

Synthese von enantiomerenreinen ω -Methanoprolinen und ω -Methanopipicolinsäuren durch eine neuartige Cyclopropanierung: die „Einebnung“ von Prolin**

Stephen Hanessian,* Ulrich Reinhold und Gabriella Gentile

Prolin nimmt in der Reihe der natürlichen Aminosäuren, die als Bestandteile von Proteinen in Säugetieren vorkommen, eine bedeutende Position ein.^[1] Als Teil einer Peptidsequenz führt die einzigartige Prolinstruktur zu sekundären Amidbindungen, die entscheidende Auswirkungen auf Konformation und Funktion haben.^[2] So ist die bekannte *cis-trans*-Isomerie der Konformation der Amidbindung in Prolylamiden mit biologischen Phänomenen und Funktionen von lebenswichtiger Bedeutung verknüpft, z. B. Proteinfaltung,^[3] Hormonregulation,^[4] biologische Erkennung^[5] und transmembrane Signalübertragung.^[6] Die Wichtigkeit der *cis-trans*-Isomerisierung zeigt sich in der Rolle, die Peptidylprolyl-Isomerasen wie die Immunophilinen bei der Immunregulation spielen.^[7] Prolin hat auch als Baustein von Therapeutika,^[8] im Wirkstoffdesign^[9] und bei Enzymaktivitätsuntersuchungen^[10] herausragende Bedeutung.

Konformativ eingeschränkte Prolinanaloga wurden bisher im Rahmen der Peptidmimetikaforschung untersucht.^[11] Im Gegensatz zu 2,3- und 3,4-Methanoprolinen^[12, 13] ist über 4,5-Methanoprolin wenig bekannt.^[14] Strukturuntersuchungen, die sich mit den Auswirkungen von Spannung in solchen Verbindungen und deren Effekte auf die Konformation und Stabilität der Amidbindung beschäftigen, wurden noch nicht durchgeführt. Dabei ist besonders der Vergleich mit Prolin von Interesse.

Wir berichten hier über hochstereokontrollierte Synthesen von diastereomeren 4,5-Methano-L-prolinen und 5,6-Methano-L-pipicolinsäuren durch eine neuartige intramolekulare Cyclopropanierung von Iminiumionen und die Übertragung dieser Methode auf Analoga.^[15, 16]

Umsetzung des einfach zugänglichen Lactams **1**^[17a] mit Lithiumhexamethyldisilazid (LiHMDS) und $\text{Me}_3\text{SnCH}_2\text{I}$ führt zu den α -alkylierten Produkten **2**, $[\alpha]_D = -15.3$ ($c = 0.43$ in CHCl_3), und **3**, $[\alpha]_D = -16.0$ ($c = 1.23$ in CHCl_3), in 63 bzw. 23% Ausbeute (Schema 1). Das *syn*-Isomer **3** war leicht über das von **2** gebildete Enolat und anschließende Umsetzung mit 2,6-Di-*tert*-butylphenol als Protonenquelle erhältlich.^[18, 19]

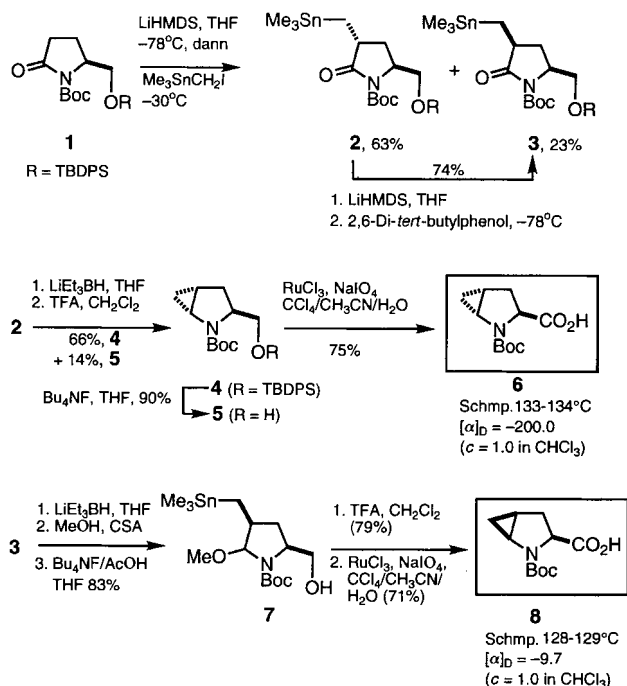
Generierung des Halbaminals ausgehend von **2** und Reaktion mit Trifluoressigsäure (TFA) führt zum (4*R*,5*R*)-Methanopyrrolidin **4**, $[\alpha]_D = -69.3$ ($c = 1.41$ in CHCl_3), das problemlos zu **5** entschützt wird. Oxidation von **5** ergibt das kristalline (4*R*,5*R*)-Methano-*N*-Boc-L-prolin **6** in exzellenter Gesamtausbeute.

