

- THF hergestellt) durch Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat in CH_2Cl_2 (97%) und Dibromolefinierung (CBr_4 , PPh_3 , Benzol, 52%) erhalten.
- [6] R. Eastmond, T. R. Johnson, D. R. M. Walton, *Tetrahedron* **1972**, *28*, 4601–4616.
- [7] Im Anschluß an die für **15** beschriebene Aufarbeitung [4] wurden die Verbindungen **4–6**, **16** und **18** durch C_{18} -Umkehrphasenchromatographie [$\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:2)] gereinigt. Verbindung **19** wurde durch Flashchromatographie (SiO_2 , Hexan) gereinigt.
- [8] a) F. Diederich, R. Ettl, Y. Rubin, R. L. Whetten, R. Beck, M. Alvarez, S. Anz, D. Sensharma, F. Wudl, K. C. Khemani, A. Koch, *Science* **1991**, *252*, 548–551; b) F. Diederich, R. L. Whetten, C. Thilgen, R. Ettl, I. Chao, M. M. Alvarez, *ibid.* **1991**, *254*, 1768–1770; c) F. Diederich, U. Jonas, V. Gramlich, A. Herrmann, H. Ringsdorf, C. Thilgen, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2445–2453.
- [9] F. Diederich, Y. Rubin, C. B. Knobler, R. L. Whetten, K. E. Schriver, K. N. Houk, Y. Li, *Science* **1989**, *245*, 1088–1090.
- [10] a) M. J. S. Dewar, *J. Chem. Soc.* **1952**, 3544–3550; b) N. F. Phelan, M. Orchin, *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 633–637; c) M. Traetteberg, P. Bakken, A. Almennin, W. Lüttke, J. Janssen, *J. Mol. Struct.* **1982**, *81*, 87–103; d) H. Berneth, B. Hagenbruch, S. Hümg, B. Ort, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 354–369; e) W. Hutter, H.-K. Bodensch, *J. Mol. Struct.* **1993**, *291*, 151–158.
- [11] a) F. Bohlmann, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2191–2197; b) Y. Hori, K. Noda, S. Kabayashi, H. Taniguchi, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 3563–3566.
- [12] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- [13] H. Hopf, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 947–958; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 948–959.
- [14] J. Anthony, C. Boudon, F. Diederich, J.-P. Gisselbrecht, V. Gramlich, M. Gross, H. Hobi, P. Seiler, *Angew. Chem. und Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, im Druck.

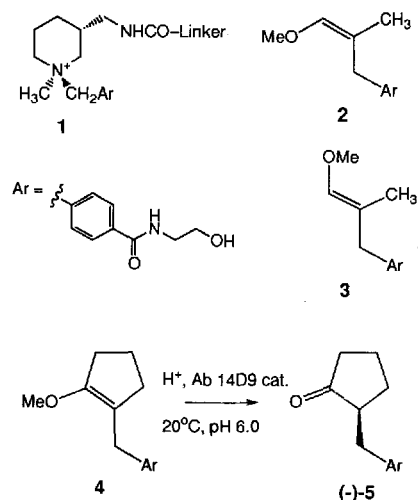
Antikörperkatalysierte, enantioselektive Synthese im Gramm-Maßstab**

Jean-Louis Reymond*, Jean-Louis Reber und Richard A. Lerner*

Viele antikörperkatalysierte Reaktionen sind mittlerweile bekannt, darunter auch enantioselektive und unter anderen Bedingungen nicht ablaufende Prozesse^[1]. Diese Reaktionen können in wäßriger Phase unter sehr milden Bedingungen durchgeführt werden, so daß sie, wenn sie in entsprechend großem Maßstab durchführbar wären, für die präparative Organische Chemie sehr attraktiv sind. Wir berichten hier über die Herstellung eines Produktes im Gramm-Maßstab mit Hilfe eines katalytisch wirkenden Antikörpers.

