

- Mo<sub>Kα</sub>-Strahlung ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ), Messtemperatur 173 K,  $\omega$ -Scan, Strukturlösung mit Direkten Methoden (SHELXS-86 und SHELXL-97). Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-138151 und 138152“ 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).
- [15] a) R. Stomberg, L. Trysberg, I. Larking, *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 2678–2679; b) I. Shweky, L. E. Pence, G. C. Papaefthymiou, R. Sessoli, J. W. Yun, A. Bino, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1027–1042; c) H. J. Breunig, T. Krüger, E. Lork, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 654–655; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 615–617.
- [16] W. Micklitz, S. G. Bott, J. G. Bentzen, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 372–374.

## Herstellung von Biokonjugaten durch Ugi-Reaktion\*\*

Thomas Ziegler,\* Sonja Gerling und Martin Lang

*Professor Franz Effenberger zum 70. Geburtstag gewidmet.*

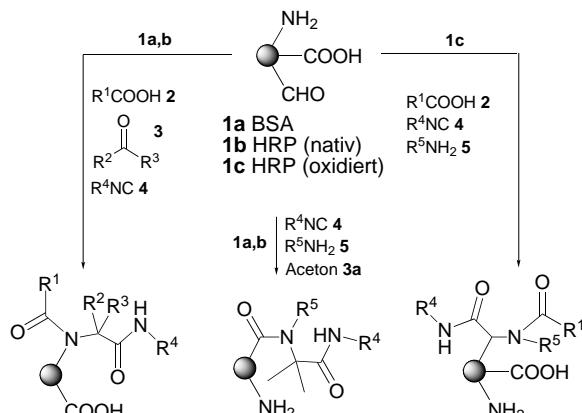
Die gezielte Herstellung von Biokonjugaten, d. h. ganz allgemein die kovalente Verknüpfung einer niedermolekularen Verbindung mit einem Protein oder Oligonucleotid oder auch die Verknüpfung zweier Proteine miteinander, gehört mit zu den wichtigsten Methoden der modernen Biochemie.<sup>[1]</sup> Konjugate aus einem Protein oder einem Oligonucleotid, wie z. B. einem Enzym oder einem DNA-Fragment, und einem Farbstoff oder einer radioaktiven Verbindung werden in vielfältiger Form für analytische Zwecke, in der Histologie und in der Genetik eingesetzt. Antikörper-Enzym-Konjugate dienen bei nahezu allen immunologischen Untersuchungen als unverzichtbare analytische Hilfsmittel. Ebenso kommen Biokonjugate, z. B. Neoglykonjugate aus einem Saccharid und einem Protein, oder Konjugate mit pharmazeutischen Wirkstoffen als Impfstoffe und Therapeutika in der Medizin zur Anwendung, und geradezu beliebig ließe sich diese Aufzählung der Anwendungen von Biokonjugaten hier noch fortsetzen. Es ist aus diesem Grunde auch gut verständlich, dass die weitere Entwicklung neuer Methoden zur Herstellung von Biokonjugaten wünschenswert ist, obschon das Repertoire an ausgearbeiteten und etablierten Konjugationsverfahren einen beachtlichen Umfang erreicht hat. Einen Überblick gibt hierzu Lit. [2].

Üblicherweise basiert die Herstellung von Proteinbiokonjugaten auf der Kondensation oder Addition freier Amino-, Carboxyl-, Thiol- oder Aldehydgruppen im Protein mit