Eine ähnliche Umsetzung des *syn*-Isomers **3** über das Methyloamin **7** ergibt die diastereomere, kristalline Aminosäure **8**. Die Struktur und Konformation von **6** und **8** im Kristall wurde durch Röntgenstrukturanalyse der Einkristalle bestimmt. In Tabelle 1 ist eine Übersicht ausgewählter Diederwinkel der Ver-

[*] Prof. Dr. S. Hanessian, Dr. U. Reinhold, G. Gentile
Department of Chemistry
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, QC, H3C 3J7 (Kanada)
Telefax: Int. + 514/343-5728

[**] Diese Arbeit wurde vom NSERC (Kanada) im Rahmen des „Medicinal Chemistry Chair“-Programmes unterstützt. Wir danken Dr. Michel Simard für die Röntgenstrukturanalysen. U. R. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Forschungsstipendium. G. G. dankt der Universität Siena und dem italienischen C. N. R. für ein Sommerstipendium.

- [1] B. Buß, P. G. Jones, R. Mews, M. Noltemeyer, G. M. Sheldrick, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 253; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 231.
- [2] J. Hanich, P. Klingelhöfer, U. Müller, K. Dehnicke, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1983**, 506, 68.
- [3] Übersicht: *Gmelin Handbook of Inorganic Chemistry, Sulfur-Nitrogen Compounds, Part 5*, Springer, Berlin, **1990**.
- [4] Übersicht: K. Dehnicke, U. Müller, *Comments Inorg. Chem.* **1985**, 4, 213.
- [5] Übersichten: H. W. Roesky, K. K. Pandey, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **1983**, 26, 337; *Prog. Inorg. Chem.* **1992**, 40, 445; M. Herberhold, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1981**, 29, 365; T. Chivers, F. Edelmann, *Polyhedron* **1986**, 5, 1661; P. F. Kelly, F. D. Woollins, *ibid.* **1986**, 5, 607.
- [6] B. Buß, W. Clegg, G. Hartmann, P. G. Jones, R. Mews, M. Noltemeyer, G. M. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1981**, 61; U. Behrens, R. Hoppenheit, W. Isenberg, E. Lork, J. Petersen, R. Mews, *Z. Naturforsch. B* **1994**, 49, 238.
- [7] J. Petersen, E. Lork, R. Mews, unveröffentlicht.
- [8] O. Glemser, H. Meyer, A. Haas, *Chem. Ber.* **1965**, 98, 2049.
- [9] O. Glemser, J. Wegener, R. Höfer, *Chem. Ber.* **1972**, 105, 474.
- [10] O. Glemser, W. Koch, *Z. Naturforsch. B* **1968**, 23, 745.
- [11] D. B. Beach, W. L. Jolly, R. Mews, A. Waterfeld, *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 4080.
- [12] R. Mews, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 278.
- [13] Röntgenstrukturanalyse von **7** ($\text{C}_{14}\text{H}_{36}\text{As}_2\text{F}_{24}\text{N}_{12}\text{Ni}_6\text{S}_6$), $M_r = 1205.44$; Kristallgröße $0.8 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$; orthorhombisch, Raumgruppe *Pbca*, $a = 1303.2(3)$, $b = 1263.5(3)$, $c = 2499.3(5) \text{ pm}$, $V = 4.115(2) \text{ nm}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.946 \text{ Mg m}^{-3}$, $\mu = 2.511 \text{ mm}^{-1}$. Ein zur Röntgenstrukturanalyse geeigneter Einkristall wurde mit Kel-F-Öl an einem Glasfaden fixiert und auf einem Siemens-P4-Vierkreisdiffraktometer bei -100°C vermessen. Mit graphitmonochromatisierter MoK_α -Strahlung wurden im $\omega/2\theta$ -Scan 5876 Intensitäten gesammelt ($2.39^\circ < \theta < 27.5^\circ$). Nach Mittelung verblieben 4687 Reflexe. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst. Die Verfeinerungsrechnungen konvergierten bei $wR_2 = 0.1316$ (Verfeinerung gegen F^2) für alle 4687 Reflexe und 267 Variable ($R1 = 0.0514$ für 2851 Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$). Schweratome bekamen individuelle anisotrope Auslenkungsparameter. Die Wasserstoffatome wurden mit einem Reitermodell und einem gemeinsamen isotropen Temperaturfaktor verfeinert. Eine Differenz-Fourier-Synthese zeigte außerhalb von $+730 \text{ e nm}^{-3}$ und -929 e nm^{-3} keine Restelektronendichte. Die Strukturlösung und Erstellung der Zeichnungen erfolgte mit dem SHELXTL-Programmsystem^[18], die Verfeinerungsrechnungen wurden mit dem Programm SHELXL-93^[19] durchgeführt^[20].