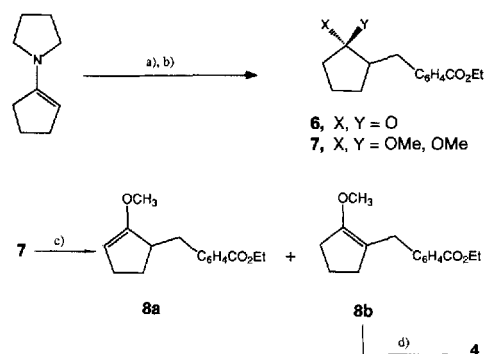
Vor kurzem berichteten wir, daß gegen das Hapten **1** gerichtete Antikörper die Hydrolyse der Enolether **2** und **3** (Schema 1) mit einer sehr hohen Enantioselektivität bezüglich der Bereitstellung des Protons katalysieren^[2]. Bei der Suche nach alternativen Substraten beobachteten wir, daß der Antikörper 14D9 besonders gut die Hydrolyse des cyclischen Enolethers **4** katalysiert; dabei wird mit $k_{\text{cat}} = 0.7 \text{ s}^{-1}$ bei pH 6.0 und einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat.}} = 10^4$ ^[3] das enantiomerenreine Keton (–)-**5** gebildet. Inkubiert man eine 1 mM Lösung des Substrates **4** bei pH 7.0 und 20 °C mit einer 10 μM Lösung des Antikörpers 14D9, so kann man innerhalb einer Stunde eine vollständige Umwandlung in das Produkt beobach-

ten. Eine Produkthemmung ist nicht erkennbar. Ohne Zusatz des Antikörpers werden weniger als 5% des Substrates umgesetzt. Nach diesen ermutigenden Vorversuchen begannen wir, den Maßstab dieser Reaktion zu vergrößern.



Schema 1. Hapten, Substrate und katalytische Reaktionen des Antikörpers (Ab) 14D9.

Das Substrat **4** wurde wie folgt dargestellt (Schema 2): Die Alkylierung von Pyrrolidino-1-cyclopenten mit Ethyl-4-chlor-methylbenzoat und anschließende Ketalisierung des resultierenden Ketons **6** ergibt das Ketal **7**; dieses wurde in hoher Ausbeute zu einer 1:1-Mischung der Enolther **8a** und **8b** umgesetzt, indem man in trimethylorthoformiat mit Ammoniumcamphersulfonat ($\text{NH}_4^+ \text{CSA}$) als Katalysator erhitzte^[4]. Das Isomer **8b** wurde durch Säulenchromatographie gereinigt und durch Behandlung mit Ethanolamin in **4** umgewandelt^[5].



Schema 2. Synthese von **4**: a) $\text{ClCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Et}$ (0.5 Äquiv.), CH_3CN , Rückfluß, 10 min, 58%; b) $(\text{MeO})_3\text{CH}$, MeOH , $\text{NH}_4^+ \text{CSA}$ cat., Raumtemperatur, 15 min, 100%; c) $(\text{MeO})_3\text{CH}$, $\text{NH}_4^+ \text{CSA}$ cat., Rückfluß, 30 min, 85%; d) Ethanolamin, Ethanol, K_2CO_3 , 50 °C, 17 h, 94%.

Der monoklonale Antikörper 14D9 wurde wie beschrieben hergestellt und gereinigt^[6]. Für die antikörperkatalysierte Reaktion wollten wir ein Verfahren ausarbeiten, für das nur eine konventionelle Laborausstattung benötigt wird und das eine effiziente Rückgewinnung des Antikörpers ermöglicht. So nutzen wir in unserem Verfahren^[7] die Dialyse für die Abtrennung des Produktes und des nicht umgesetzten Substrates vom Katalysator. Dies ist nur wegen der beträchtlichen Löslichkeit von **4** und **5** in Wasser möglich. Eine Lösung des Substrates **4** (500 mg,