niedermolekularen Verbindungen, die ihrerseits freie Funktionalitäten aufweisen, wobei verschiedene Kondensationsmittel oder bifunktionelle Kupplungsreagentien zum Einsatz kommen können. Trotz des insgesamt hohen Niveaus, das die Methode der Biokonjugation heute erreicht hat, sind die Möglichkeiten zur gleichzeitigen Verknüpfung eines Biopolymers mit mehreren niedermolekularen Verbindungen in ganz definiertem stöchiometrischen Verhältnis beschränkt. Zwar lassen sich prinzipiell auch mehrere niedermolekulare Verbindungen sukzessive nach den bekannten Methoden mit einem Protein konjugieren, die Stöchiometrie der Konjugate ist dabei aber nicht kontrollierbar. Konjugate, die verschiedene Reportergruppen in ganz definiertem Verhältnis enthalten, wären aber dann wünschenswert, wenn es z. B. gilt, ein Protein mit zwei oder mehr Molekülen unterschiedlicher Eigenschaft zu konjugieren.<sup>[3]</sup> Unsere Arbeiten zu Ugi-Reaktionen von Isocyanoglycosen<sup>[4, 5]</sup> haben uns nun veranlasst, zu untersuchen, ob diese Mehrkomponentenreaktion, bei der im klassischen Fall ein Isonitril, ein Amin, eine Carbonylverbindung und eine Carbonsäure in exakt molarem Verhältnis zu einem Peptid reagieren,<sup>[6, 7]</sup> auch für die Herstellung von Biokonjugaten des erwähnten Typs herangezogen werden kann.

Ugi-Reaktionen wurden hierfür unseres Wissens nach bisher nur für die Immobilisierung von Proteinen herangezogen, bei der ein Protein in einer Ugi-Reaktion an einen Isonitril-modifizierten Träger gebunden wurde.<sup>[8]</sup> Um die Anwendbarkeit von Ugi-Reaktionen zur Herstellung von Biokonjugaten des oben erwähnten Typs zu nutzen, haben wir nun die beiden Proteine Rinderserumalbumin (BSA) **1a** und Meerrettichperoxidase (HRP) **1b, c** unter verschiedenen Bedingungen mit den Carbonsäuren **2**, den Carbonylverbindungen **3**, den Isonitrilen **4** und den Aminen **5** umgesetzt.<sup>[9]</sup> BSA und HRP fungieren dabei über ihre jeweiligen freien funktionellen Gruppen entweder als Amin- oder Carbonsäurekomponente (native Proteine **1a, b**) oder als Aldehydkomponente (mit NaIO<sub>4</sub> oxidierte Meerrettichperoxidase, **1c**<sup>[10]</sup>) bei den entsprechenden Ugi-Reaktionen und liefern die in Schema 1 dargestellten Biokonjugate.

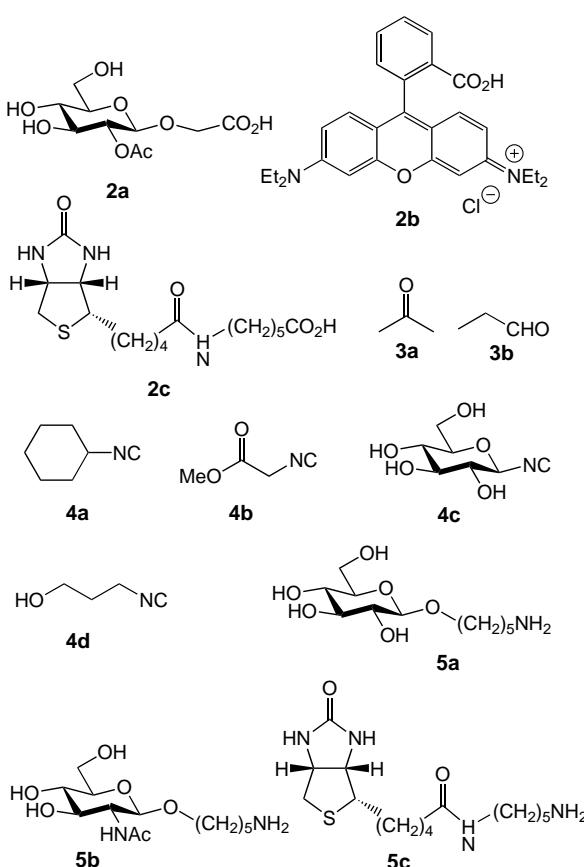
Als repräsentative Komponenten für die Ugi-Reaktionen der Proteine **1** haben wir die Verbindungen in Schema 2 ausgewählt. Als Carbonsäurekomponenten **2** das Glycosid **2a**,



Schema 1. Prinzip der Konjugatbildung eines Proteins **1** mit den niedermolekularen Verbindungen **2–5** durch Ugi-Reaktion.