- [14] Röntgenstrukturanalyse von **8** ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{As}_4\text{F}_{42}\text{N}_{18}\text{Ni}_2\text{S}_9$), $M_r = 2026.43$; Kristallgröße $0.6 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$; triklin, Raumgruppe *PI*, $a = 1190.8(2)$, $b = 1375.3(3)$, $c = 2313.7(5) \text{ pm}$, $\alpha = 77.40(3)$, $\beta = 75.51(3)$, $\gamma = 64.50(3)^\circ$, $V = 3.2847(11) \text{ nm}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 2.049 \text{ Mg m}^{-3}$, $\mu = 3.018 \text{ mm}^{-1}$. Ein zur Röntgenstrukturanalyse geeigneter Kristall wurde mit Kel-F-Öl an einem Glasfaden fixiert und auf einem Siemens-P4-Vierkreisdiffraktometer bei -100°C vermessen. Mit graphitmonochromatisierter MoK_α -Strahlung wurden im $\omega/2\theta$ -Scan 12076 Intensitäten gesammelt ($2.62^\circ < \theta < 25^\circ$). Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst. Da der Kristall als Zwilling vorlag, bei dem gelegentlich Reflexe annähernd zusammenfallen, die dann naturgemäß mit deutlich zu hoher Intensität registriert werden, mußten vor der endgültigen Verfeinerung diese Reflexe aus dem Datensatz entfernt werden. Es wurden 912 von 12076 Reflexen mit folgenden Kriterien gelöscht: $F_o^2 > 2F_c^2$ und $F_o^2 > 3\sigma(F_o^2)$. Nach Mittelung der restlichen 11164 Intensitäten verblieben 10379 Reflexe. Die endgültigen Verfeinerungsrechnungen konvergierten bei $wR_2 = 0.2296$ (Verfeinerung gegen F^2) für 10379 Reflexe und 905 Variable ($R1 = 0.0873$). Schweratome bekamen individuelle anisotrope Auslenkungsparameter. Die Wasserstoffatome wurden mit einem Reitermodell und einem gemeinsamen isotropen Temperaturfaktor verfeinert. Eine Differenz-Fourier-Synthese zeigte außerhalb von $+1872 \text{ e nm}^{-3}$ und -885 e nm^{-3} keine Restelektronendichte. Die Strukturlösung und Erstellung der Zeichnungen erfolgte mit dem SHELXTL-Programmsystem^[18], die Verfeinerungsrechnungen wurden mit dem Programm SHELXL-93^[19] durchgeführt^[20].
- [15] P. D. Beer, M. G. B. Drew, P. P. Leeson, K. Lyssenko, M. I. Ogden, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 929.
- [16] J. Ribas, M. Monfort, B. Kumar Gosh, X. Solans, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2177; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2087.
- [17] (294 K): $\chi_M = 3.993 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$; $\mu = 3.06 \mu_B$. **8** (294 K): $\chi_M = 8.686 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$; $\mu = 4.51 \mu_B$. Für den bekannten Komplex^[15] zeigt die Temperaturabhängigkeit von χ_M ferromagnetisches Verhalten. Bei tiefen Temperaturen wurden auch Hinweise auf schwach antiferromagnetische Kopplung gefunden, die für einen Austausch zwischen den Dimeren sprechen.
- [18] Siemens SHELXTL-Plus: Release for Siemens R3 Crystallographic Research Systems, Siemens Analytical X-Ray Instruments Inc., Madison, WI, **1989**.
- [19] G. M. Sheldrick, SHELXL-93, Universität Göttingen, **1993**.
- [20] Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-100215“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Telefax: Int. +1223/336 033; E-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).



Schema 1. TBDPS = *t*BuPh₂Si, TFA = Trifluoressigsäure, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, CSA = Campher-10-sulfonsäure.

Tabelle 1. Ausgewählte Diederwinkel τ [°] und mittlere Auslenkung [Å] der die Pyrrolidin-Ringebene definierenden Atome und chemische Verschiebungen der ¹³C-NMR-Signale (CDCl₃).