[*] Prof. Dr. R. A. Lerner, J.-L. Reymond, J.-L. Reber^{†+1}

Department of Molecular Biology

The Scripps Research Institute

10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)

Telefax: Int. + 619/554-9899

[†] Derzeitige Adresse:

Sandoz Pharma, Chemical Process R & D

CH-Basel (Schweiz)

[**] Wir danken Prof. L. Ghosez, Belgien, für den Hinweis auf die Bedeutung einer antikörperkatalysierten Reaktion im präparativen Maßstab. J.-L. R. dankt der Firma Sandoz, Basel, für ein „Sabbatical“.

183 mmol) in 1 mL Methanol wurde zu dem in Puffer gelösten Antikörper (57 mL, 7 mg/mL, 400 mg) gegeben^[8] und bei Raumtemperatur in einem 250 mL-Rundkolben mit einem Magnetrührer gerührt. Innerhalb von 5 h wurden 80 % des Substrates umgesetzt, und **5** entstand mit 89–91 % ee^[9]. Die Lösung wurde anschließend in einen Dialysebeutel überführt und in 1 L des gleichen Puffers bei pH 7.0 dialysiert, wodurch 95 % des Produktes vom Antikörper getrennt werden konnten^[10]. Nicht umgesetztes Ausgangsmaterial und das gewünschte Produkt wurden durch Extraktion aus dem Dialyse-Puffer gewonnen^[11]. Das reine Ketone (–)-**5**^[12] erhält man durch Kristallisation^[13] mit einer Ausbeute von 60–65 % (bezogen auf eingesetztes Ausgangsmaterial) und einem Enantiomerenüberschuß von 86 % ee^[14]. Die im Dialysebeutel verbliebenen Antikörper wurden dann erneut mit 1 L Puffer bei pH 6.0 dialysiert, wodurch die ursprünglichen Bedingungen wiederhergestellt und verbliebenes Produkt durch Verdünnung entfernt wurde. Die Antikörper enthaltende Lösung wurde schließlich für einen weiteren Reaktionszyklus in den Glaskolben überführt. Die Prozedur wurde fünfmal wiederholt, wodurch man insgesamt 2.55 g des Substrates verbrauchte. Die Gesamtausbeute an (–)-**5** betrug 1.50 g (62 %) mit 86 % ee nach Kristallisation und bezogen auf das umgesetzte Substrat. Die Aktivität der Antikörper nahm in jedem Reaktionszyklus um 5 % ab, was auf Verluste bei der Überführung der Lösungen hinweist. Die Umsatzzahl (turnover number) betrug pro katalytisches Zentrum 4700 (940 pro Lauf)^[15].

Während wir in dem detailliert beschriebenen Experiment gereinigte Antikörper einsetzten, wurden alle Vorversuche mit dem rohen Ammoniumsulfat-Präzipitat durchgeführt. In beiden Fällen wurde die für die Hydrolyse von **4** beobachtete katalytische Aktivität des Antikörpers vollständig durch das Hapten inhibiert, d. h. es findet eine spezifische Bindung im katalytischen Zentrum des Antikörpers statt. Tatsächlich scheint die katalytische Aktivität des gereinigten Antikörpers pro Gewichtseinheit geringer zu sein als jene des Ammoniumsulfat-Präzipitats, weshalb wir annehmen, daß die Reinigung mit einer teilweisen, irreversiblen Denaturierung des Proteins einhergeht. In beiden Fällen entspricht die beobachtete Aktivität 20–40 % der für ein reines Protein erwarteten Aktivität. Der Einsatz roher Antikörper spart Arbeit und Kosten, da weitere Reinigungsschritte zeit- und materialaufwendig sind.