[\*] Prof. Dr. T. Ziegler, S. Gerling, Dipl.-Chem. M. Lang  
Institut für Organisch Chemie, Universität zu Köln  
Greinstraße 4, 50939 Köln (Deutschland)  
Fax: (+49) 221-470-5057  
E-mail: thomas.ziegler@uni-koeln.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von Aventis Research & Technologies, Frankfurt am Main, gefördert.



Schema 2. Die eingesetzten niedermolekularen Verbindungen 2–5.

den Farbstoff Rhodamin B **2b** und das Biotinderivat **2c**.<sup>[11]</sup> Letzteres, um auch die Möglichkeit zur Herstellung der in der Biochemie wichtigen biotinylierten Proteine<sup>[12]</sup> zu demonstrieren. Als Carbonylkomponente dienten uns Aceton **3a** und Propionaldehyd **3b**, wobei prinzipiell aber auch andere Carbonylkomponenten zum Einsatz kommen können, solange gewährleistet bleibt, dass keine unerwünschte Denaturierung der Proteine erfolgt. Als Isonitrile wurden die Isonitrite **4a**<sup>[13]</sup> und **4b** in heterogener Reaktion und im Falle der wasserlöslichen Isonitrite **4c** und **4d** in homogener Reaktion umgesetzt wurden. Schließlich kamen noch verschiedene Amine **5**<sup>[14]</sup> zum Einsatz, um auch hier die Flexibilität der Methode zu demonstrieren.

Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der Konjugatbildung von BSA **1a** bei Ugi-Reaktionen mit den Komponenten **3a**, **4a**

Tabelle 1. Abhängigkeit der Konjugatbildung zwischen **1a** und **3a–5a** vom Puffer, vom pH-Wert und von der Konzentration der Komponenten.

Puffer	pH	Molverh. <b>5a/1a</b>	Epitopen- dichte
0.01M Phosphatpuffer	6.0	100/1	1.9
0.01M Phosphatpuffer	7.5	100/1	4.0
0.1M Phosphatpuffer	7.5	100/1	1.2
0.1M Phosphatpuffer	7.5	1000/1	6.2
0.1M Phosphatpuffer	7.5	2000/1	6.5
0.1M Phosphatpuffer	7.5	3000/1	7.7
0.1M Tris/HCl-Puffer	7.5	100/1	1.0
0.1M Tris/HCl-Puffer	7.5	1000/1	1.6

und **5a** vom verwendeten Puffersystem, von dessen pH-Wert und von der Konzentration der Komponenten. Die Bestimmung der erzielten Epitopenpendichte (molares Verhältnis von gebundener niedermolekularer Verbindung zu dem jeweiligen Protein) erfolgte dabei durch Molekulargewichtsbestimmung des hergestellten Konjugats durch matrixassistierte Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie.<sup>[15]</sup> Als optimal für die Herstellung der Biokonjugate durch Ugi-Reaktion in Bezug auf eine möglichst hohe Epitopenpendichte erwies sich hierbei 0.01–0.1M Phosphatpuffer (pH 7.5), wobei erwartungsgemäß eine Proportionalität zwischen der erzielten Epitopenpendichte und dem Verhältnis der Konzentrationen von **1a** und **5a** beobachtet wurde. Wesentlich schlechter waren hingegen die erzielbaren Epitopenpendichten in Tris(hydroxymethyl)methylamin(Tris)/HCl-Puffer oder bei niedrigeren pH-Werten, was wahrscheinlich auf unselektive Reaktionen der eingesetzten Komponenten mit dem Puffersystem und auf die Hydrolyse des Isonitrils zurückgeführt werden kann.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Konjugationen der Proteine **1** mit den verschiedenen Komponenten aus Schema 2 aufgelistet. Auch hier wurde die Epitopenpendichte der erhaltenen Biokonjugate durch MALDI-TOF-Massenspek-

Tabelle 2. Herstellung der Biokonjugate aus den Proteinen **1** durch Ugi-Reaktion der Komponenten **2–5** in 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.5) bei 25 °C.

