

Synthese von neuen bifunktionellen Maleinimidverbindungen zur Herstellung von Chemoimmunokonjugaten

U. Beyer, M. Krüger, P. Schumacher, C. Unger und F. Kratz*

Klinik für Tumorbiologie, Abteilung Klinische Forschung, D-79106 Freiburg, Bundesrepublik Deutschland

Synthesis of New Bifunctional Maleimide Compounds for the Preparation of Chemoimmunoconjugates

Summary. Bifunctional maleimide compounds are suitable for binding small molecules to carrier proteins in that they bind to the sulfhydryl group of proteins through the double bond of the maleimide group and to molecules of low molecular weight (e.g. anticancer drugs) through a functional group *X*. 18 maleimide compounds of the general formula Maleimid-*R-X* (*R* = phenylene, benzyl-, methylene-, ethylene, or a *m*-benzoylethylamide group and *X* = hydroxy-, amino-, hydrazino-, carboxylic acid-, carboxylic anhydride-, carboxylic acid chloride-, carboxylic acid hydrazide-, oxycarbonylchloride-, aldehyde, keto-, or *p*-toluenesulfonate-group) were synthesized and characterized through ¹H- and ¹³C-NMR-spectroscopy, elemental analysis, and mass spectrometry.

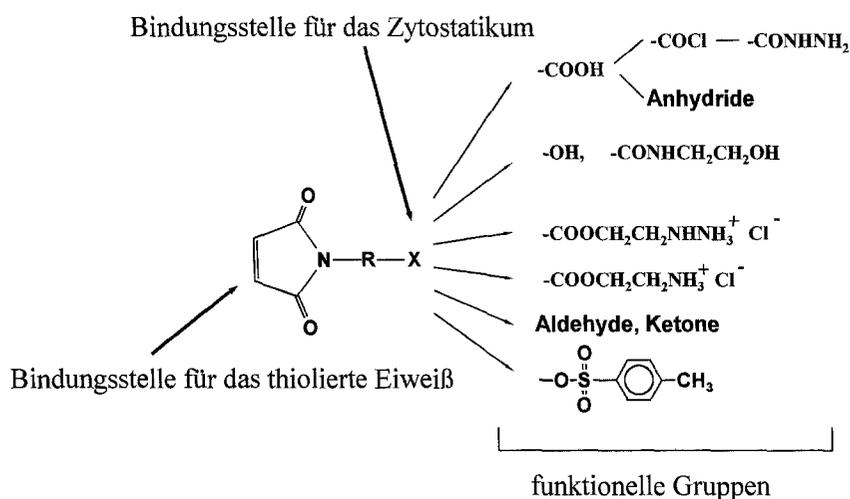
Keywords. Maleimides; Chemoimmunoconjugates; Crosslinking reagent.

Einleitung

Für die Herstellung von sogenannten Immunotoxinen, bei denen ein Toxinpeptid mit einem Trägerprotein verbunden ist, sind in den letzten Jahren Maleinimidverbindungen entwickelt worden, die neben der Maleinimidgruppe meist eine Carboxylgruppe bzw. einen aktivierten N-Hydroxysuccinimidester als funktionelle Gruppe besitzen [1]. Solche Verbindungen, die allgemein als heterobifunktionelle Reagenzien bezeichnet werden, finden weiterhin zur Verknüpfung von zwei Proteinen bzw. Enzymen Anwendung, wie beispielsweise bei der Entwicklung von *Enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) [2].

Für die Herstellung von sogenannten Chemoimmunokonjugaten, wobei Zytostatika an Trägerproteine gebunden werden, sind jedoch heterobifunktionelle Reagenzien erforderlich, die zu den unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Zytostatika chemische Bindungen eingehen können [3]. Bislang sind diesbezüglich in der Literatur nur einige wenige Maleinimidderrivate von Aminosäuren, Carbonsäuren und Carbonsäurederivaten beschrieben worden [4–10].

Aus diesem Grund haben wir eine Reihe von Maleinimidverbindungen synthetisiert (Abb. 1), die eine Hydroxy-, Amino-, Hydrazino-, Carbonsäure-, Carbonsäureanhydrid-, Carbonsäurechlorid-, Carbonsäurehydrazid-, Oxycarbonylchlorid-, Aldehyd-, Keto- oder *p*-Toluolsulfonatgruppe als funktionelle Gruppe besitzen.



R = Phenylen-, Benzyl-, Methylen- oder Ethylengruppe

Abb. 1. Allgemeine Übersicht über die synthetisierten Maleinimidverbindungen

Hierdurch können Zytostatika durch kovalente Bindungen unterschiedlicher Stabilität mit Maleinimidverbindungen verbunden werden, wie zum Beispiel durch eine Carbonsäureamid-, Carbonsäureester-, Acetal-, Imin-, Hydrazon- oder Acylhydrazonbindung. Eine Variation der Stabilität der Bindung zwischen Zytostatikum und Trägerprotein ist ein wichtiger Parameter bei der Entwicklung von Chemoimmunokonjugaten, da diese sowohl eine gute Stabilität in der Blutbahn bei einem *pH*-Wert von rund 7.4 als auch eine gewisse Säurelabilität aufweisen müssen, wenn nach erfolgter zellulärer Endozytose in den sogenannten Endosomen (*pH*-Wert = 5.0–5.5 [11]) das Zytostatikum in seiner ursprünglich aktiven Form freigesetzt werden soll.

In dieser Arbeit stellen wir 18 Maleinimidverbindungen vor, deren funktionelle Gruppe mit Hilfe von bewährten präparativen Verfahren variiert wurde, um Spacergruppen für die oben genannte biomedizinische Anwendung zu erhalten.