Antikörperkatalysierte Reaktionen können also mit konventionellen Labortechniken im Gramm-Maßstab durchgeführt werden. Der katalytisch wirksame Antikörper wird zurückgewonnen und kann erneut verwendet werden. Die für diese Studie ausgewählte Reaktion ist exemplarisch. Sie kann mit keinem anderen Katalysator enantioselektiv durchgeführt werden, und sie veranschaulicht die Rolle, die Antikörper als Katalysatoren in der präparativen Organischen Chemie spielen können.

Eingegangen am 28. September 1993 [Z 6380]

- [1] a) R. A. Lerner, S. G. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, 252, 659; b) P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 391–395.
- [2] a) J.-L. Reymond, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1711; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2257.
- [3] J.-L. Reymond, G. K. Jahanghiri, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3909.
- [4] Dieses Verfahren ist einfacher als bisher veröffentlichte Experimente. Untersuchungen über dessen Allgemeingültigkeit finden zur Zeit statt.
- [5] Ausgewählte physikalische Eigenschaften von **4**: farblose Kristalle, Schmp. 74–75 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.67, 7.22 (2 m, 2 × 2 H), 6.69 (br, t, 1 H), 3.82 (td, 2 H, J = 5, 4.5), 3.61 (dt, 2 H, J = 8, 4), 3.40 (br, s, 2 H), 2.48 (m, 2 H), 2.10 (m, 2 H), 1.81 (m, 2 H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 168.7, 152.3, 145.1, 131.4, 128.8, 126.9, 112.9, 62.5, 56.8, 42.8, 32.4, 31.0, 28.8, 19.5; IR (KBr): ν̄ = 3287, 2937, 2850, 1689; 1639, 1546, 1339, 1292, 1163, 1108, 1060, 1033, 860, 704 cm⁻¹.
- [6] 14D9 ist eine bei Mäusen vorkommende Hybridom-Zelllinie, die durch Fusion

einer 129G1X^T-Milz-Zelle (von einer mit dem Hapten **1** immunisierten Maus) mit einer balb/c-Myelom-Zelle erhalten wurde und einen κγ₁-Antikörper produziert. Der Antikörper wird durch wachsendes Ascites dieser Zelllinie produziert. Die Ascites-Flüssigkeit wurde durch Fällung mit Ammoniumsulfat, Anionenaustausch und Protein-Gelchromatographie aufgearbeitet. a) G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495; b) E. Engvall, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 419.