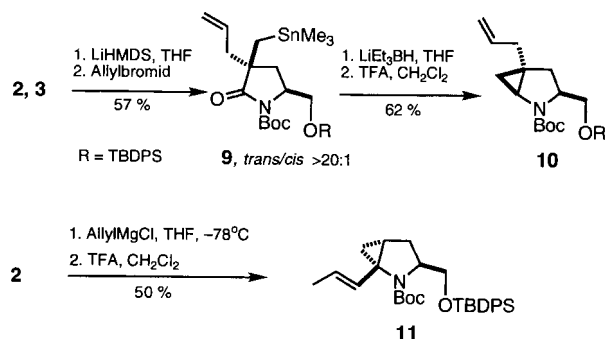
	<i>N</i> -Boc-L-prolin [20]	6	8
$\tau(\text{NC}_\alpha)$	-17	-5.6	-14.4
$\tau(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta)$	+31	+4.8	+15.3
$\tau(\text{C}_\beta\text{C}_\gamma)$	-35	-2.6	-11.4
$\tau(\text{C}_\gamma\text{C}_\delta)$	+24	-0.7	+2.9
$\tau(\text{C}_\delta\text{N})$	-4	+4.1	+7.6
$\tau(\text{BocNC}_\alpha\text{CO}_2\text{H})$	-72	-64.0	-67.1
mittl. Ausl. der def. Atome	0.018	0.003	0.013
$\delta(\text{cis/trans})$			
COOH	178.35/176.60	177.7/175.5	179.1/176.1
NC=O	153.95/155.39	157.1/154	155.7/154.1
C _α	58.8	60.8/60.1	59.5/59.1
C _β	30.75/29.53	32.0	31.5/29.1

bindungen **6** und **8** wiedergegeben, die eine beträchtliche „Einebnung“ des Pyrrolidinringes verglichen mit dem von *N*-Boc-L-prolin,^[20] insbesondere bei **6**, aufweisen.

Die Einebnung des Pyrrolidinringes in **6** findet ihren Niederschlag in der Auslenkung von 0.003 Å des C_β- und N-Atoms von der durch C_β, C_γ, C_δ und N definierten Ebene. Der entsprechende Wert in **8** beträgt 0.013 Å. Die kleinste Auslenkung aus der

C_α, N, C_δ, C_γ-Ebene ergab sich im Falle des *N*-Boc-geschützten Prolins mit 0.018 Å für die Atome C_α und C_γ, während C_β deutlich oberhalb dieser Ebene liegt (0.521 Å). Dies weicht erheblich von den Verhältnissen in **6** und **8** ab, bei denen das carboxylsubstituierte Kohlenstoffatom außerhalb der Ebene liegt (0.082 Å bzw. 0.235 Å).

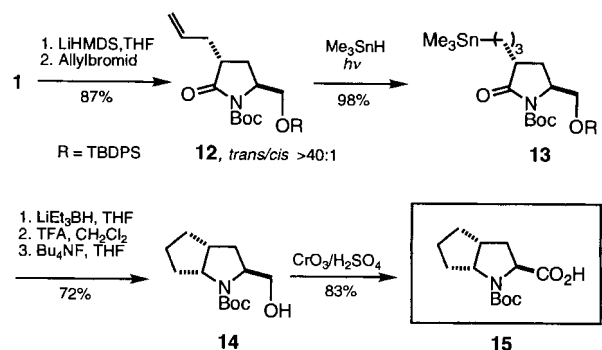
Die Intermediate **2** und **3** konnten ebenso für eine weitere stereokontrollierte Verzweigung eingesetzt werden. Diese führte zum α-C-Allylderivat **9** und nach selektiver Reduktion und säurekatalysierter Destannylierung zu der verzweigten 4,5-Methano-L-prolin-Vorstufe **10**, [α]_D = +4.3 (*c* = 0.72 in CHCl₃) (Schema 2). Umsetzung von **2** mit Allylmagnesiumchlorid und



Schema 2.

anschließender Cyclopropanierung mit Trifluoressigsäure führte zum (*S*)-5-(2-Propenyl)-4,5-methano-L-prolin-Derivat **11**, [α]_D = -27.0 (*c* = 0.57 in CHCl₃), unter Isomerisierung der terminalen Doppelbindung. Die Verbindungen **10** und **11** sind einzigartige funktionalisierte Vorstufen von konformativ starren ω-Methanoprolinen.