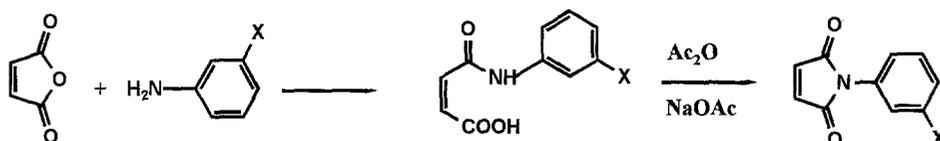
Ergebnisse und Diskussion

Synthese der Maleinimidverbindungen

Bei der Auswahl der eine Aminogruppe enthaltenden Ausgangsverbindungen für die Herstellung von Maleinimidverbindungen haben wir aliphatische sowie

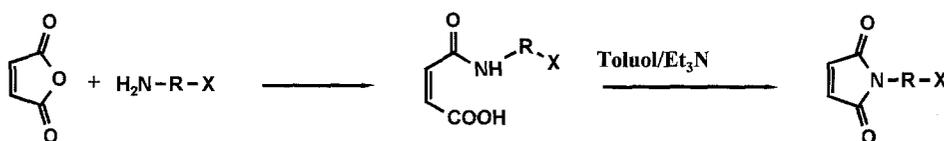
aromatische Derivate berücksichtigt, die im Handel erhältlich und wenig toxisch sind. Die Maleinimidverbindungen, die eine Hydroxy-, Carbonyl-, Acetal- oder Carbonsäuregruppe enthalten, wurden in Anlehnung an Lit. [4, 5] nach einem der folgenden Verfahren hergestellt (Abb. 2).

Verfahren 1 zur Herstellung von Maleinimidverbindungen:



X = diverse funktionelle Gruppen (siehe Abb. 1)

Verfahren 2 zur Herstellung von Maleinimidverbindungen:



R = Phenylen-, Benzyl-, Methylen- oder Ethylen

X = diverse funktionelle Gruppen

Abb. 2. Verfahren zur Herstellung von Maleinimidverbindungen

Auf diesem Wege werden die Hydroxyderivate 2-Hydroxyethylmaleinimid (1) und *m*-Maleinimidophenol (2), die Carbonylderivate *m*-Maleinimidoacetophenon (3) und *p*-Maleinimidobenzophenon (4), das Acetalderivat Maleinimidoacetaldehyddiethylacetal (5) sowie die Carbonsäurederivate *m*-Maleinimidobenzoesäure (6; diese Verbindung war aus der Literatur bekannt [5]) und *p*-Maleinimidophenyllessigsäure (7) hergestellt. *m*-Maleinimidobenzoesäure (6) wird durch Umsetzen mit Essigsäureanhydrid zum entsprechenden Anhydrid (8) derivatisiert, die entsprechenden Carbonsäurechloride (9 und 10) wurden durch Umsetzen von 6 bzw. 7 mit Thionylchlorid oder Oxalylchlorid hergestellt.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, lassen sich die Aminoethyl-, Hydrazinoethyl-, Hydroxyethyl- und Carbonsäurehydrazidderivate 11, 12, 13 und 14 aus *m*-Maleinimidobenzoesäurechlorid (9) gewinnen, indem 9 mit *N*-(*t*-Butoxycarbonyl)-ethanolamin, *N*-(*t*-Butoxycarbonyl)-ethanolhydrazin, Aminoethanol bzw. Hydrazinoameisensäure-*t*-butylester und äquivalenten Mengen an Triethylamin umgesetzt wird und in einem zweiten Schritt die *t*-Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure oder HCl/Ether abgespalten wird, so daß 11, 12 und 14 als Trifluoracetatsalze bzw. Hydrochloride isoliert werden. Die *t*-Boc-Schutzgruppe ist bei der Synthese erforderlich, da eine freie Amino-, Hydrazino- bzw. Säurehydrazidogruppe unter den

gegebenen Reaktionsbedingungen mit der Doppelbindung der Maleinimidgruppe reagiert.

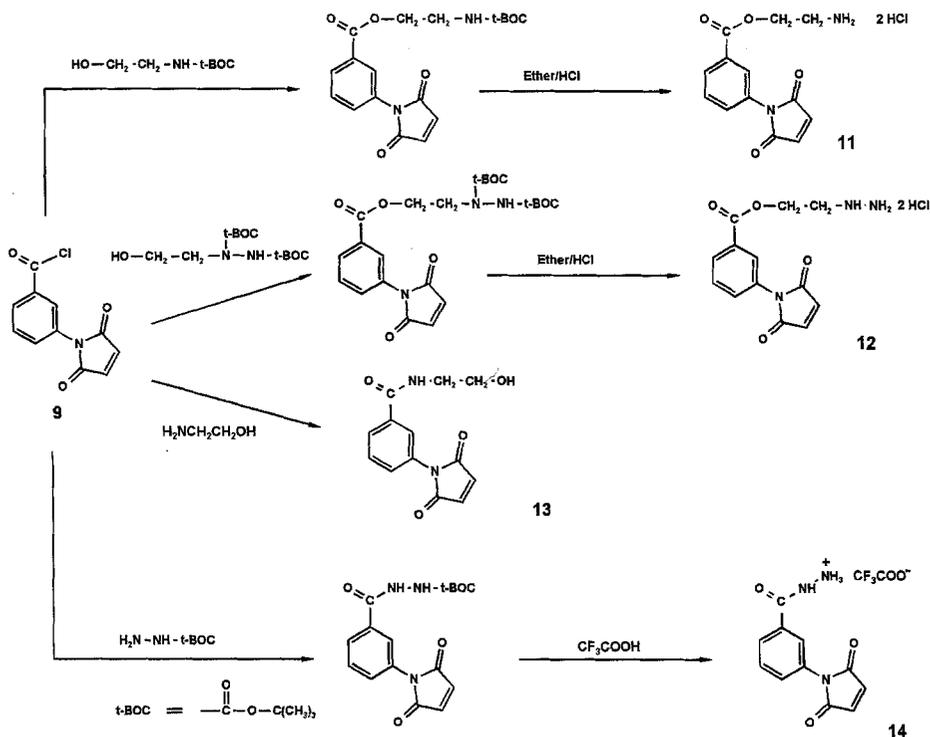


Abb. 3. Syntheschema für die Maleinimidderivate 11–14

Analog zur Synthese von **14** konnte das Maleinimidophenylsigsäurehydrazid-Derivat **15** erhalten werden.