- [7] Alle Reaktionen wurden mit HPLC analysiert (Chiralpak-AS-Säule, 0.45 × 22 cm; Hexan/Isopropylalkohol, 7:3, 1 mL min⁻¹): t_R(**4**) = 5.3 min, t_R((+)-**5**) = 9.2 min, t_R((–)-**5**) = 12.5 min; UV-Detektion bei 240 nm.
- [8] Der Puffer besteht aus 50 mmol L⁻¹ Bistris (N,N-Bis(hydroxyethyl)tris(hydroxymethyl)aminomethan), 100 mM NaCl, pH 6.0.
- [9] Die antikörperkatalysierte Reaktion ist zu 100 % enantioselektiv. Unter den Bedingungen der Reaktion werden allerdings 10 % des Produktes durch H₂O⁺-katalysierte Hydrolyse von **4** zu *rac*-**5** gebildet.
- [10] Wir benutzten Dialyseschläuche aus Cellulose, die Proteine größer als 12–14 kDa zurückhalten. Der Antikörper hat eine Molekülmasse von 150 kDa und wird im Innern des Schlauchs zurückgehalten; Moleküle, die kleiner als 12–14 kDa sind, diffundieren durch die Membran. Das Gleichgewicht wird bei 20 °C nach 17 h erreicht. Dialyseschläuche werden auch für Enzymreaktionen benutzt, siehe: C.-H. Wong, *Science* **1989**, 244, 1145.
- [11] Die Extraktion mit Toluol (4 × 50 mL) entfernt selektiv nicht umgesetztes Substrat **4**. Der Puffer wird dann mit NaCl gesättigt, und **5** wird mit Ethylacetat extrahiert (4 × 200 mL).
- [12] Die absolute Konfiguration von (–)-**5** wurde durch Vergleich mit (+)-(*R*)-2-Benzylcyclopentanone als (*S*) festgelegt. K. Matsumoto, H. Ohta, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4729.
- [13] Das Rohprodukt (370 mg) wurde in 2 mL heißem Ethylether gelöst und durch tropfenweisen Zusatz von 1.5 mL Hexan umkristallisiert, die Ausbeute an (–)-**5** betrug 310 mg (65 %). Farblose Kristalle, Schmp. 88–90 °C, [α]_D²⁵ = –134 (c = 0.9 in EtOH); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.69, 7.21 (2 m, 2 × 2 H), 6.78 (br, t, 1 H), 3.81 (br, m, 2 H), 3.61 (q, 2 H, J = 5), 3.15 (dd, 1 H, J = 14, 4), 3.04 (br, m, 1 H), 2.60 (dd, 1 H, J = 14, 9), 2.36 (m, 2 H), 2.08 (m, 2 H), 1.96 (m, 1 H), 1.81 (b, s, 1 H), 1.74 (m, 1 H), 1.53 (ddd, 1 H, J = 23, 11, 7); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 220.0, 168.4, 144.0, 132.1, 129.1, 127.2, 62.1, 50.7, 42.8, 38.1, 35.3, 29.0, 20.5; IR (KBr): ν̄ = 3296, 2936, 2874, 1731, 1637, 1557, 1503, 1441, 1404, 1055, 805, 682 cm⁻¹.
- [14] Der zusätzliche Verlust an Enantiomerenreinheit ist auf die Hydrolyse des restlichen Enoleters **4** während der Dialyse zurückzuführen. Führt man die Dialyse bei pH 8.0 durch, so wird zwar die Hydrolyse von **4** gestoppt, gleichzeitig aber **5** racemisiert.
- [15] Die Konzentration der katalytischen Zentren vor und nach jedem Lauf wurde wie beschrieben (siehe Lit. [3]) durch quantitative Titration der katalytischen Aktivität mit dem Hapten bestimmt. Der Gesamtgehalt an aktivem Katalysator im Experiment betrug 1.3 μmol zu Beginn und sank allmählich auf 0.97 μmol nach fünf Reaktionszyklen. Es wurden also nur annähernd 0.06 Mol-% des Katalysators pro Lauf verbraucht.

Silablausäure (Silannitrit): Matrixisolierung, Assoziat mit Wasserstoff**

Günther Maier* und Jörg Glatthaar

Verbindungen des divalenten Siliciums (Silylene, Silandyle)^[1] und solche mit Mehrfachbindungen^[2] stehen nach wie vor im Blickpunkt des Interesses von Theoretikern und präparativ arbeitenden Chemikern. Unser Augenmerk gilt vor allem den unsubstituierten Stammverbindungen. Von den stickstoffhaltigen Derivaten **1–4** sind Aminosilylen **1**^[3] und Silaisoblausäure (Iminosilylen) **3**^[4] schon früher in einer Argon-Matrix gefaßt und identifiziert worden. Wir berichten hier über den Nachweis der beiden noch fehlenden Verbindungen **2** und **4**. Dabei ist Silannitrit

[*] Prof. Dr. G. Maier, Dipl.-Chem. J. Glatthaar
Institut für Organische Chemie der Universität
Heinrich-Buff-Ring 58, D-35392 Gießen
Telefax: Int. + 641/702-5712

[**] Hetero-π-Systeme, 19. Mitteilung; vorgetragen (G. M.) auf den Münchner Silicontagen (3. August 1992). Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. – 18. Mitteilung: G. Maier, H.-J. Wolf, R. Boese, *Chem. Ber.* **1990**, 123, 505–511.