Die Vielseitigkeit und generelle Anwendbarkeit der intramolekularen Carbocyclisierung mit Trimethylstannylalkylsubstituenten über Iminiumionen kann anhand der Synthese bicyclischer Prolinanaloga demonstriert werden. Diese Verbindungen interessieren im Zusammenhang mit dem Blutdrucksenker Ramipril^[21] (Schema 3). Eine hochdiastereoselektive Allylierung



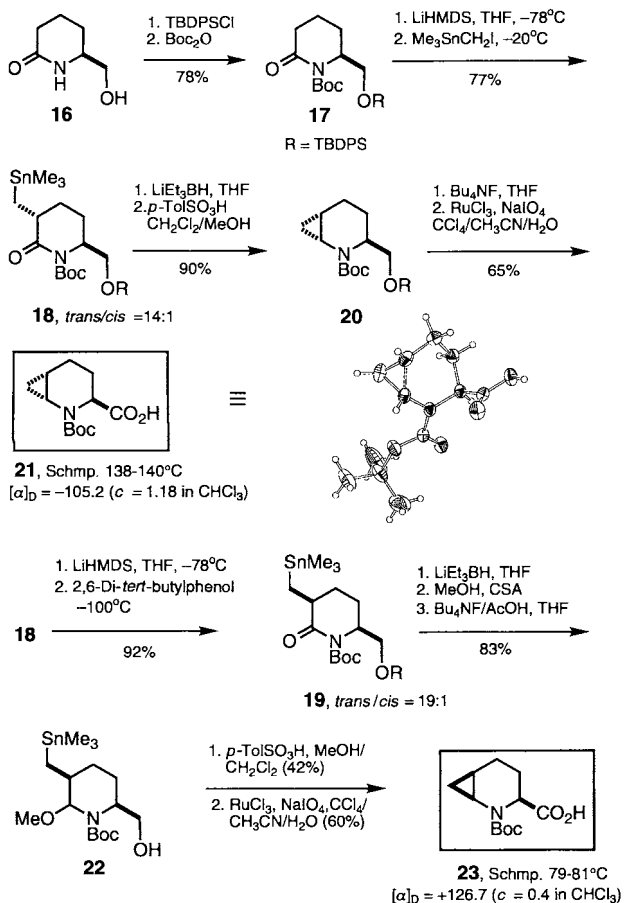
Schema 3.

der enolisierten Verbindung **1** führte zu **12**, [α]_D = -45.0 (*c* = 1.0 in CHCl₃), das nach photoinduzierter Trimethylstannyl-lierung^[22] **13**, [α]_D = -23.6 (*c* = 0.92 in CHCl₃), ergab.

Die Bildung des Halbaminals, anschließende säurekatalysierte Cyclisierung und Entfernung der Schutzgruppen führte zum bicyclischen Prolinolderivat **14**, [α]_D = -97.3 (*c* = 1.38 in CHCl₃). Abschließend lieferte eine Oxidation unter Jones-Be-

dingungen die direkte Vorstufe (4*R*,5*R*)-**15** eines Ramipril-Diastereomers, Schmp. 61–63 °C, $[\alpha]_D = -126.7$ ($c = 0.46$ in CHCl_3).

Weiterhin ist es von Interesse, die Verbindungen **6**, **8**, **10** und **11**, als Vorstufen für gespannte Analoga oder L-Pipecolinsäurevorläufer anzusehen. Eine Übertragung der Cyclopropanierung auf Pipecolinsäureanaloga wird in Schema 4 gezeigt. Trime-



Schema 4.

thylstannylmethylierung des Lithiumenolates des leicht zugänglichen Lactams **17**^[23] lieferte das *anti*-Isomer **18**. Reduktion zum Halbaminal und säurekatalysierte Cyclisierung führte zu **20**, $[\alpha]_D = -56.0$ ($c = 1.02$ in CHCl_3). Entfernen der Schutzgruppe und Oxidation ergab die kristalline (5*R*,6*S*)-Methano-*N*-Boc-L-pipecolinsäure **21**, Schmp. 138–140 °C, $[\alpha]_D = -105.2$ ($c = 1.17$ in CHCl_3). Epimerisierung von **18** zum *syn*-Isomer **19** durch diastereoselektive Protonierung und anschließende Transformation der funktionellen Gruppen wie oben beschrieben führte zur kristallinen diastereomeren (5*S*,6*S*)-Methano-*N*-Boc-pipecolinsäure **23**; Schmp. 79–81 °C, $[\alpha]_D = -126.7$ ($c = 0.40$ in CHCl_3). Die Struktur der kristallinen geschützten Aminosäure **21** wurde zweifelsfrei durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Die Prolinderivate **6** und **8** nehmen im festen Zustand eine *cis*-*N*-Boc-Prolin-Orientierung ein (Tabelle 1), die entsprechende 4,5-Methanopipecolinsäure **21** zeigt dagegen eine *trans*-Orientierung (Schema 4). Das Auftreten der *cis/trans*-Isomerie von **6** und **8** in CDCl_3 wurde, wie im Falle des *N*-Boc-L-pipecolins, durch die entsprechenden chemischen Verschiebungen der ^{13}C -NMR-Signale nachgewiesen.