Die Aldehydderivate, *m*-Maleinimidobenzaldehyd (**16**) und Maleinimidoacetaldehyd (**17**), werden hergestellt, indem einerseits *m*-Maleinimidbenzoesäurechlorid mit Hilfe von $\text{LiAl}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3\text{H}$ in Tetrahydrofuran unter Stickstoff zum Aldehyd **16** reduziert wird und andererseits *m*-Maleinimidoacetaldehyddiethylacetal (**5**) durch saures Kieselgel in Dichlormethan zum Aldehyd **17** gespalten wird.

Eine gegenüber Substitutionsreaktionen aktivierte Hydroxymaleinimidverbindung (2-Ethylmaleinimido-*p*-toluolsulfonat, **18**) konnte durch Umsetzung von **1** mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid erhalten werden. Weiterhin konnte durch Reaktion von **1** mit Bis-(trichlormethyl)-carbonat der Chlorameisensäure-2-maleinimidoethyl-ester **19** erhalten werden.

Die Maleinimidverbindungen wurden durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Gemeinsames Strukturmerkmal der Verbindungen ist die Maleinimidgruppe. In den ^1H -NMR-Spektren sind die beiden Protonen des Maleinimidrings durch ein scharfes Singulett bei 6.8–7.2 ppm gekennzeichnet; in den ^{13}C -NMR-Spektren erscheint das Signal für die Carbonylkohlenstoffatome bei 168–170 ppm und jenes für die C=C-Doppelbindung bei 134–135 ppm.

Einen weiteren Beweis für die Struktur der Maleinimidverbindungen stellen die massenspektrometrischen Meßdaten dar. Mit Ausnahme der Trifluoracetatsalze der Säurehydrazide **14** und **15** sowie der Verbindungen **11** und **13** konnte ein entsprechender Molpeak mit Hilfe der Elektronen-Stoßionisation detektiert werden. Die Massen von **11**, **13**, **14** und **15** wurde durch FAB (Fast Atom Bombardment) bestätigt.

Experimentelles

Schmelzpunkte: Büchi 530, Fa. Büchi; 250 MHz ^1H -NMR-Spektren: WM 250, Fa. Bruker; 400 MHz ^1H -NMR- und 100 MHz ^{13}C -NMR-Spektren: AM 400, Fa. Bruker, ppm-Werte bezogen auf TMS als internen Standard; Massenspektren: Finnigan MAT 312-Massenspektrometer (EI (70 eV); CI (170 eV); FAB (3 kV)). Chemikalien wurden in handelsüblicher Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Aldrich (Steinheim) und Fluka (Buchs/Schweiz) bezogen; Lösungsmittel wurden freundlicherweise von der BASF AG (Ludwigshafen/Rhein) zur Verfügung gestellt (p.a.-Qualität); zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 der Fa. Merck (Darmstadt) verwendet (Korngröße: 0.063-0.100 μm). DC: Kieselgelplatten (Alufolie) 60 F₂₅₄ der Fa. Merck (Darmstadt). DCs von nicht durch UV bei 254 nm detektierbaren Substanzen wurden mit einer Lösung, die aus 800 ml Ethanol, 22 ml Anisaldehyd, 14.4 ml konzentrierter Schwefelsäure und 8.8 ml Eisessig bestand, entwickelt und die Substanzen durch anschließendes Erhitzen der Kieselgelplatten sichtbar gemacht.

Die benötigten Maleaminsäuren für die Maleinimidverbindungen **1**–**7** wurden nach einer der beiden folgenden allgemeinen Synthesevorschriften hergestellt¹.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Maleinsäureamide als Vorstufen für die Verbindungen 1 und 2

In einem Dreihalskolben wurden 300 ml Aceton vorgelegt. Dann wurden 1.0 mol 2-Aminoethanol (für **1**) bzw. *m*-Aminophenol (für **2**) und 1.0 mol Maleinsäureanhydrid in jeweils weiteren 300 ml Aceton gelöst. Beide Lösungen wurden innerhalb von 3 h gleichzeitig unter Rühren bei Raumtemperatur zugetropft. Nach Ende der Zugabe wurde 90 Minuten lang weitergerührt, das Reaktionsgemisch anschließend im Vakuum auf etwa die Hälfte eingeeengt und bei +4 °C kalt gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute der Maleaminsäuren: 46% (**1**); 86% (**2**)).

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Maleinsäureamide als Vorstufen für die Verbindungen 3, 4, 5 und 7

0.3 Mol der jeweiligen Aminoverbindung (*m*-Aminoacetophenon für **3**; *p*-Aminobenzophenon für **4**; Aminoacetaldehyddiethylacetal für **5**; *p*-Aminophenylelessigsäure für **7**) wurden in 100 ml Methanol suspendiert und durch Zugabe von 300 ml Aceton und gegebenenfalls durch Erwärmen auf 50 °C in Lösung gebracht. Dann wurden 0.3 mol Maleinsäureanhydrid in 200 ml Aceton gelöst und zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Lösung unter Rühren binnen 3 h zugetropft. Dabei begann die Abscheidung des Reaktionsproduktes. Nach dem Ende des Zutropfens wurde 2 h weitergerührt, anschließend im Vakuum auf etwa die Hälfte des Volumens eingeeengt und bei +4 °C kaltgestellt. Der

¹ Die ^1H -NMR-Spektren der Maleinsäureamide sind an dieser Stelle nicht aufgeführt. Die jeweiligen Verbindungen waren DC-rein und wurden in dieser Form unmittelbar zur jeweiligen Maleinimidverbindung umgesetzt.

Niederschlag wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet (Ausbeute der Maleaminsäuren: 88% (3); 93% (4); 90% (5); 82% (7)).

