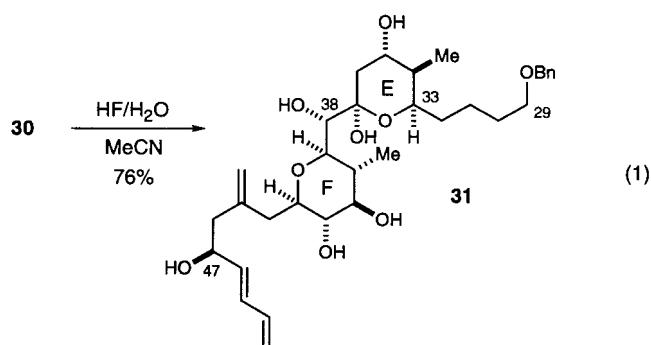


schutzgruppen und die Hydrolyse der Methoxygruppe an C₃₇, wodurch das entsprechende Lactol erhalten wurde [Gl. (1)]. Nach diesem Experiment war eine unerwünschte Eliminie-



rung zum Dihydropyran, die die abschließenden Entschützungs-schritte zur Zielverbindung gefährden könnte, nicht mehr zu befürchten. Ein Vergleich der ¹H-NMR-Daten von **31** und Altohyrtin C ließ darüber hinaus eine hervorragende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten erkennen (Tabelle 1). Die Verknüpfung der EF-Einheit **28** mit dem ABCD-Bis(spiroketal) und der

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen [ppm], Multiplizitäten und Kopplungskonstanten [Hz]; [D₆]DMSO-Lösungen.

Proton	Altohyrtin C [21]	31
C ₃₈ H	3.28 (d, 8)	3.16 (d, 8.2)
C ₃₉ H	3.60 (d-ähnlich, 10)	3.45 (d, 10.6)
C ₄₁ H	4.68 (t-ähnlich, 10)	2.91 (dt, 9.3, 5.5)
C ₄₂ H	3.04 (ddd, 10, 10, 6)	2.82 (dt, 8.7, 5.1)
C ₄₃ H	3.36 (t-ähnlich, 10)	3.21 (t-ähnlich, 9.7)
C ₄₈ H	5.72 (dd, 15, 6)	5.69 (dd, 15.2, 5.9)
C ₄₉ H	6.16 (dd, 15, 10)	6.14 (dd, 15.0, 10.7)
C ₅₀ H	6.30 (ddd, 17, 10, 10)	6.29 (ddd, 17, 10, 10)
C ₅₁ H ₂	5.01 (d, 10)	5.00 (d, 10.8)
C ₅₁ H ₂	5.14 (d, 17)	5.14 (dd, 17.0, 1.5)

Abschluß der Synthese von Altohyrtin C sind im folgenden Beitrag beschrieben.^[22]

Eingegangen am 22. Oktober 1997 [Z11066]

Stichwörter: Altohyrtin • Cytostatika • Naturstoffe • Spongistatin • Totalsynthesen

- [1] D. A. Evans, P. J. Coleman, L. C. Dias, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2951–2954; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2738–2741.
- [2] Eine Synthese des F-Ring-Fragments (C₃₆–C₄₆): I. Paterson, L. Keown, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5727–5730.
- [3] Die relative Konfiguration der C₄₄–C₃₈-F-Ring- und der C₃₇–C₂₉-E-Ring-Fragmente wurde bei den Altohyrtinen, den Spongistatinen und den Cinachryliden unterschiedlich zugeordnet: a) M. Kobayashi, S. Aoki, K. Gato, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 2142–2149; b) R. Bai, G. F. Taylor, Z. A. Cichacz, C. L. Herald, J. A. Kepler, G. R. Pettit, E. Hamel, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9714–9721; c) N. Fusetani, K. Shinoda, S. Matsunaga, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3977–3981.
- [4] Abkürzungen: dr = Diastereomerenverhältnis, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TES = Triethylsilyl, TMS = Trimethylsilyl, DIBALH = Diisobutylaluminiumhydrid, Tr = Trityl = Triphenylmethyl, Tf = Trifluormethylsulfonyl, Bn = Benzyl, PPTS = Pyridin-*p*-toluolsulfonsäure, CSA = Camphersulfonsäure, LDBB = Di-*tert*-butylbiphenyllithium, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, 9-BBN = 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan, mCPBA = *m*-Chlorperbenzoesäure, LDA = Lithiumdiisopropylamid, HMPA = Hexamethylphosphorsäuretriäthylamid.
- [5] a) R. Halcomb, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6661–6666; b) I. Kim, T. Park, S. Hu, K. Abrampah, S. Zhang, P. Livingston, S. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7716–7717; c) T. Park, I. Kim, S.