Pipecolinsäure ist ein wichtiger Bestandteil der Immunsuppressiva FK-506^[24] und Rapamycin,^[25] deren α -Ketoamidein-

heit maßgeblich an den aktiven Enzym-Substrat-Komplexen beteiligt ist.^[26] Sie ist ebenso in den Metabolismus von L-Lysin, einer essentiellen Aminosäure für Säugetierwachstum und -entwicklung, eingebunden.^[27] Funktionalisierte Pipecolinsäuren werden auch als konformativ eingeschränkte Analoga von Lysin angesehen. Diese werden in der Wirkstoffentwicklung, in der Untersuchung von Peptidmimetika^[28] sowie zur Inhibierung der L-Pipecolat-Oxidase eingesetzt.^[27]

Der Ersatz von L-Prolin und L-Pipecolinsäure durch Derivate mit konformativ veränderten Ringen, repräsentiert durch die in dieser Arbeit beschriebenen Methano-Analoga, könnte wichtige Auswirkungen in der biologischen Erkennung, in der *cis-trans*-Konformationsänderung, in der Stabilität der sekundären Amidbindung gegenüber enzymatischer Spaltung und in verwandten Prozessen und Phänomenen haben. Über diesbezügliche Untersuchungen wird zu gegebener Zeit berichtet werden.

Eingegangen am 4. Februar 1997 [Z 10076]

Stichworte: Aminosäuren • Asymmetrische Synthesen • Cyclisierungen • Gespannte Ringe

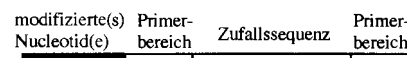
- [1] Beispiel: T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman, New York, 1984.
- [2] a) C. M. Deber, V. Madison, E. R. Blout, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 106–113; b) E. S. Eberhardt, S. N. Loh, R. T. Raines, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3055–3059; c) W. A. Houry, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11719–11733.
- [3] a) J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963; neuere Literatur: b) K. L. Borden, F. M. Richards, *ibid.* **1990**, *29*, 3071–3077; c) F. L. Texter, D. B. Spencer, R. Rosenstein, C. R. Matthews, *ibid.* **1992**, *31*, 5687–5695; d) K. Lang, F. X. Schmid, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 185–196.
- [4] a) K. A. Williams, C. M. Deber, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8919–8923; b) J. Wess, S. Nanavati, Z. Vogel, R. Maggio, *EMBO J.* **1993**, *12*, 331–338; c) T. M. Suchyna, L. X. Xu, F. Gao, C. R. Fournier, B. J. Nicholson, *Nature* **1993**, *365*, 847–849.
- [5] N. G. J. Richards, M. G. Hinds, D. M. Brennan, M. J. Glennie, J. M. Welsh, J. A. Robinson, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 119–123.
- [6] a) A. Yaron, F. Naider, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31–81; b) R. E. London, J. M. Stewart, J. R. Cann, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 41–48.
- [7] a) C. J. Andres, T. L. Macdonald, T. D. Ocain, D. Longhi, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6609; b) M. K. Rosen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 413–430; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 384–400; c) G. Fischer, *ibid.* **1994**, *106*, 1479–1501 bzw. **1994**, *33*, 1415–1436.
- [8] D. W. Cushman, H. S. Cheung, E. F. Sabo, M. A. Ondetti, *Biochemistry* **1977**, *16*, 5484–5491.
- [9] M. J. Genin, R. K. Mishra, R. L. Johnson, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3481–3483.
- [10] J. T. Yli-Kauhaluoma, J. A. Ashley, C.-H. L. Lo, J. Coakley, P. Wirsching, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5496–5497.
- [11] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267; M. Kahn, *Synlett* **1993**, 821–826; *Peptide Secondary Structure Mimetics, Tetrahedron Symposium-in-Print*, No. 50 (Hrsg.: M. Kahn), **1993**, *49*, 3433–3689; J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780–1802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699–1720; A. E. P. Adang, P. H. H. Hermkens, J. T. M. Linders, H. C. J. Ottenheijm, C. J. van Staveren, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 63–78; siehe auch T. Curran, P. M. McEnaney, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 191–194; G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1993**, *15*, 235; S. Hanesian, G. McNaughton-Smith, H.-G. Lombart, W. D. Lubell, *Tetrahedron*, im Druck.
- [12] Synthese von racemischem und enantiomerenreinem 2,3-Methanoprolin: a) A. Hercouet, B. Bessières, M. Le Corre, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1267–1268; b) F. L. Switzer, H. van Halbeek, E. M. Holt, C. H. Stammer, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 6091–6100. Neuere Übersichten über 2,3-Methanoamino-säuren: C. H. Stammer, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2231–2254; K. Burgess, K. K. Ho, D. Moyl-Sherman, *Synlett* **1994**, 575–583; K. Burgess, C.-Y. Ke, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8627–8631; J. M. Jiménez, R. M. Ortuno, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 3203–3208, zit. Lit.
- [13] Synthese von *cis*- und *trans*-3,4-Methanoprolinen: a) Y. Fujimoto, F. Irreverre, J. M. Karle, I. L. Karle, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3471–3477; neuere Diskussion über Methanopyrrolidine: D. F. Harvey, D. M. Sigano, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2268–2272; K. E. Brighty, M. J. Castaldi, *Synlett* **1996**, 1097–1099.
- [14] Synthese von racemischen 4,5-Methanoprolinamiden: a) H. Urbach, R. Henning, R. Becker, DE-A 3,324,263 (Cl. C07D209/2); *Chem. Abstr.* **1985**, *103*, P 54461g; ein ähnliches Beispiel mit Mischungen von Diastereomeren: R. Pellisari, L. Arenare, P. De Caprariis, B. Natalin, M. Marinozzi, A. Galli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1251–1257.