2-Hydroxyethylmaleinimid (1, C₆H₇NO₃ (141.2))

10.0 g (63 mmol) der N-(2-Hydroxyethyl)-maleinsäureamid wurden in 400 ml Toluol unter Rühren in der Wärme gelöst. In der Wärme wurde 12.65 g (17.42 ml, 126 mmol) Triethylamin zugegeben. Danach wurde der Ansatz am Wasserabscheider unter kräftigem Rühren 2h lang unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Toluolphase von dem gebildeten roten Rückstand abdekantiert. Dieser wurde 3 × mit Toluol in der Wärme extrahiert. Alle Toluolphasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt; es blieb ein weiß-gelber Rückstand zurück, der viermal mit je 400 ml Ether aufgekocht wurde. Der Ether wurde im Vakuum entfernt und der zurückbleibende weiße Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 3/1; 14% schwachgelber Feststoff; *R_f*-Wert: 0.35).

Fp.: 73 °C; ¹H-NMR (*DMSO-d*₆): 3.47 (m, 4H, 2 × CH₂), 4.79 (br s, 1H, OH), 7.01 (s, 2H, HC=CH) ppm; ¹³C-NMR (*DMSO-d*₆): 39.88 (N-CH₂), 57.87 (CH₂-O), 134.40 (HC=CH), 171.01 (C=O) ppm; MS (EI): *m/z* = 141 (2%), 111 (100%), 98 (55%), 82 (84%), 54 (71%); ber.: C 51.06%, H 5.00%, N 9.82%; gef.: C 50.98%, H 5.04%, N 9.77%.

m-Maleinimidophenol (2, C₁₀H₇NO₃ (189.1))

5.0 g (24.6 mmol) N-(*m*-Hydroxyphenyl)-maleinsäureamid wurden in 350 ml Toluol suspendiert und unter Rückfluß erhitzt. In der Wärme wurden 2.53 g (3.48 ml, 25.0 mmol) Triethylamin zugegeben und 2h lang am Wasserabscheider erhitzt. Es wurde vom entstandenen roten Öl abdekantiert und das Toluol im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 1/1; 12% gelbes Pulver; *R_f*-Wert: 0.35).

Fp.: 135 °C; ¹H-NMR (*DMSO-d*₆): 6.72–7.33 (m, 4H, Phenyl), 7.19 (s, 2H, HC=CH), 9.71 (s, 1H, OH) ppm; ¹³C-NMR (*DMSO-d*₆): 113.74, 114.69, 117.18, 129.43, 132.42, 157.58 (Phenyl), 134.53 (HC=CH), 169.81 (C=O) ppm; MS (EI): *m/z* = 189 (100%), 133 (42%), 119 (46%); ber.: C 66.32%, H 3.90%, N 7.73%; gef.: C 65.65%, H 3.98%, N 7.37%.

m-Maleinimidoacetophenon (3, C₁₂H₉NO₃ (215.2))

77.3 g (331 mmol) N-(*m*-Acetophenyl)-maleinsäureamid und 13.58 g (165.5 mmol) wasserfreies Natriumacetat wurden in 160 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und unter Erwärmen auf 55 °C gelöst. Bei dieser Temperatur wurde 2h lang gerührt und anschließend das Essigsäureanhydrid abdestilliert. Der ölige Rückstand, der noch Anhydridreste enthielt, wurde mit 650 ml Wasser versetzt und 3h lang bei 70 °C gerührt. Nach 30 Minuten begann ein gelber Feststoff auszufallen. Anschließend wurde der Ansatz bei +4 °C kaltgestellt, der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurde aus Aceton umkristallisiert; 71% gelbe Kristalle, *R_f*-Wert: 0.70 (Essigester/Hexan 4/1).

Fp.: 100–101 °C; ¹H-NMR (*DMSO-d*₆): 2.59 (s, 3H, CH₃), 7.21 (s, 2H, HC=CH), 7.63–7.96 (m, 4H, Phenyl) ppm; ¹³C-NMR (*DMSO-d*₆): 26.74 (CH₃), 126.08, 127.59, 129.35, 131.28, 132.05, 137.48 (Phenyl), 134.75 (HC=CH), 169.76 (C=O), 197.20 (Keton) ppm; MS (EI): *m/z* = 215 (28%), 200 (45%), 172 (30%), 116 (24%), 43 (100%); ber.: C 66.92%, H 4.21%, N 6.51%; gef.: C 66.21%, H 4.21%, N 6.46%.

p-Maleinimidobenzophenon (4, C₁₇H₁₁NO₃ (277.3))

19.3 g (65.4 mmol) N-(*p*-Benzophenyl)-maleinsäureamid und 2.6 g (31.0 mmol) wasserfreies Natriumacetat wurden bei 55 °C in 50 ml Essigsäureanhydrid gelöst und bei dieser Temperatur 2h lang

gerührt. Anschließend wurde das Essigsäureanhydrid bei 60 °C im Wasserstrahlvakuum entfernt. Zum Rückstand wurden 300 ml Wasser zugegeben und 2 h lang bei 70 °C gerührt. Der während dieser Zeit ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Aceton umkristallisiert; 94% gelber Feststoff, R_f -Wert: 0.70 (Essigester/Hexan 6/1).

F_p : 150 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 7.25 (s, 2H, HC=CH), 7.53–7.92 (m, 9H, Phenyl) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): 125.99, 128.52, 129.53, 130.17, 132.70, 135.23, 135.65, 136.78 (Phenyl), 134.80 (HC=CH), 169.44 (C=O), 194.91 (Phe-CO-Phe) ppm; MS (EI): $m/z = 277$ (28%), 200 (100%), 105 (88%), 77 (74%); ber.: C 73.64%, H 3.97%, N 5.05%; gef.: C 73.15%, H 3.96%, N 5.00%.

