bothner-By, R. W. Jeanloz, J. Lee, R. L. Stephens, C. D. Warren, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 811; A. Bax, D. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207.
- [20] Die H-H-Abstände in **1** wurden mit der MNDO-Methode berechnet, die auf das Edukt (mit H-Atomen statt *t*Bu-Gruppen) angewendet wurde; $\Delta H_f = 222.4$ kcal mol⁻¹ (*D*₂-Symmetrie, grad norm = 2.6). M. J. S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 4899; J. J. P. Stewart, MOPAC 93.00 Manual, Fujitsu, Tokyo, 1993.
- [21] Die Einhüllenden der UV/Vis-Spektren von **1** und **2** ähneln denen der Biphenyle mit raumfüllenden Substituenten, z. B. 2,2'-Dimethylbiphenyl; siehe Lit. [22].
- [22] H.-H. Perkampus, *UV-VIS Atlas of Organic Compounds*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, 1992, Teil 2.
- [23] H. Schwager, S. Spyroudis, K. P. C. Vollhardt, *J. Organomet. Chem.* **1990**, 382, 191, zit. Lit.
- [24] Die Kontrollreaktion mit 2,7-Di-*tert*-butylbiphenylen unter den Bedingungen von Lit. [21] lieferte ein Gemisch aus **2** und dessen Isomer; A. Rajca, A. Safronov, unveröffentlichte Ergebnisse.

Verfolgung von Festphasen-Oligosaccharidsynthesen mit hochauflösender MAS-NMR-Spektroskopie: Selektivität der Festphasenkupplung von α -1,2-Didehydrozuckerdonoren zu β -Glycosiden**

Peter H. Seeberger,* Xenia Beebe, George D. Sukenick, Susan Pochapsky und Samuel J. Danishefsky

Die wichtigen Rollen, die Oligosaccharide bei der Signalübertragung zwischen Zellen und bei der Zelladhäsion spielen, haben zu einer starken Zunahme des Interesses und der Wertschätzung für diese Verbindungsklasse geführt. Man versteht jetzt, daß diese komplexen Biomoleküle in Form von Glycoprotein- und Glycolipidkonjugaten detaillierte Strukturinformationen enthalten und vielfältige biologische Ereignisse wie Entzündung,^[1] Immunantwort^[2] und Metastasenbildung^[3] vermitteln. Außerdem fungieren an der Oberfläche von Zellen befindliche Kohlenhydrate als biologische Marker für unterschiedliche Tumore.^[4]

[*] Dr. P. H. Seeberger, Dr. X. Beebe, Prof. Dr. S. J. Danishefsky
Laboratory for Bio-Organic Chemistry
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
Box 106, 1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)
Telefax: Int. + 212/772-8691
E-mail: p-seeberger@ski.mskcc.org

Weitere Adresse:
Department of Chemistry, Columbia University
Dr. G. D. Sukenick
NMR Analytical Core Facility, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
Dr. S. Pochapsky
Bruker Instruments Inc., Fortune Drive, Manning Park, Billerica, MA 01821

[**] Diese Arbeit wurden von den National Institutes of Health (HL-25848) unterstützt. X. B. dankt für eine Postdoc-Stipendium der NIH (T32 CA 62948).

Von den drei Hauptgruppen der Biooligomere sind die Polysaccharide am schwierigsten zu synthetisieren. Die Herstellung strukturell definierter Oligopeptide^[5] und -nucleotide^[6] hat stark von der Durchführbarkeit der Synthesen an polymeren Trägern profitiert. In den meisten Fällen lassen sich Peptid- und Oligonucleotidsynthesen in automatisch arbeitenden Syntheseanlagen (Synthesizern) durchführen, was den schnellen Aufbau der Zielverbindungen ermöglicht. Um die sehr arbeitsaufwendige Synthese von Kohlenhydraten in Lösung zu umgehen, sind beträchtliche Anstrengungen zur Entwicklung von Strategien und Reaktionssequenzen für Festphasensynthesen unternommen worden.^[7] So konnte gezeigt werden, daß sich Methoden, die für Glycosylierungen in Lösung nützlich sind, auch für Synthesen an polymeren Trägern eignen, und tatsächlich wurden bereits große, biologisch wichtige Oligosaccharide durch Festphasensynthesen hergestellt.^[8]