- [15] a) S. Hanessian, U. Reinhold, S. Ninkovic, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8967–8970; b) S. Hanessian, S. Ninkovic, U. Reinhold, *ibid.* **1996**, 37, 8971–8974.
- [16] Ausgewählte Beispiele zur Carbocyclisierungen, die über Alkylzinn(IV)-Zwischenstufen vermittelt wurden: T. L. Macdonald, C. M. Delahunty, K. Mead, D. E. O'Dell, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1573–1576; T. L. Macdonald, S. Mahalingam, D. E. O'Dell, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6767–6769; Cyclopropanierung von γ -Stannylalkoholen: D. D. Davis, H. T. Johnson, *ibid.* **1974**, 96, 7576–7577; H. G. Kuivila, N. M. Scarpa, *ibid.* **1970**, 92, 6990–6991; N. Isono, M. Mori, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7867–7872; Cyclopropanierung von β -Stannylketonen, siehe T. Sato, M. Watanabe, T. Watanabe, Y. Onoda, E. Murayama, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1894–1899; C. R. Johnson, J. F. Kadow, *ibid.* **1987**, 52, 1493–1500.
- [17] a) S. Hanessian, G. McNaughton-Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1657–1662; siehe auch b) S. Saijo, M. Wada, J.-I. Himizu, A. Ishida, *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 28, 1449; c) T. Katoh, Y. Nagata, Y. Kobayashi, K. Arai, J. Minami, S. Terashima, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5473–5476; d) K.-H. Altman, *ibid.* **1993**, 34, 7721–7724; e) J. Ackermann, M. Matthes, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 122–132.
- [18] S. G. Davies, N. M. Garrido, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1153–1159.
- [19] Alle neuen Verbindungen zeigten zufriedenstellende spektroskopische und analytische Daten (^1H -, ^{13}C -NMR, IR, LRMS, HRMS). Arbeitsvorschriften sind auf Anfrage zu erhalten. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-100227“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Telefax Int. +1223/336 033; E-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).
- [20] E. Benedetti, M. R. Ciajolo, A. Maisto, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1974**, 30, 1783–1788.
- [21] a) V. Teetz, R. Geiger, R. Henning, H. Urbach, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1984**, 10b, 1399; b) R. Henning, U. Lerch, H. Urbach, *Synthesis* **1989**, 265–268, zit. Lit.
- [22] Hydrostannylierung von Alkenen: M. Lautens, S. Kumanovic, C. Meyer, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1428–1429; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1329–1330, zit. Lit.
- [23] a) S.-B. Huang, J. S. Nelson, D. D. Weller, *Synth. Commun.* **1989**, 19, 3485–3496; b) S. A. Hermitage, M. G. Moloney, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 1463–1464.
- [24] J. J. Sierkierka, S. K. Y. Hung, M. Roe, C. S. Lin, N. H. Sigal, *Nature* **1989**, 341, 755–757.
- [25] a) M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *Nature* **1989**, 341, 758–760; b) H. Fretz, M. W. Albers, A. Galat, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. J. Burakoff, B. E. Bierer, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1409–1410.
- [26] J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, L. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, 66, 807–815.
- [27] T. M. Zabriskie, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3046–3048, zit. Lit.
- [28] P. J. Murray, I. D. Starkey, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1875–1878; A. Claesson, B.-M. Swahn, K. M. Edvinsson, H. Molin, M. Sandberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1247–1250.