Maleinimidoacetaldehyddiethylacetal (**5**, $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (213.2))

30.95 g (133.8 mmol) N-(Acetaldehyddiethylacetal)maleinsäureamid wurden in 900 ml Toluol gelöst, 14.2 g (19.6 ml, 140.5 mmol) Triethylamin hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 15 h lang am Wasserabscheider gekocht. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende braune Sirup wurde in 350 ml Diethylether aufgenommen und 3 × mit je 50 ml Wasser extrahiert. Die etherische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das zurückbleibende braune Öl säulenchromatographisch gereinigt (Essigester/Hexan 1/1; 36% farbloser Sirup; R_f -Wert: 0.49).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 1.12 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 3.55 (dq, 2H, $J = 7.5/7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.67 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, N- CH_2), 3.72 (dq, 2H, $J = 7.5/7.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.78 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, C-H), 6.71 (s, 2H, HC=CH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): 15.20 (CH_3), 39.59 (N- CH_2), 61.83 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 98.43 (C-H), 134.17 (HC=CH), 170.47 (C=O) ppm; MS (EI): $m/z = 212$ (9%), 168 (77%), 140 (73%), 103 (100%); ber.: C 58.15%, H 7.49%, N 6.17%; gef.: C 57.10%, H 6.98%, N 6.35%.

p-Maleinimidophenyllessigsäure (**7**, $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_4$ (231.2))

18.0 g (72 mmol) N-(4-Essigsäurephenyl)maleinsäureamid wurden in 2.4 l Toluol suspendiert und zum Rückfluß erhitzt. In der Wärme wurden 14.7 g (20.2 ml, 144 mmol) Triethylamin zugegeben und anschließend 2 h lang unter Rückfluß am Wasserabscheider erhitzt. Dann wurde vom entstandenen roten Öl abdekantiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 300 ml Wasser aufgenommen und mit 1 M HCl auf $\text{pH} = 2$ eingestellt. Die saure Lösung wurde mit Essigester extrahiert (6 × 50 ml). Die vereinigten Essigesterphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe Produkt wurde aus Essigester/Hexan umkristallisiert; 51% gelbe Kristalle, R_f -Wert: 0.45 (Essigester/Methanol 2/1).

F_p : 158 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3.67 (s, 2H, CH_2); 7.16 (s, 2H, HC=CH), 7.22–7.40 (m, 4H, Phenyl); 12.43 (s, 1H, COOH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): 40.15 (CH_2); 126.56, 129.87, 130.03, 134.88 (Phenyl), 134.61 (HC=CH), 169.91 (C=O), 172.43 (COOH) ppm; MS (EI): $m/z = 231$ (47%), 186 (100%); ber.: C 62.34%, H 3.92%, N 6.09%; gef.: C 61.84%, H 4.43%, N 5.59%.

m-Maleinimidobenzoessäureanhydrid (**8**, $\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$ (416.3))

90 g (414 mmol) *m*-Maleinimidobenzoessäure [**5**] wurden in 250 ml Acetanhydrid gelöst und während 18 h bei 110 °C am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen bildete sich ein braun-weißer Niederschlag, der abgesaugt und aus THF umkristallisiert wurde; 48% beiges Pulver, R_f -Wert: 0.56 (THF/Hexan 3/1).

F_p : 170 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 7.27 (s, 4H, HC=CH), 7.61–8.24 (m, 8H, Phenyl) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): 127.41, 128.40, 129.28, 130.96, 131.61, 131.95 (Phenyl), 134.79 (HC=CH), 166.71 (C=O), 169.82 (Anhydrid) ppm; MS (EI): $m/z = 416$ (9%), 200 (100%); ber.: C 63.42%, H 2.88%, N 6.73%; gef.: C 63.26%, H 3.44%, N 6.23%.

m-Maleinimidobenzoesäurechlorid (**9**, C₁₁H₆NO₃Cl (235.6))

30 g (138 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäure [5] wurden in 650 ml Toluol suspendiert und mit 48.9 g (30 ml, 411 mmol) Thionylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 48 Stunden lang unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß auf 90 °C erwärmt. Das überschüssige Thionylchlorid und das Toluol wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand aus 100 ml Aceton umkristallisiert. Das Produkt wurden abgesaugt, mit Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet; 65%. *R_f*-Wert: 0.78 (Essigester/Hexan 1/1).

Fp.: 124 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 6.93 (s, 2H, HC=CH), 7.60–8.19 (m, 4H, Phenyl) ppm; ¹³C-NMR (DMSO-d₆): 128.39, 129.47, 129.77, 130.32, 132.27, 134.38 (Phenyl), 134.45 (HC=CH), 167.59 (C=O), 168.82 (COCl) ppm; MS (EI): *m/z* = 235 (10%), 200 (100%), 172 (39%), 144 (19%), 116 (28%); ber.: C 56.07%, H 2.57%, N 5.94%, Cl 15.04%; gef.: C 56.11%, H 2.68%, N 5.90%, Cl 14.79%.

p-Maleinimidophenyllessigsäurechlorid (**10**, C₁₂H₈NO₃Cl (249.7))

1.0 g (4.33 mmol) *p*-Maleinimidophenyllessigsäure wurden in 25 ml Dichlormethan suspendiert und mit einem 2.5-fachen Überschuß an Oxalsäuredichlorid (1.37 g, 945 µl, 10.82 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Feuchtigkeitsausschluß auf 30–40 °C erwärmt und 15 h lang gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch im Hochvakuum getrocknet. Kristallisation aus Toluol lieferte ein gelbes Pulver (59%); *R_f*-Wert: 0.29 (Essigester/Hexan 4/1).

Fp.: 154 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3.67 (s, 2H, CH₂), 6.84 (s, 2H, HC=CH), 7.30–7.45 (m, 4H, Phenyl) ppm; ¹³C-NMR (DMSO-d₆): 42.06 (CH₂), 126.59, 129.82, 130.23, 134.25, (Phenyl), 134.75 (HC=CH), 169.82 (C=O), 172.65 (COCl) ppm; MS (CI, Ammoniak): *m/z* = 249 (100%); ber.: C 58.91%, H 3.30%, N 5.75%, Cl 14.49%; gef.: C 60.61%, H 3.64%, N 5.13%, Cl 13.80%.

m-Maleinimidobenzoesäure-2-aminoethylester·HCl (**11**, C₁₃H₁₃N₂O₄Cl (296.8))

500 mg (479 µl; 3.10 mmol) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-ethanolamin wurden unter Rühren bei Raumtemperatur in 10 ml Essigester gelöst und mit 472 mg (650 µl, 4.65 mmol) Triethylamin versetzt. Nun wurden 1.1 g (4.65 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäurechlorid (**9**), gelöst in 30 ml Essigester, innerhalb von 30 Minuten zutropft. Nach Ende des Zutropfens wurde der Ansatz 15 h lang bei RT gerührt. Dann wurde von den ausgefallenen Salzen abfiltriert und die Lösung 3 × mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die Essigesterphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der sirupöse Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/Hexan 1/1; 49% gelber Sirup. *R_f*-Wert: 0.27 (Essigester/Hexan 1/1).