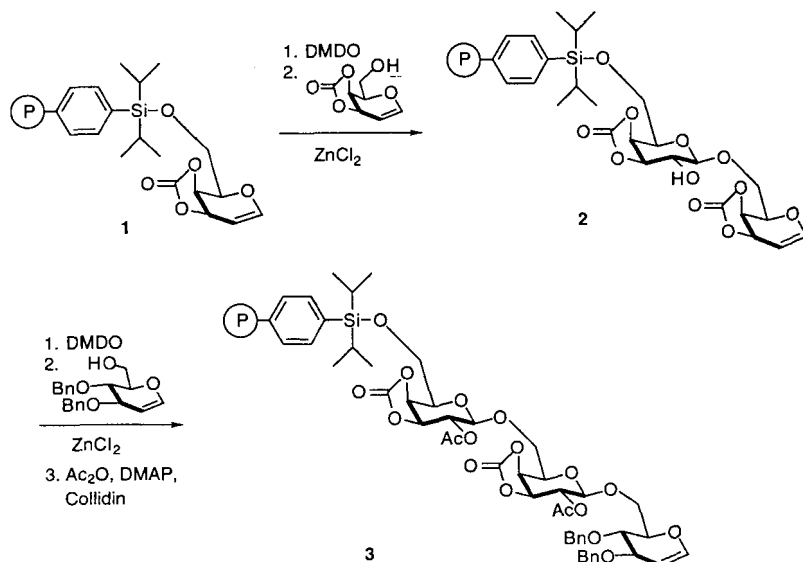
Die Verwendung von Glycalen als Schlüsselbausteinen hat sich als effiziente Strategie bei der Synthese von immer komplexeren Oligosacchariden erwiesen.^[9] So können damit sowohl Glycopeptide als auch Oligosaccharide am festen Träger hergestellt werden.^[10] Trotz der bisherigen, bedeutsamen Fortschritte ist es zur Entwicklung einer allgemein anwendbaren Methode zur schnellen, automatisierten Oligosaccharid- und Glycopeptid-Festphasensynthese noch ein weiter Weg.

Eine wesentliche Einschränkung ist dabei die Schwierigkeit, die Reaktionsprodukte und -zwischenstufen zu charakterisieren. Momentan müssen die Produkte vom Harz abgespalten werden, um den Syntheseprozess mit klassischen spektroskopischen Methoden (z. B. NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie) verfolgen zu können. Die Abspaltung der hergestellten Verbindungen für die Analyse ist zeitaufwendig, teuer und bei vielstufigen Synthesen zudem verschwenderisch. Eine vollständige Charakterisierung der harzgebundenen Produkte würde eindeutig viele Vorteile bieten.

In den letzten Jahren gab es viele Berichte über die ¹³C-, ¹H-, ¹⁹F-, ²H- und ³¹P-NMR-spektroskopische Charakterisierung^[11] von Verbindungen, die an durch Lösungsmittel aufgequollene Harze gebunden waren. Die Qualität der erhaltenen Spektren hing stark vom verwendeten Trägerharz ab. So überrascht es nicht, daß die ¹H-NMR-Signale im allgemeinen breit waren, wenn die Spektren mit traditionellen Hochauflösungsmethoden aufgenommen wurden, so daß die Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie schwierig war.

Durch hochauflösende Magic-angle-spinning(MAS)-NMR-Spektroskopie konnten in einigen Fällen hochwertige ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von niedermolekularen harzgebundenen Verbindungen erhalten werden.^[12] Wir berichten hier über die Verwendung von Hochauflösungs(HR)-MAS-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung eines Trisaccharidglycals, das an ein Merrifield-Harz gebunden ist. Diese Verbindung – das Produkt einer vielstufigen Synthese – ist eine der bisher größten, die HR-MAS-NMR-spektroskopisch charakterisiert wurden.