Nr.	Protein <b>1</b>	Molverh. <b>2–5/1</b>	Komponenten <b>2–5</b>	t [d]	Epitopen- dichte	Ausb. [%]	Aktivität <sup>[a]</sup> [%]
1	<b>1a</b>	1000/1	<b>3a, 4b, 5a</b>	2	3.4	100	–
2	<b>1a</b>	3000/1	<b>3a, 4a, 5b</b>	2	9.4	100	–
3	<b>1a</b>	4000/1	<b>2a, 3a, 4a</b>	2	9.9	100	–
4	<b>1a</b>	3000/1	<b>2b, 3a, 4a</b>	1	4.1	49	–
				2	4.8	8.3	–
5	<b>1a</b>	3000/1	<b>2b, 3a, 4c</b>	2	0.5	100	–
				4	1.0	80	–
6	<b>1a</b>	1000/1	<b>2c, 3a, 4d</b>	3	0.0	n.b. <sup>[b]</sup>	–
7	<b>1b</b>	100/1	<b>2c, 3a, 4d</b>	2	0.0	n.b. <sup>[b]</sup>	88
8	<b>1b</b>	100/1	<b>3a, 4d, 5c</b>	2	0.0	n.b. <sup>[b]</sup>	95
9	<b>1b</b>	1000/1	<b>2c, 3b, 4a</b>	1	3.0	75	62
10	<b>1c</b>	1000/1	<b>2b, 4a, 5c</b>	1	3.5	11	93
11	<b>1c</b>	2000/1	<b>2c, 4a, 5c</b>	1	1.0	67	157

[a] Bezogen auf die ursprüngliche Aktivität des nativen Enzyms. [b] Nicht bestimmt.

trometrie erhalten. Zusätzlich wurde die Epitopenpendichte bei den Konjugaten mit Rhodamin B **2b** auch photometrisch anhand der Extinktion einer wässrigen Lösung der Konjugate bei 575 nm und bei den Konjugaten mit den Biotinderivaten **2c** und **5c** durch HABA-Avidin-Test<sup>[16]</sup> und Streptavidin-ELISA<sup>[17]</sup> bestimmt. In einigen Fällen wurden darüber hinaus noch eine photometrische Bestimmung der Konjugatausbeute und – im Falle der Meerrettichperoxidase – eine Messung der Restenzymaktivität durch einen ABTS-Test<sup>[17]</sup> durchgeführt.

Bei den Reaktionen von **1a** mit den Isonitriten **4a–c** (Tabelle 2, Nr. 1–5) wurden in allen Fällen mittlere Epitopenpendichten von 1 bis ca. 10 erhalten, die damit im Bereich einer optimalen Epitopenpendichte liegen.<sup>[18]</sup> Sowohl die Ugi-Reaktionen von **1a** als Carbonsäurekomponente (Tabelle 2, Nr. 1, 2) als auch diejenigen von **1a** als Aminkomponente