- Hu, M. Bilodeau, J. Randolph, O. Kwon, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11488–11500.
- [6] D. A. Evans, W. C. Black, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4497–4513.
 - [7] T. Fukuyama, S. C. Lin, L. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7050–7051.
 - [8] S. Hanessian, Y. Guindon, *Carbohydr. Res.* **1980**, *86*, C3–C6. Der Zusatz von Bu₄NI war bei dieser Reaktion nicht nötig.
 - [9] D. A. Evans, J. A. Murry, M. C. Kozlowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5814–5815.
 - [10] a) M. Zuger, T. Weller, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2005–2009; b) G. Frater, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 425–428.
 - [11] D. A. Evans, M. J. Dart, J. L. Duffy, M. G. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4322–4343.
 - [12] J. R. Parikh, W. von E. Doering, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5505–5507.
 - [13] B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091–2096. Die Verwendung von Ethyl-1-propenylether verhinderte die Zersetzung des säurelabilen Dihydropyrans.
 - [14] 1-Chlor-*N,N*-trimethylpropenylamin: A. Devos, J. Rémon, A.-M. Frisque-Hesbain, A. Colens, L. Ghosez, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 1180–1181.
 - [15] A. Lubineau, J. Auge, N. Lubin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 3011–3015. Verbindung **19** wurde in drei Stufen aus (*S*)-Glycerinaldehydacetoneid hergestellt.
 - [16] E. Rouvier, J.-C. Giacomoni, A. Cambon, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 1717–1723.
 - [17] a) L. E. Overman, P. A. Renhowe, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4138–4142; b) S. Weigand, R. Bruckner, *Synthesis* **1996**, 475–482.
 - [18] a) S. V. Ley, B. Lygo, A. Wonnacott, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 535–538; b) C. Greck, P. Grice, S. V. Ley, A. Wonnacott, *ibid.* **1986**, *27*, 5277–5280; c) J.-M. Beau, P. Sinay, *ibid.* **1985**, *26*, 6185–6188, 6189–6192, 6193–6196.
 - [19] Die beiden Anomere von **25** reagierten bei der Methanololyse mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Das Anomerengemisch wurde bei Raumtemperatur mit ZnI₂/MeOH versetzt, wobei das Hauptanomer in **26** ($\alpha:\beta > 95:5$) überführt wurde. Das zweite Anomer von **25** wurde dann abgetrennt und mit MgBr₂·Et₂O in siedendem MeOH zu weiterem **26** ($\alpha:\beta = 2:1$) umgesetzt. Das wichtigste Nebenprodukt in diesen Reaktionen war das durch Sulfoneliminierung gebildete Enon. Siehe: D. S. Brown, S. V. Ley, S. Vile, M. Thompson, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1329–1342.
 - [20] Wie danken Kevin R. Campos für die Röntgenstrukturanalyse von **27**.
 - [21] M. Kobayashi, S. Aoki, H. Sakai, N. Kihara, T. Sasaki, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 989–991.
 - [22] D. A. Evans, B. W. Trotter, B. Côté, P. J. Coleman, L. C. Dias, A. N. Tyler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2957–2961; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2744–2747.