¹H-NMR (CDCl₃): 1.41 (s, 9H, *tert*-Butyl), 3.51 (dt, 2H, *J* = 6.0/6.2 Hz, N-CH₂), 4.38 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂-O), 4.91 (br, s, 1H, NH), 6.90 (s, 2H, CH=CH), 7.55–8.12 (m, 4H, Phenyl) ppm.

8.0 g (22.2 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäure-2-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl))-aminoethylester wurden in 70 ml einer 1 M Lösung von HCl in Ether (Aldrich) gelöst und bei RT während 15 h gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, mit absolutem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet; 42%, *R_f*-Wert: 0.14 (Essigester/Methanol 1/2).

Fp.: 84 °C (Zersetzung); ¹H-NMR (CDCl₃): 3.22 (m, 2H, N-CH₂), 4.51 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz, CH₂-O), 7.28 (s, 2H, HC=CH), 7.68–8.25 (m, 4H, Phenyl), 8.51 (s, 3H, NH₃) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃): 37.74 (N-CH₂), 61.65 (CH₂-O), 127.88, 128.89, 129.22, 130.10, 131.75, 131.87 (Phenyl), 134.75 (HC=CH), 164.83 (Ester), 169.64 (C=O) ppm; MS (FAB, 4-Nitrobenzylalkohol): *m/z* = 279 (7%), 261 (100%), 200 (32%), 185 (28%); ber.: C 52.61%, H 4.38%, N 9.44%; gef.: C 51.09%, H 4.02%, N 8.68%.

m-Maleinimidobenzoesäure-2-hydrazinoethylester·2HCl (**12**, C₁₃H₁₅N₃O₄Cl₂ (348.1))

6.0 g (5.3 ml, 78.8 mmol) 2-Hydroxyethylhydrazin (90%) in 30 ml Dichlormethan wurden bei RT in einem Kolben vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 15.46 g (70.92 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat,

gelöst in 30 ml Dichlormethan, unter Rühren zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde während 24 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml Ether aufgenommen. Die Etherphase wurde 5 × mit je 50 ml Wasser extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und der Ether im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 4/1; 20% weißer Feststoff; R_f -Wert: 0.54).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.45 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 1.47 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 3.56 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, N-CH₂), 3.71 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH₂-O), 4.00 (s, 1H, OH), 6.51 (s, 1H, NH) ppm.

2.39 g (8.66 mmol) Di-N-(*tert.*-butoxycarbonyl)-ethanolhydrazin und 1.37 g (1.89 ml, 13.6 mmol) Triethylamin wurden in 30 ml THF gelöst: Unter Rühren bei RT wurden 3.3 g (14.0 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäurechlorid (9), gelöst in 50 ml THF, innerhalb von 30 Minuten zugetropft und anschließend 1 h lang weitergerührt. Es wurde von den ausgefallenen Salzen abfiltriert und die rötliche Reaktionslösung im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1; 35% elfenbeinfarbener Feststoff; R_f -Wert: 0.65).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.40 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 1.47 (s, 9H, *tert.*-Butyl), 3.82 (dt, 2H, $J = 6.0/6.2$ Hz, N-CH₂), 4.50 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, CH₂-O), 6.52 (s, 1H, NH), 6.90 (s, 2H, CH=CH), 7.56–8.06 (m, 4H, Phenyl) ppm.

2.26 g (4.75 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäure-2-(di-N-(*tert.*-butoxycarbonyl))-hydrazinoethyl-ester wurden in einer 1 M Lösung von HCl in Ether gelöst und 15 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurde der Niederschlag abgesaugt und mit absolutem Ether gewaschen. Der elfenbeinfarbene Feststoff wurde im Hochvakuum getrocknet; 50% weißer Feststoff, R_f -Wert: 0.28 (Essigester/Hexan 4/1).

F_p : 105 °C (Zersetzung); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3.38 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, N-CH₂), 4.42 (br, s, 3H, NH₃), 4.50 (s, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH₂-O), 7.19 (s, 2H, HC=CH), 7.63–8.13 (m, 4H, Phenyl) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): 34.10 (N-CH₂), 61.56 (CH₂-O), 127.62, 128.68, 130.05, 130.32, 130.46, 131.61 (Phenyl), 134.78 (HC=CH), 164.94 (Ester), 169.68 (C=O) ppm; MS (FAB, 4-Nitrobenzylalkohol): $m/z = 312$ (100%, M-Cl), 276 (79%, M-2Cl), 236 (37%); ber.: C 44.70%, H 4.30%, N 12.03%, gef.: C 45.23%, H 5.10%, N 11.13%.

m-Maleinimidobenzoesäure-2-hydroxyethylamid (13, C₁₂H₁₂N₂O₄ (260.2))

In einem Zweihalskolben wurden 10 ml Essigester vorgelegt. 500 mg Maleinimidobenzoesäurechlorid (9; 2.12 mmol) und 128 mg (127 µl, 2.12 mmol) 2-Aminoethanol wurden in je 25 ml Essigester gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur simultan zugetropft. Anschließend wurde 15 h lang weitergerührt, die Lösung im Vakuum auf die Hälfte eingengt und anschließend bei -20 °C kaltgestellt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und aus Essigester/Hexan umkristallisiert; 65% farbloses Pulver, R_f -Wert: 0.50 (Essigester/Hexan 3/1).