(Tabelle 2, Nr. 3–5) ergaben ähnliche Resultate. Allerdings zeigte sich bei allen Umsetzungen nach drei bis vier Tagen Reaktionszeit eine Ausfällung von denaturiertem Protein, was wahrscheinlich auf eine fortschreitende Quervernetzung der Proteine durch Ugi-Reaktionen mit sich selbst zurückgeführt werden kann. Besonders stark war diese Denaturierung bei der Konjugation von **1a** und **4a** mit Rhodamin B **2b** als Carbonsäurekomponente (Tabelle 2, Nr. 4). Nach zwei Tagen Reaktionszeit konnten lediglich 8.3% des Konjugats erhalten werden, ohne dass die mittlere Epitopendichte wesentlich zu steigern gewesen wäre. Anders verhielt sich dagegen das wasserlösliche Isonitril **4c** (Tabelle 2, Nr. 5), das auch noch nach vier Tagen Reaktionszeit nur unwesentlich zu einer Denaturierung des Proteins führte. Keine Konjugation im Sinne einer Ugi-Reaktion wurde mit dem reaktiven, wasserlöslichen Isonitril **4d** beobachtet (Tabelle 2, Nr. 6–8). Weder mit BSA **1a** noch mit nativer HRP **1b** konnten massenspektrometrisch Konjugate nachgewiesen werden, weshalb hier auf die Bestimmung der Proteinausbeute verzichtet wurde. Wir führen dieses Verhalten auf die im Vergleich zu **4c** wesentlich höhere Reaktivität des Isonitrils **4d** zurück, die in diesem Fall zu einer unselektiven Reaktion mit dem Protein führte. Dies zeigte sich auch in einer Abnahme der Enzymaktivität bei **1b** (Tabelle 2, Nr. 7, 8), obwohl keine Konjugatbildung über Ugi-Reaktion stattfand. So ergaben auch entsprechende Versuche zur Ugi-Reaktion von Rinderinsulin, das im MALDI-TOF-MS eine bessere Auflösung aufweist als BSA oder HRP, dass hier in einer schnellen Reaktion Addukte aus Protein und Isonitril gebildet werden, die im Verlauf von drei bis vier Tagen durch Hydrolyse wieder abgebaut werden. Wird dagegen HRP als Amin- oder als Carbonylkomponente mit Isonitril **4a** umgesetzt (Tabelle 2, Nr. 9–11), konnten die entsprechenden Konjugate mit einer Epitopendichte von 1–3 in 11–75% Ausbeute isoliert werden. Zwar muss davon ausgegangen werden, dass **4a** etwa so reaktiv wie **4d** ist, da aber die Reaktion von **4a** heterogen abläuft, findet keine Blockierung der funktionellen Gruppen des Proteins statt und die Ugi-Reaktion liefert die gewünschten Biokonjugate. Die nach der Konjugation noch vorhandene Enzymaktivität bei den Konjugaten mit HRP (Tabelle 2, Nr. 9, 10) betrug 62–95% der ursprünglichen Aktivität des nativen Enzyms, sodass die hier vorgestellte Konjugationsmethode über eine Ugi-Reaktion zu keiner wesentlichen Abnahme führte. In einem Fall (Tabelle 2, Nr. 11) führte die Konjugation sogar zu einer Erhöhung der Enzymaktivität.

Insgesamt belegen die Beispiele, dass Ugi-Reaktionen bei sorgfältiger Optimierung der Reaktivität, insbesondere der eingesetzten Isonitrile, geeignet sind, Biokonjugate herzustellen, bei denen bis zu drei Komponenten in exakt molarem Verhältnis zueinander an ein Protein geknüpft werden können.

### Experimentelles

Umsetzung Nr. 3 aus Tabelle 2: Zu einer Lösung von BSA **1a** ( $M=66431$  Da, 1.0 mg, 15 nmol) und **2a**<sup>[11]</sup> (19.1 mg, 60 mmol) in 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.5; 3 mL) wurden bei 25 °C eine wässrige Acetonlösung (5%, 89.6 µL) und zwei Tropfen **4a** gegeben und die Mischung wurde

gelegentlichem Umschütteln 2 d stehen gelassen. Zur Bestimmung der mittleren Epitopendichte wurden 500-mL-Aliquote zentrifugiert und der Überstand gegen Wasser dialysiert. Das Molekulargewicht des Konjugats wurde durch MALDI-TOF-MS zu  $M=70975$  Da bestimmt. Daraus ergibt sich eine mittlere Epitopendichte von 9.9.