Enantioselektive Synthese von Altohyrtin C (Spongistatin 2): Verknüpfung der Fragmente und Korrektur der Strukturzuordnung**

David A. Evans,* B. Wesley Trotter, Bernard Côté, Paul J. Coleman, Luiz Carlos Dias und Andrew N. Tyler

Professor Dieter Seebach und Professor Yoshito Kishi zu ihren 60. Geburtstagen gewidmet

Nach Abschluß der Synthesen der AB-,^[1] CD-^[1] und EF-Untereinheiten^[2] sollten diese nun zum Altohyrtin-C-Grundgerüst verknüpft werden (Abb. 1). Zwar konnte die C₄₄–C₅₁-Seitenkette bereits erfolgreich in das EF-Fragment eingebaut werden,^[2] doch planten wir, diesen Schritt erst in einem späteren Stadium der Synthese durchzuführen: Da der Substituent X in der Seitenkette der Altohyrtine und Spongistatine

[*] D. A. Evans,* B. W. Trotter, B. Côté, P. J. Coleman, L. C. Dias, A. N. Tyler Department of Chemistry & Chemical Biology, Harvard University Cambridge, MA 02138 (USA)
Telefax: Int. +617/495-1460
E-mail: evans@chemistry.harvard.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (NIH) und der National Science Foundation (NSF) gefördert. Wir bedanken uns für das Bereitstellen von NMR-Spektrometern durch die NSF (Nr. CHE 88-14019) und im Rahmen des NIH BRS Shared Instrumentation Grant Program (Nr. 1-S10-RR04870).

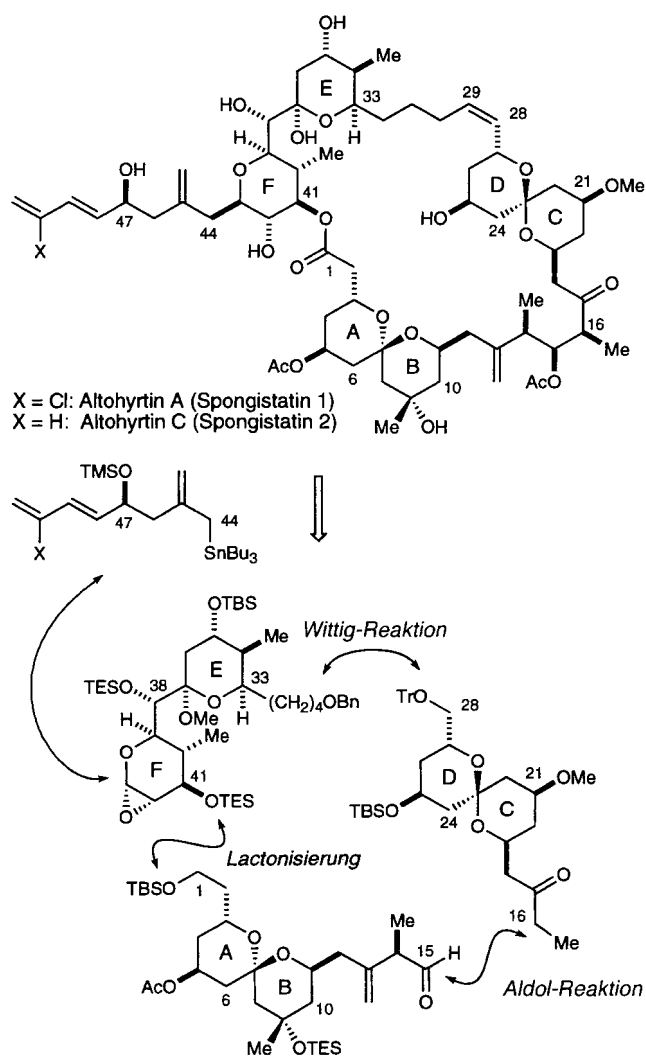
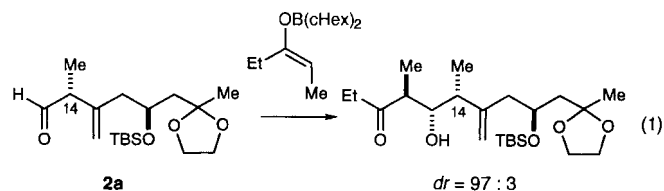


Abb. 1. Verknüpfung der Altohyrin-Untereinheiten. Siehe Lit. [4] für Abkürzungen.