Das Trisaccharid 2-O-Acetyl-3,4-O-carbonyl-β-D-galactopyranosyl-(1 → 6)-2-O-acetyl-3,4-O-carbonyl-β-D-galactopyranosyl-(1 → 6)-3,4-di-O-benzylglucal wurde durch Glycal-Festphasensynthese nach einer bekannten Vorschrift hergestellt.^[10] Als polymerer Träger wurde wegen seiner hohen Beladungskapazität und seiner Stabilität unter vielen Reaktionsbedingungen mit 1 % Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol verwendet. Harze dieses Typs liefern wesentlich breitere ¹H- und ¹³C-NMR-Signale als Harze



Schema 1. Festphasensynthese von **3** nach der Glycalmethode [10]. (P) = mit 1 % Divinylbenzol vernetztes Polystyrolharz, DMDO = Dimethyldioxiran, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin.

mit langen vernetzenden Einheiten wie die zunehmend populärer werdenden, aber teureren TentaGel-Harze, die zudem eine niedrigere Beladungskapazität haben. Das nach fünfstufiger Synthese erhaltene, trägergebundene Trisaccharid **3** (Schema 1) wurde ¹H-, ¹³C- sowie ¹H-¹³C-HMQC-NMR-spektroskopisch charakterisiert (HMQC = heteronuclear multiple quantum correlation). Mit Spin-Echo-Experimenten^[13] wurden die Signale des Polystyrols im ¹H-NMR-Spektrum abgeschwächt (Abb. 1 a). Zwar wa-

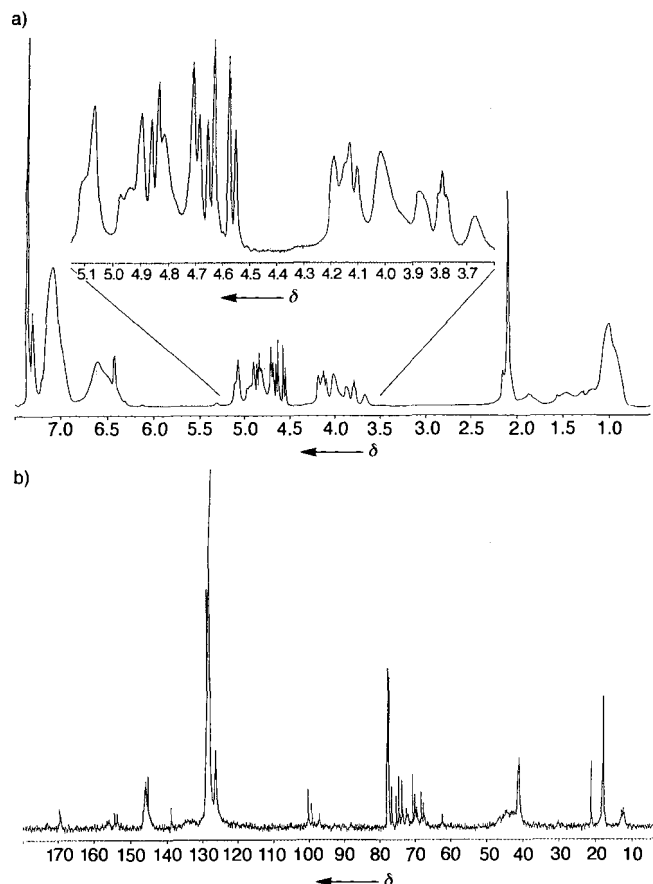


Abb. 1. a) Mit der Spin-Echo-Technik zur Verminderung der Trägersignale aufgenommenes ¹H-NMR-Spektrum von **3**; b) ¹³C-NMR-Spektrum von **3**.