Umsetzung Nr. 10 aus Tabelle 2: Zu einer Lösung von frisch mit NaIO<sub>4</sub> oxidiertem<sup>[10]</sup> HRP **1c** ( $M=43183$  Da, 1.8 mg, 45 nmol), **2b** (21.6 mg, 45 mmol) und **5c** (14.8 mg, 45 mmol) in 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.5; 4 mL) wurden bei 25 °C zwei Tropfen **4a** gegeben und die Mischung wurde unter gelegentlichem Umschütteln 1 d stehen gelassen. Die Mischung wurde zentrifugiert, der Überstand gegen 0.01M Phosphatpuffer (pH 7.5) dialysiert und der Proteingehalt photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt: Ausbeute 4.8 nmol (11%); Restaktivität des Konjugats (ABTS-Test<sup>[17]</sup>): 93%. Das Molekulargewicht des Konjugats wurde durch MALDI-TOF-MS zu  $M=46118$  Da bestimmt. Daraus ergibt sich eine mittlere Epitopendichte von 3.4. Der Gehalt an **2b** im Konjugat wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 575 nm zu 3.5 bestimmt. Der Biotinylierungsgrad betrug laut HABA-Avidin-Test<sup>[16]</sup> 3.3.

Eingegangen am 11. Januar 2000 [Z14522]

- [1] *Bioconjugate Chemistry* (Hrsg.: C. F. Mears), American Chemical Society, New York, **1999**.
- [2] a) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1998**; b) *Neoglycoconjugates, Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, San Diego, **1994**.
- [3] a) B. E. Rothenberg, B. K. Hayes, D. Toomre, A. E. Manzi, A. Varki, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11939–11943; b) D. K. Toomre, A. Varki, *Glycobiology* **1994**, *4*, 653–663.
- [4] T. Ziegler, R. Schlömer, C. Koch, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5957–5960.
- [5] T. Ziegler, H.-J. Kaisers, R. Schlömer, C. Koch, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8397–8408.
- [6] I. Ugi, *Isonitril Chemistry*, Academic Press, New York, **1971**.
- [7] a) I. Ugi, A. Dömling, B. Gruber, M. Almstetter, *Croatia Chim. Acta* **1997**, *70*, 631–647; b) I. Ugi, A. Dömling, W. Hörl, *Endeavour* **1994**, *18*, 115–122.
- [8] a) M. Marek, J. Jary, O. Valentova, Z. Vodrazka, *Czech. Biotechnol. Lett.* **1983**, *5*, 653–658; b) M. Marek, O. Valentova, J. Kas, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1223–1226; c) R. Axen, P. Vretblad, Porath, *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 1129–1132.
- [9] T. Ziegler, S. Gerling, M. Lang, G. Kretzschmar (Aventis Research & Technologies), Patentanmeldung, **1999**.
- [10] P. K. Nakane, A. Kawaoi, *J. Histochem. Cytochem.* **1974**, *22*, 1084–1091.
- [11] Die Verbindung **2a** wurde aus *n*-Butyloxycarbonylmethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid (B. Helferich, K. F. Wedemeyer, *Liebigs Ann.* **1949**, 563, 139–145) durch Verseifung mit 1M wässriger KOH in MeOH (24 h, 25 °C) in 99% Ausbeute erhalten.  $[\alpha]_D^{20} = -13.6$  ( $c=1.0$  in H<sub>2</sub>O); <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O): δ = 181.8 (CO), 177.0 (CO<sub>2</sub>), 102.7 (C-1), 76.3, 75.9, 73.5 (C-3, C-4, C-5), 69.9 (C-2), 68.9 (OCH<sub>2</sub>), 61.0 (C-6), 23.6 (CH<sub>3</sub>). Die Verbindungen **2b** und **2c** wurden von der Firma Fluka bezogen.
- [12] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1–32.
- [13] Die Verbindungen **4a** und **4b** wurden von der Firma Fluka bezogen. Die Verbindung **4c** wurde aus 1-Isocyan-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose<sup>[5]</sup> durch Zemplén-Verseifung (kat. NaOMe in MeOH) hergestellt und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Verbindung **4d** wurde aus *N*-(3-Hydroxypropyl)formamid (L. Goldstein, A. Niv, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1993**, *42*, 19–35) mit Diphosgen hergestellt: W. P. Fehlhammer, K. Bartel, B. Weinberger, U. Plaia, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 2220–2234.
- [14] Zur Herstellung von **5a** siehe: E. Eckhardt, T. Ziegler, *Carbohydr. Res.* **1994**, *264*, 253–269. Die Verbindung **5b** wurde durch Hydrierung an Pd/C aus 5-Benzoyloxycarbonylpentyl-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (T. Ziegler, *Carbohydr. Res.* **1994**, *262*, 195–212) hergestellt und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Verbindung **5c** wurde von der Firma Pierce bezogen.