Eine Methode zur In-vitro-Selektion ohne eingeschobene Amplifikationsschritte**

Joseph Smith und Eric V. Anslyn*

Aptamere für medizinisch wichtige Targets sind potentielle Leitstrukturen für Wirkstoffe.^[1] Bislang sind die Verfahren zur Selektion solcher Aptamere meist auf unmodifizierte DNA und RNA beschränkt, weil Polymerasen die meisten chemisch modifizierten Mononucleotide nicht tolerieren und daher das Selektionsverfahren beim Einbau solcher Nucleotide bereits nach einer Amplifikationsrunde abbricht.^[2] Wenn die modifizierten Nucleotide allerdings nicht Teil der Zufallsregion sind, die nach jeder Selektion durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird, stören sie die Amplifikation nicht. Jedoch müßten bei einer solchen Methode die modifizierten Oligomere nach jeden Selektionszyklus erneut in die Bibliothek eingeführt werden, wodurch das Verfahren sehr mühsam würde. Diese Einschränkung ließe sich umgehen, wenn nicht jedem Selektionszyklus eine Amplifikation folgen würde, sondern statt dessen die Zufallsregion nur einmal nach der letzten Selektionsrunde amplifiziert würde. Wenn die Region mit den modifizierten Nucleotiden von der Zufallsregion durch einen PCR-Primer getrennt wäre (Schema 1), könnte das erfolgreiche Aptamer in ähnlicher



Schema 1. Aufbau der verwendeten DNA-Aptamere (schematisch).

Weise resynthetisiert werden wie die ursprüngliche Bibliothek. Käme man bei solch einer wiederholten Selektion ohne zwischengeschaltete Amplifikation aus, könnte man hochaffine Aptamere in einem Bruchteil der Zeit gewinnen, die man normalerweise für eine In-vitro-Selektion benötigt. Auch wenn wir hier nicht auf die Verwendung modifizierter Nucleotide eingehen, werden wir doch drei notwendige Voraussetzungen für die In-vitro-Selektion ohne zwischengeschaltete Amplifikation diskutieren und ihre Tauglichkeit nachweisen.

Drei Minimalbedingungen müssen erfüllt sein, um ein In-vitro-Screening von Oligonucleotid-Bibliotheken ohne Amplifikation durchführen zu können. Erstens muß die Zahl der Kopien der ligandenbindenden Sequenzen groß genug sein, um wiederholte kleine Verluste während des gesamten Prozesses verkraften zu können. Zweitens muß das Signal/Rausch-Verhältnis (also das Verhältnis ligandenbindender zu unspezifisch bindenden Sequenzen) mit jedem Selektionszyklus zunehmen, bis das Rauschen vollständig unterdrückt ist. Da das Signal nicht verstärkt wird, muß es gelingen, das Rauschen schrittweise zu verringern, bis das Signal stärker ist als das Rauschen. Und drittens muß die Amplifikation nach dem letzten Selektionszyklus so effektiv sein, daß durch die Polymerasen genügend Kopien von den wenigen verbleibenden Molekülen hergestellt werden, um die Sequenzen zu identifizieren. Als ersten Test dieses Konzeptes haben wir ein schrittweises Screening nach ATP-bindenden Aptameren ohne Amplifikation durchgeführt. Wir verwendeten ATP, weil es schon als Zielmolekül verwendet worden war^[3] und wir so das Ergebnis unserer neuen Methode zur In-vitro-Selektion mit bekannten Daten vergleichen konnten. Die einzelnen Schritte dieser Methode sind in Abbildung 1 schematisch dem bisherigen Verfahren gegenübergestellt.

Die erste Bedingung für eine rekursive Selektion ohne Amplifikation wurde mit der Synthese einer Bibliothek von DNA-Oligonucleotiden mit einer 18 Nucleotide langen Zufallsregion erfüllt;^[4] diese enthielt nach Markierung und Reinigung ca. 17800 Kopien pro Einzelsequenz. Sechs Selektionszyklen ohne zwischengeschaltete Amplifikation wurden durchgeführt (siehe „Experimentelles“).

Wie bereits bei der zweiten Bedingung erwähnt, ist die Reduktion des Rauschpegels von überragender Bedeutung für den Erfolg des Experiments. Daher wurden die radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) nach jedem Selektionszyklus gemessen, um den Fortschritt der Prozedur sichtbar zu machen (Tabelle 1). Die ursprüngliche Bibliothek hatte eine Aktivität von

[*] Prof. E. V. Anslyn, Dr. J. Smith
The Department of Chemistry and Biochemistry
The University of Texas at Austin
Austin, TX 78712 (USA)
Telefax: Int. +512/471-8696
E-mail: anslyn@ccwf.cc.utexas.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und vom Texas Advanced Technology Program sowie von der Sloan and Dreyfus Foundation (E. V. A.) gefördert. J.S. ein Forschungsstipendium der Universität von Texas.