ren die Signale im Vergleich zu denen, die mit vom Harz abgespaltenen Proben erhalten wurden, verbreitert, doch enthielten die Spektren von 3 mehrere Signale, die auf eine erfolgreiche Kupplung hinwiesen: Das Signal bei $\delta \approx 6.4$, das für das Proton an C1 des Glucals charakteristisch ist, und die vier Dubletts bei $\delta = 4.83, 4.69, 4.64$ und 4.55 für die Methylen-Protonen der beiden Benzylschutzgruppen am Glucal belegen, daß das Glucal tatsächlich eingebaut worden ist. Die *O*-Acetylgruppen im Kupplungsprodukt zeigen sich an einem Methylprotonen-Signal bei $\delta = 2.10$. Die Signale zwischen $\delta = 0.8$ und 1.2 können den Protonen der Isopropylgruppen am Siliciumatom zugeordnet werden, über die die erste Galactoseseinheit an den Polystyrolträger gebunden ist. Die breiten Signale zwischen $\delta = 1.3$ und 1.9 stammen vom Polymer sowie möglicherweise auch von Verunreinigungen. Ein nach zwei Stunden Aufnahmezeit erhaltenes ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 1 b) bestätigte das Vorliegen zweier Acetyl- ($\delta = 169.3, 169.1$) und zweier Carbonat-Carbonylgruppen ($\delta = 154.3, 153.6$). Mit einem innerhalb von zwei Stunden erhaltenen ^1H - ^{13}C -HMOC-Spektrum ließ sich die postulierte Struktur bestätigen (Abb. 2). Alle Signale sind deutlich vonein-

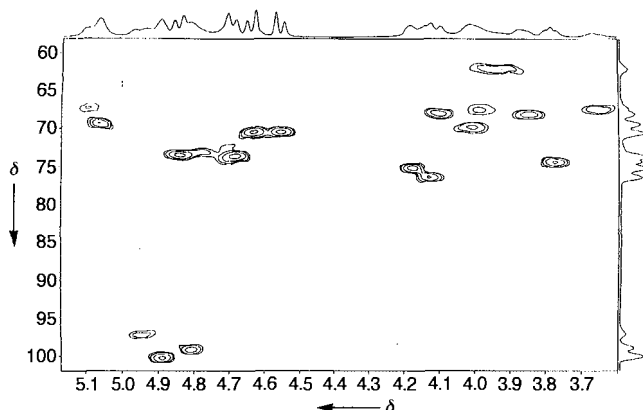


Abb. 2. Ausschnitt aus dem ^1H - ^{13}C -HMOC-NMR-Spektrum von 3.

ander getrennt, und einige aussagekräftige Signale mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen konnten zugeordnet werden. So wurden die beiden anomeren C-Atome und die der Doppelbindung des Glycals ($\delta = 90\text{--}100$) eindeutig identifiziert. Zwar konnten nicht allen H- und C-Atomen der Ringe Signale zugeordnet werden, die Zahl der Signale bestätigt aber das Vorliegen eines Trisaccharids. Die korrekte Zuordnung jedes Signals sollte nach TOCSY- und COSY-Experimenten mit der trägergebundenen Verbindung möglich sein. Zur allgemeinen Verwendbarkeit von HR-MAS-NMR-Spektroskopie bei der Verfolgung einer Synthesesequenz ist die absolute Zuordnung jedes Signals aber nicht erforderlich. Wichtiger ist, daß mit wenigen, recht kurzen NMR-Experimenten detaillierte Informationen über den Erfolg einer chemischen Umsetzung am festen Träger erhalten werden können. Um alle Signale mit ähnlicher, hoher Qualität zu erhalten, wäre es nötig gewesen, das Reaktionsprodukt vom Träger abzuspalten und anschließend zu charakterisieren.

Wie man an den hier gezeigten Spektren sieht, können Festphasensynthesen von Oligosacchariden mit der HR-MAS-NMR-Spektroskopie sehr genau verfolgt werden. Nebenbei sei erwähnt, daß die Messungen unsere früher aufgestellte Behauptung bestätigen, nach der Kupplungen am festen Träger bei Verwendung von geeignet geschützten 1,2-Didehydrozuckern – zumindest solchen wie dem hier verwendeten – hochstereoselektiv sein können, sogar selektiver als die entsprechenden Kupp-

lungen in Lösung.^[15] Die ursprüngliche Behauptung basierte auf dem Befund, daß wir nach dem Abspalten vom Träger und nachfolgender Reinigung keine α -verknüpften Produkte nachweisen konnten. Diese Aussage ist insofern mit Unsicherheiten behaftet, als daß andere Stereoisomere während des Abspaltens und Reinigens übersehen worden sein könnten. Sie wird allerdings überzeugender, wenn sie für die nicht weiter behandelte, an der Festphase gebundene Reaktionsmischung zutrifft. Obwohl anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden kann, daß Signale kleiner Mengen an isomeren α -Produkten verdeckt sind, belegen die Befunde eindeutig die hohe Selektivität jeder Kupplung an der festen Phase. Wir schreiben die erhöhte β -Stereoselektivität bei Synthesen an fester Phase gegenüber denen in Lösung einer verminderten effektiven Solvatisierung bei der Komplexbildung des Oxirans durch das Zinkchlorid zu. Infolge Solvation kann der Oxiranyldonor als oxonium-ionartige Spezies vorliegen. In Grenzfällen ist wahrscheinlich eine Donorspezies, die sehr einem freien Oxoniumion ähnelt, für die Bildung kleiner, aber signifikanter Mengen an α -Glycosiden aus dem gelösten α -Epoxidonor verantwortlich.