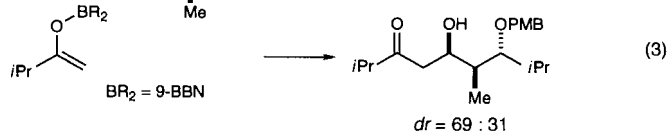
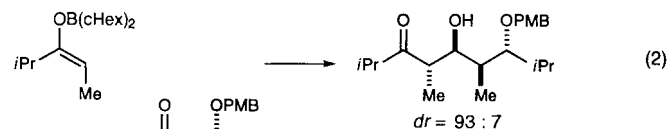
die Cytotoxizität dieser Moleküle erheblich beeinflusst,^[3] beabsichtigen wir, analoge Makrolide mit anderen Seitenketten zu synthetisieren. Hier berichten wir über den Abschluß der Totalsynthese von Altohyrin C (Spongistatin 2). Die Schlüsselschritte der Synthese sind die diastereoselektive Aldol-Reaktion der AB- und CD-Spiroketale, die Verknüpfung der ABCD- und EF-Fragmente durch eine Wittig-Reaktion, die Addition der C₄₄-C₅₁-Seitenkette an das vollständig aufgebaute ABCDEF-Grundgerüst und eine regioselektive Makrolactonisierung, bei der glücklicherweise eine Unterscheidung der Hydroxygruppen an C₄₁ und C₄₂ im F-Ring möglich war.

Die Aldol-Reaktion des CD-Spiroketaldehylketons **1**^[1] mit dem AB-Spiroketaldehyd **2**^[1] wurde zuerst untersucht (siehe Schema 1). Es gibt zwar etliche Beispiele, nach denen sich die 1,2-*anti*-Anordnung zwischen C₁₅ und C₁₆ mit einem (*E*)-Borenolat erreichen läßt,^[5] die Kontrolle der absoluten Konfiguration erschien jedoch schwieriger: Da beide Reaktionspartner der geplanten Aldol-Reaktion weitere Stereozentren enthalten, die den stereochemischen Verlauf der Reaktion beeinflussen könnten, überprüften wir jedes Fragment getrennt. Nach Modellversuchen mit dem von **1** abgeleiteten (*E*)-Borenolat nahmen wir an, daß sich die entfernt gelegenen Stereozentren nur in geringem Maße auf den

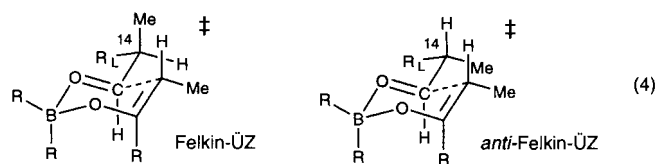
stereochemischen Verlauf der geplanten Aldol-Addition auswirken sollten.^[6] Die Umsetzung des Modellaldehyds **2a** mit dem (*E*)-Borenolat von 3-Pentanon lieferte hingegen das entsprechende Felkin-*anti*-Aldolprodukt mit einer Diastereoselektivität von 97:3 (Gl. (1)); bei den in den Gleichungen angegebenen *dr*-Werten ist das Verhältnis des dargestellten