F_p : 119 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$): 4.12 (s, 4H, 2 × CH₂), 7.07 (s, 2H, HC=CH), 7.71–8.29 (m, 4H, Phenyl) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$): 52.35 (2 × CH₂), 127.12, 128.97, 129.25, 130.32, 131.39, 131.58 (Phenyl), 134.34 (HC=CH), 166.07 (Amid), 169.14 (C=O) ppm; MS (FAB, 4-Nitrobenzylalkohol): $m/z = 261$ (64%), 200 (9%), 136 (77%); ber.: C 60.00%, H 4.62%, N 10.77%; gef.: C 60.89%, H 4.02%, N 9.78%.

m-Maleinimidobenzoesäurehydrazid·CF₃COOH (14, C₁₂H₁₂N₂O₂ (260.2))

12.56 g (53.0 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäurechlorid und 10.04 g (76.0 mmol) Hydrazinoameisensäure-*t*-butylester wurden in 150 ml wasserfreiem THF gelöst und 2.5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die anfangs gelbe Lösung färbte sich mit der Zeit intensiv orange-braun. Es fiel ein heller

ockergelber Niederschlag aus. Daraufhin wurde das *THF* im Vakuum entfernt und der Rückstand in ca. 400 ml Essigester aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die Essigesterphase wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Essigester/Hexan umkristallisiert; 71%, R_f -Wert: 0.66 (*THF*)².

Fp.: 197 °C (Zersetzung).

5.0 g (15 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäurehydrazino-*tert*-butylcarbazat wurden in 20 ml eisgekühlter Trifluoressigsäure gelöst und während 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure im Hochvakuum entfernt und der zurückgebliebene gelb-orange Rückstand in Ether suspendiert. Nach Behandlung im Ultraschallbad wurde der hellgelbe Niederschlag abgesaugt, mit trockenem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet; 92% gelbliches Pulver, R_f -Wert: 0.43 (*THF*).

Fp.: 136 °C; ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): 7.21 (s, 2H, HC=CH), 7.51–7.95 (m, 4H, Phenyl), 10.67 (s, 3H, NH₃), 11.91 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): 125.92, 126.49, 129.35, 130.66, 131.73, 132.05 (Phenyl), 134.65 (HC=CH), 165.14 (O=C–NH–NH₃), 169.68 (C=O) ppm; MS (Cl, Ammoniak): m/z = 464 (20%), 269 (62%), 232 (100%, M-113 (CF₃COO)), 217 (61%); ber.: C 49.34%, H 3.74%, N 15.70%; gef.: C 48.95%, H 3.35%, N 15.27%.

p-Maleinimidophenylelessigsäurehydrazid.CF₃COOH (**15**, C₁₃H₁₀N₃O₅F₃ (359.3))

3.5 g (14 mmol) *p*-Maleinimidophenylelessigsäurechlorid wurden zusammen mit einem 1.5-fachen Überschuss an Hydrazinoameisensäure-*t*-butylester (2.87 g, 21.7 mmol) in 50 ml wasserfreiem *THF* gelöst (Lösung erwärmt sich dabei) und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das *THF* wurde im Hochvakuum entfernt und der gelbe ölige Rückstand wurde in 500 ml Essigester aufgenommen. Die Essigesterphase wurde zweimal mit je 125 ml Wasser ausgeschüttelt und anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und aus Essigester/Hexan umkristallisiert. Das gelbe Produkt wurde abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet; 90%, R_f -Wert: 0.50 (*THF*/Hexan 3/1).

Fp.: 152 °C (Zersetzung).

25 g (7.25 mmol) *p*-Maleinimidophenylelessigsäurehydrazino-*tert*-butylcarbazat wurden in 12 ml eisgekühlter Trifluoressigsäure gelöst und 1 h lang bei RT gerührt. Nach weiterem 20-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Trifluoressigsäure im Hochvakuum entfernt und der gelb-orange Rückstand in 50 ml Ether suspendiert (Rühren und Ultraschallbehandlung). Der gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit trockenem Ether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet; 82% gelbliches Pulver, R_f -Wert: 0.06 (*THF*/Hexan 3/1).

Fp.: 112 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3.63 (s, 2H, CH₂), 7.21 (s, 2H, HC=CH), 7.25–7.46 (m, 4H, Phenyl), 9.82 (s, 3H, NH₃), 10.91 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C-NMR (DMSO-d₆): 39.21 (CH₂), 126.82, 126.95, 129.41, 129.65, 130.31, 134.46 (Phenyl), 134.70 (HC=CH), 169.44 (O=C–NH–NH₃), 169.96 (C=O) ppm; MS (Cl, Isobutan): m/z = 492 (32%), 263 (54%), 246 (100%, M-113 (CF₃COO)); ber.: C 46.80%, H 3.34%, N 11.70%; gef.: C 45.95%, H 3.24%, N 11.51%.

m-Maleinimidobenzaldehyd (**16**, C₁₁H₇NO₃ (201.2))

2.0 g (8.5 mmol) *m*-Maleinimidobenzoesäurechlorid wurden in 40 ml absoluten *THF* gelöst und unter Rühren und Stickstoffatmosphäre auf –78 °C gekühlt (Aceton/Trockeneis). Anschließend wurden

² Die NMR-Spektren und Elementaranalysen der Zwischenprodukte von **14** und **15** sind hier nicht aufgeführt. Die Verbindungen waren DC-rein und wurden ohne weitere Aufarbeitung unmittelbar weiter umgesetzt.

innerhalb 1 h 8.4 ml Lithium-*tri-tert.*-butoxy-aluminiumhydrid (1 M Lösung in absoluten THF; 8.4 mmol) langsam zugetropft. Dabei trübte sich die anfänglich klare Lösung. Nach dem Zutropfen wurde die Suspension langsam auf Raumtemperatur erwärmt und auf 200 ml Eis gegeben. Der entstandene ockerfarbene Niederschlag wurde abgesaugt und verworfen. Die gelbliche Lösung wurde eingeeengt, wobei erneut ein Niederschlag (dieses Mal gelb) ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt, die Mutterlauge nochmals eingeeengt und der sich bildende Niederschlag erneut abgesaugt. Die vereinigten Niederschläge wurden aus *EE*/Hexan umkristallisiert; 21% gelbes Pulver, R_f -Wert: 0.55 (Eisigester/Hexan 2/1).