Die Entwicklung neuer Methoden für die Synthese von Oligosacchariden am festen Träger wird zweifellos von dieser am Harz durchführbaren Analysemöglichkeit profitieren. Mit diesen Methoden können Chemiker zum einen herausfinden, ob die Kupplung stattgefunden hat, und zum anderen rasch die Spezifität des Kupplungsschritts bestimmen. Durch Untersuchungen mit dem abgespaltenen und entschützten Produkt können die NMR-Signale schließlich vollständig zugeordnet werden.

Experimentelles

Alle ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 500.13 bzw. 125.76 MHz auf einem Bruker-DRS-500-Spektrometer mit einem 4-mm-Bruker-CCA-HR-MAS-Probenkopf gemessen. Das Trisaccharid 3 (20 mg bei 0.54 mmol g^{-1} Beladung, $10.8\text{ }\mu\text{mol}$) wurde in einem Keramikrotor in $30\text{ }\mu\text{L}$ CDCl_3 suspendiert, und die Probe im magischen Winkel zur Rotation gebracht (Frequenz 3.5 kHz). Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz erhalten [13]. Bei diesem Experiment wurden 128 Übergänge aufgezeichnet (Aufnahmezeit 1.64 s , Relaxationsverzögerung 0.5 s). Das protonenentkoppelte ^{13}C -Spektrum wurde in 2 h 10 min erhalten (3000 Übergänge, Aufnahmezeit 0.6 s , Relaxationsverzögerung 2 s). Das phasensensitive (TPPI) ^1H - ^{13}C -HMOC-Spektrum wurde in 2 h mit einer BIRD-Sequenz zur Minimierung der Harzsignale [14] erhalten (16 Scans pro 256 Inkremente; Aufnahmezeit 0.17 s , Relaxationsverzögerung 1.3 s). Die Dauer aller drei NMR-Experimente betrug $4\text{ h } 15\text{ min}$.

Eingegangen am 3. Juli,
veränderte Fassung am 7. Oktober 1996 [Z9291]

Stichworte: Festphasensynthesen • Glycosylierungen • NMR-Spektroskopie • Oligosaccharide • Synthesemethoden

- [1] A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 178; C.-T. Yuen, Bezouska, J. O'Brien, M. Stoll, R. Lemoine, A. Lubineau, M. Kiso, A. Hasegawa, N. J. Bockovich, K. C. Nicolaou, T. Feizi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1595; A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7390; M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakamori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, *250*, 1130; L. M. Stoolman, *Cell* **1989**, *56*, 907; L. A. Lasky, *ibid.* **1992**, *258*, 964.
- [2] K. O. Lloyd, *Am. J. Clin. Pathol.* **1987**, *87*, 129; C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1; M. Meldal, S. Mouritsen, K. Bock in *Carbohydrate Antigens* (Hrsg.: P. J. Garegg, A. A. Lindberg), American Chemical Society, Washington DC, **1993**, S. 19 (*ACS Symp. Ser.* 519).
- [3] T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701.
- [4] K. O. Lloyd, *Cancer Biol.* **1991**, *2*, 421; K. O. Lloyd, L. J. Old, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 3445; K. Fukushima, M. Hiroto, P. I. Terasaki, A. Wakasaki, H. Togashi, D. Chia, N. Suyama, Y. Fukushi, E. Nudelman, S. Hakamori, *ibid.* **1984**, *44*, 5279; S. Hakamori, *ibid.* **1985**, *45*, 2405; M. P. Bevilacqua, R. M. Nelson, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 379.
- [5] R. B. Merrifield, J. Singer, B. Chait, *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 399.
- [6] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281.
- [7] J. M. J. Frechet in *Polymer-Supported Reactions in Organic Synthesis* (Hrsg.: P. Hodge, D. C. Sherrington), Wiley, Chichester, **1980**, S. 1.