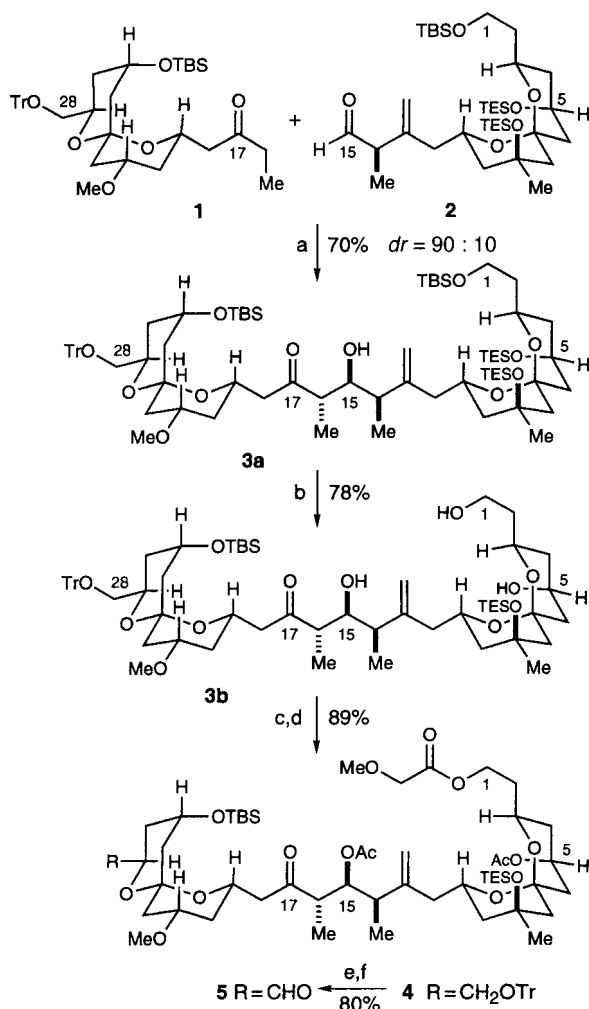
Isomers zu allen anderen gemeint).^[7] Kontrollexperimente ergaben, daß bei der Addition von (*E*)-Borenolaten [Gl. (2)] an chirale α -substituierte Aldehyde höhere Felkin-Selektivitäten erreicht werden können als mit unsubstituierten Borenolaten [Gl. (3)]. Diese höhere Selektivität kann auf eine



Destabilisierung des *anti*-Felkin-Übergangszustands durch eine sterisch ungünstige *syn*-Pentan-Wechselwirkung zurückgeführt werden [Gl. (4)].^[7a,8]



Tatsächlich führte die selektive Bildung des (*E*)-Borenolats von **1** mit Dicyclohexylchlorboran^[9] und die nachfolgende Addition des Aldehyds **2**^[10] zu einem Diastereomerengemisch im Verhältnis von 90:10 zugunsten des gewünschten Felkin-Produkts **3a** (70%; Schema 1). Wir wandten uns nun der Einführung der Acetylgruppen an C₅ und C₁₅ zu. Die selektive Entfernung der OH-Schutzgruppen an C₁ und C₅ in **3a** mit gepuffertem HF·Pyridin lieferte in guter Ausbeute das Triol **3b** (78%).^[11] Durch selektive Monoacylierung der C₁-Hydroxygruppe mit Methoxyessigsäureanhydrid und anschließende Acetylierung der Hydroxygruppen an C₅ und C₁₅ mit Essigsäureanhydrid wurde daraus **4** erhalten (89%). Wir entschieden uns für die Methoxyacetylgruppe als Schutzgruppe des C₁-Terminus, weil die selektive Hydrolyse des entsprechenden C₁-Acetats lange Reaktionszeiten erforderte. Dabei trat außerdem in deutlichem Ausmaß β -Eliminierung des C₁₅-Acetylrestes ein.



Schema 1. Verknüpfung der AB- und CD-Fragmente. a) (cHex)₂BCl, Et₃N, Pentan, 0°C, 90 min, dann -78°C, Zugabe von 2; b) HF·Pyridin, THF, 0°C; c) (MeOCH₂CO)₂O, iPr₂EtN, CH₂Cl₂; d) Ac₂O, DMAP, Pyridin, 22°C; e) Me₂AlCl, CH₂Cl₂, -78°C; f) Dess-Martin Periodinan, CH₂Cl₂. Siehe Lit.[4] für Abkürzungen.