Fp.: 89 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.27 (s, 2H, HC=CH), 7.69–8.21 (m, 4H, Phenyl), 10.06 (s, 1H, CHO) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 126.54, 128.89, 129.75, 132.26, 132.41, 136.78 (Phenyl, 134.73 (HC=CH), 169.57 (C=O), 192.39 (CHO) ppm; MS (EI): $m/z = 201$ (100%), 172 (32%), 54 (97%); ber.: C 65.68%, H 3.45%, N 6.96; gef.: C 65.24%, H 3.54%, N 6.71%.

Maleinimidoacetaldehyd (17, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$ (139.1))

20.1 g (94.3 mmol) Maleinimidoacetaldehyddiethylacetal (5) wurden in 350 ml Dichlormethan gelöst und 40.2 g Kieselgel 60 unter Rühren hinzugefügt. Es wurden 4.02 g 30%ige Schwefelsäure zugegeben und 60 h lang unter Rückfluß erhitzt. Dann wurde das Kieselgel abfiltriert und die Reaktionslösung zur Entfernung der Säure mit 4 × 50 ml Wasser extrahiert. Das Dichlormethan wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wurde aus Essigester/Hexan (1:10) umkristallisiert; 15% weiße Kristalle, R_f -Wert: 0.52 (THF/Hexan 3/1)

Fp.: 68–69 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 4.42 (s, 2H, CH_2), 6.83 (s, 2H, HC=CH), 9.60 (s, 1H, CHO) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 47.19 (CH_2), 134.52 (HC=CH), 169.79 (C=O), 193.39 (CHO) ppm; MS (CI, Isobutan): $m/z = 198$ (8%), 140 (100%); ber.: C 51.76%, H 3.34%, N 10.06%; gef.: C 51.48%, H 4.14%, N 9.60%.

2-Ethylmaleinimido-*p*-toluolsulfonat (18, $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{S}$ (295.3))

1.0 g (7.1 mmol) 2-Hydroxyethylmaleinimid wurde mit einem 1.2-fachen Überschub an *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (1.62 g, 8.5 mmol) in 50 ml wasserfreiem THF gelöst und ein zweifacher Überschub an Triethylamin (1.44 g, 1.98 ml, 14.3 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde 72 h lang bei Raumtemperatur gerührt, danach der gebildete weiße Niederschlag abgesaugt und die Lösung im Wasserstrahlvakuum eingeeengt. Durch eine säulenchromatographische Reinigung wurde ein weißes Produkt isoliert (Laufmittel: Essigester/Hexan 1/1; 85% farbloses Pulver, R_f -Wert: 0.30.

Fp.: 105 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 2.46 (s, 3H, CH_3), 3.80 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, N- CH_2), 4.21 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH_2 -O), 6.69 (s, 2H, HC=CH), 7.32–7.77 (m, 4H, Phenyl) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 21.64 (CH_3), 36.80 (N- CH_2), 66.18 (CH_2 -O), 127.97, 129.95, 132.82, 145.06 (Phenyl), 134.17 (HC=CH), 170.02 (C=O) ppm; MS (FAB, 4-Nitrobenzylalkohol): $m/z = 296$ (100%); ber.: C 52.88%, H 4.41%, N 4.75%; gef.: C 53.18%, H 4.58%, N 4.68%.

Chlorameisensäure-2-maleinimidoethylester (19, $\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_4\text{Cl}$ (203.5))

2.0 g (14.2 mmol) 2-Hydroxyethylmaleinimid (1) wurden in 150 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 1.56 g (4.8 mmol) Triphosgen versetzt. Nach der Zugabe von 479 mg (660 μl , 4.8 mmol) Triethylamin wurde der Ansatz 72 h lang bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Hexan 2/1; Ausbeute: 80% farbloser Feststoff, R_f -Wert: 0.69.

Fp.: 45 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 3.88 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, N- CH_2), 4.43 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, CH_2 -O), 6.78 (s, 2H, HC=CH) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 36.16 (N- CH_2), 68.09 (CH_2 -O), 134.33 (HC=CH), 151.31

(COCl), 170.04 (C=O) ppm; MS (FAB, 4-Nitrobenzylalkohol): $m/z = 296$ (100%); ber.: C 41.25%, H 2.95%, N 6.88%, Cl 17.41%; gef.: C 41.11%, H 3.00%, N 6.88%, Cl 16.94%.

Dank

Diese Arbeiten wurden von der *Dr. Mildred Scheel Stiftung der Deutschen Krebshilfe* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* unterstützt.

Literatur

- [1] Frankel AE (1988) Immunotoxins. Kluwer Academic Publishers
- [2] Yoshitake S, Yamada Y, Ishikawa E, Masseyeff R (1979) *Eur J Biochem* **101**: 395
- [3] Blair AH, Ghose TI (1983) *J Immunol Methods* **59**: 129; Means GA, Feeney RE (1990) *Bioconjugate Chem* **1**: 2
- [4] Rich DH, Gesellchen PD, Tong A, Cheung A, Buckner CK (1975) *J Med Chem* **18**: 1004
- [5] Kitagawa T, Shimonzo T, Aikawa T, Yoshida T, Nishimura H (1981) *Chem Pharm Bull* **29**: 1130
- [6] Keller O, Rudinger J (1975) *Helv Chim Acta* **58**: 531
- [7] Helferisch B, Wesemann W (1967) *Chem Ber* **100**: 421
- [8] Annunziato ME, Patel US, Ranade M, Palumbo PS (1993) *Bioconjugate Chem* **4**: 212
- [9] Heindel ND, Zhao H, Egolf RA, Chang C, Schray KJ, Emerich JG, McLaughlin JP, Woo DV (1991) *Bioconjugate Chem* **2**: 427
- [10] Serino AJ (1988) *J Org Chem* **53**: 2661
- [11] Goldstein JL, Richard GW, Brown MS (1979) *Nature* **279**: 679

Received July 12, 1996. Accepted August 2, 1996