- [15] Die Epitopendichte wurde mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer Biflex III der Firma Bruker mit Sinapinsäure als Matrix und einer Kalibrierung des Spektrometers mit BSA (66431 Da) und Rinderinsulin (5734.6 Da) bestimmt. Die Bestimmung der mittleren Epitopendichte erfolgte nach der Formel: (Masse des Konjugats – Masse des nativen Proteins)/(Masse des angeknüpften Restes).
- [16] N. M. Green, *Biochem. J.* **1965**, 94, 23c–24c. HABA = 2-[(4-Hydroxyphenyl)azo]benzoësäure.
- [17] Der ABTS-Test für HRP (A. Stutowicz, *Anal. Biochem.* **1984**, 138, 86) wurde auf Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten IN-5008c der Firma Innova durchgeführt. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 405 nm mit einem ELISA-Reader SLT Spectrafluor plus der Firma Tecan. ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; ABTS = 2,2'-Azino (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure).
- [18] B. F. Erlanger, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 85–103.

+++ THE LINK TO INTERNATIONAL CHEMISTRY +++

*"It is a long time since I have read one issue of a journal [...] which has so much of interest..."*

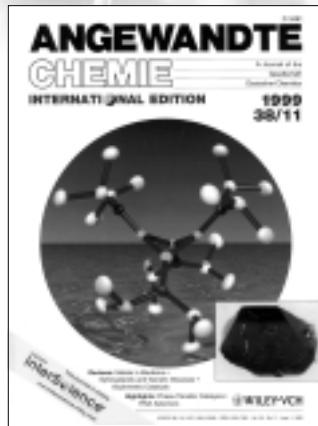
...to process R&D chemists and engineers as issue No. 23 in Vol. 36 of *Angewandte Chemie*.

Trevor Laird, *Editor of Organic Process Research & Development*  
[Org. Process Res. Dev. 1998, 2, 64]

The Highlights in *Angewandte* provide concise evaluations of the most important current trends in chemical research.

**The most cited Highlights in 1998 are:**

- A.E. Rowan, R.J.M. Nolte: Helical Molecular Programming
- N. Krause: Copper-Catalyzed Enantioselective Michael Additions: Recent Progress with New Phosphorus Ligands
- O. Geis, H.-G. Schmalz: New Developments in the Pauson - Khand Reaction
- J.E. Cosgriff, G.B. Deacon: Another Surprise from Pyrazolate Ligands
- C. Schneider: New Polyol Syntheses
- A.P. Davis: Tilting at Windmills? The Second Law Survives
- J.O. Metzger: Solvent-Free Organic Syntheses
- H. Frey: From Random Coil to Extended Nano-cylinder: Dendrimer Fragments Shape Polymer Chains
- J.D. Smith: Phosphanides of the Heavier Alkali Metals
- D. Wölf: High Yields of Methanol from Methane by C-H Bond Activation at Low Temperatures
- P. Luger: Large Molecules from the Virtual Bakery - Filling a Gap in Structure Research
- V. Fehring, R. Selke: Highly Enantioselective Complex-Catalyzed Reduction of Ketones - Now with Purely Aliphatic Derivations Too



Have your own Highlights every two weeks. Subscribe to *Angewandte* with the Order Form on the last page of this issue.

WILEY-VCH, P.O. Box 10 11 61, 69451 Weinheim, Germany  
Phone +49 (6201) 606-328, Fax +49 (6201) 606-348  
e-mail: sales-journals@wiley-vch.de, http://www.wiley-vch.de

**WILEY-VCH**