- [8] Übersichtsartikel: G.-J. Boons, *Tetrahedron* **1996**, 52, 1095; G. H. Veeneman, S. Notermans, R. M. J. Liskamp, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6695; L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6953; S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepsinsky, *ibid.* **1991**, 113, 5095.
- [9] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1380.
- [10] S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, 260, 1307; J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1995**, 269, 202.
- [11] G. C. Look, C. P. Holmes, J. P. Chinn, M. A. Gallop, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7588; F. Albericio, M. Pons, E. Pedrosa, E. Giralt, *ibid.* **1989**, 54, 360; M. Mazure, B. Calas, A. Cave, J. Parello, *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* **1986**, 303, 553; A. G. Ludwick, L. W. Jelinski, D. Live, A. Kintanar, J. J. Dumais, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6493; F. Bardella, R. Eritja, E. Pedrosa, E. Giralt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2793; H. M. Eggenweiler, E. Bayer, vorgestellt auf dem Fourth International Symposium on Solid Phase Synthesis, **1995**, Edinburgh.
- [12] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymiac, J. N. Shoolery, *J. Magn. Res. A* **1996**, 119, 65; S. S. Sarkar, R. S. Gargipati, J. L. Adams, P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2305; W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7955; R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Ziliox, *ibid.* **1995**, 60, 2650.
- [13] H. Y. Carr, E. M. Parcell, *Phys. Rev.* **1954**, 94, 630; S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instr.* **1958**, 29, 688.
- [14] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **1986**, 67, 565.
- [15] S. J. Danishefsky, R. L. Halcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6661.

Calcium-abhängige Peptidantibiotika mit ungewöhnlichen Bausteinen aus *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

Christoph Kempter, Dietmar Kaiser, Sabine Haag, Graeme Nicholson, Volker Gnau, Tilmann Walk, Karl Heinz Gierling, Heinrich Decker, Hans Zähler, Günther Jung und Jörg W. Metzger*

Professor Ernst Bayer zum 70. Geburtstag gewidmet

Hopwood et al.^[1] isolierten 1983 eine Substanz aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), die in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen das Wachstum Gram-positiver Bakterien hemmt. Die Autoren nannten sie Calcium-abhängiges Antibiotikum (calcium-dependent antibiotic, CDA). In planaren Lipiddoppelschichten bildet

CDA Kanäle, die in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen selektiv einwertige Kationen transportieren.^[1]

Durch HPLC-MS-Kopplung mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) konnten wir im Kulturfiltrat in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium zwei oder vier sehr ähnliche, antibiotisch wirksame Hauptkomponenten nachweisen: Mit einem Heffextrakt als N-Quelle wurden CDA1 und CDA2 (relative monoisotopische Massen 1562 bzw. 1576), mit Sojapepton und Fleischextrakt als N-Quellen CDA3a, CDA3b, CDA4a und CDA4b (1480, 1482, 1494 bzw. 1496) festgestellt. Nach optimierter Produktion konnte durch präparative HPLC 10–50 mg L^{-1} aktive Rohfraktion erhalten werden. Rechromatographie ergab in hoher Reinheit CDA1 (8 mg) und CDA2 (16 mg) bzw. CDA3a und CDA3b (zusammen ca. 4 mg) sowie CDA4a und CDA4b (zusammen ca. 8 mg) in Reinheiten bis zu 80%.

Nach Hydrolyse (6 N HCl, 24 h) und Umsetzung zu *N*-Trifluoracetyl-*n*-propylestern wurden mit Kapillar-GC-MS an Chirasil-Val mit Enantiomer-Labeling^[2] die Aminosäuren L-Asp/Asn (3.04), Gly (0.79), L-Ser (1.00) und L-Thr (0.99) nachgewiesen. Die Hydrolyse unter O_2 -Ausschluss und Thioglycolsäurezusatz lieferte zudem L- und D-Trp im Verhältnis 1:1. Daneben lagen im Hydrolysat die ungewöhnlichen Aminosäuren D-4-Hydroxyphenylglycin und D-3-Hydroxyasparaginsäure (2R,3S) vor, die mit Vergleichsverbindungen identifiziert wurden. Eine dritte ungewöhnliche Aminosäure ähnelte laut GC-MS-Analyse Glutaminsäure, alle Hauptfragmente waren allerdings um 14 Masseneinheiten schwerer. TOCSY^[3]- und HSQC^[4]-NMR-Spektren (TOCSY = Total Correlation Spectroscopy, HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence) lieferten Hinweise auf 3-Methylglutaminsäure. D,L-3-Methylglutaminsäure wurde durch Michael-Addition von Acetylaminomalonsäurediethylester an Crotonsäurenitril und anschließende saure Hydrolyse sowie Decarboxylierung hergestellt. Durch Vergleich des Massenspektrums der im Hydrolysat festgestellten Aminosäure mit dem der synthetischen D,L-3-Methylglutaminsäure konnte 3-Methylglutaminsäure eindeutig identifiziert werden. Die vier isomeren *N*-Trifluoracetyl-*n*-propylester der synthetischen, racemischen D,L-3-Methylglutaminsäure ergaben im Gaschromatogramm (Trennung an L-Chirasil-Val) zwei Peaks gleicher Intensität, die auf die beiden Diastereomerenpaare zurückzuführen sind (Enantiomere werden erfahrungsgemäß an Chirasil-Val immer aufgetrennt). 3-Methylglutaminsäure aus CDA2 hatte die gleiche Retentionszeit wie der zweite Peak im Chromatogramm des synthetischen Produkts. Da D-konfigurierte α -Aminosäuren in der Regel zuerst eluiert werden, sollte CDA2 L-3-Methylglutaminsäure oder das entsprechende Säureamid enthalten.

Da CDA2 mit Ninhydrin keine Farbreaktion ergab und über Edman-Abbau nicht direkt sequenziert werden konnte, mußte es N-terminal blockiert sein. Über ein HMBC^[5]-NMR-Spektrum (HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation) wurde ein 2,3-Epoxyhexanoylrest als N-terminale Gruppe identifiziert. Die $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten für das C-2- und das C-3-Atom des Epoxyhexanoylrestes, die aus einem während der Akquisition nicht ^{13}C -entkoppelten HSQC-NMR-Spektrum ermittelt wurden, betragen für die beiden Ringprotonen 172 bzw. 179 Hz. Diese Werte sind charakteristisch für einen Oxiranring.^[6] Um 2,3-Dihydroxyhexansäure im CDA2-Hydrolysat mit GC-MS zu identifizieren, wurde eine Vergleichsverbindung aus Hex-2-ensäure durch Umsetzung mit Perameisensäure und anschließende Hydrolyse des gebildeten Oxirans hergestellt.

Im Amidprotonen-Bereich des TOCSY-NMR-Spektrums traten mit Ausnahme der Signale des D-3-Hydroxyasparagin/säure-Restes die Signale der Reste aller im Hydrolysat nachge-

[*] Prof. Dr. J. W. Metzger, Dr. C. Kempter
Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft
der Universität
Bandtäte 2, D-70569 Stuttgart
Telefax: Int. + 711/685-3729
E-mail: joerg.metzger@isw.uni-stuttgart.de
Dipl.-Chem. D. Kaiser, G. Nicholson, Dipl.-Chem. V. Gnau, T. Walk,
Prof. Dr. G. Jung
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Dr. S. Haag, Prof. Dr. H. Zähler
Biologisches Institut der Universität
Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tübingen
Dr. H. Decker
Hoechst AG, Process Development H780
D-65926 Frankfurt
Dipl.-Chem. K. H. Gierling
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. D. A. Hopwood (John Innes Centre, Genetics Department, Norwich, UK) für die Überlassung des Stammes *Streptomyces coelicolor* A3(2) 2377. Teile dieser Arbeit wurden auf der 8. Irseer Naturstofftagung der DECHEMA (21.–23.02.1996) in Kloster Irsee und auf der 29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie (AGMS 1996, 28.–31.05.96) in Bremen vorgestellt.