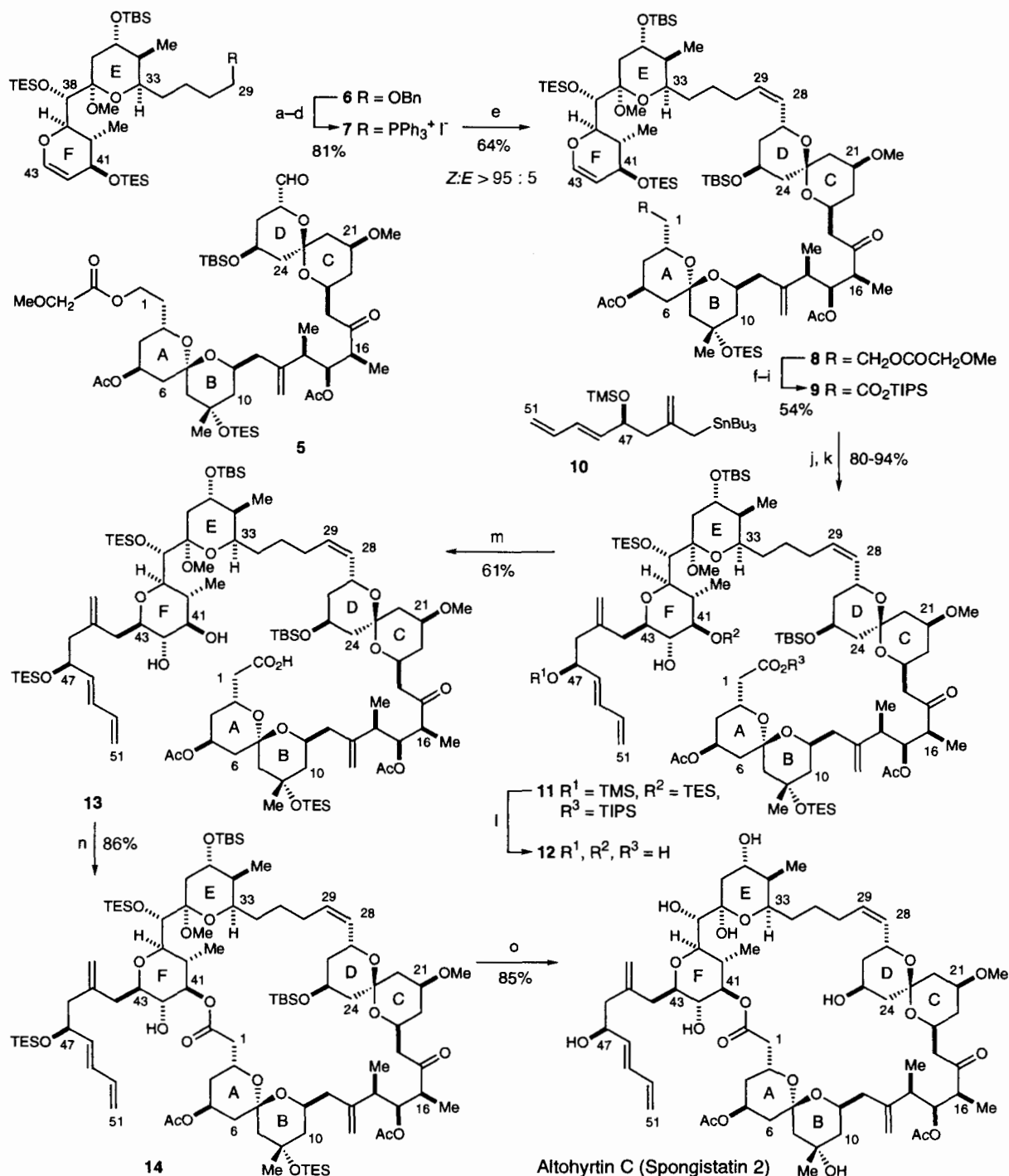
Zur Vorbereitung für die geplante Wittig-Reaktion wurde dann das C₁-C₂₈-Bis(spiroketal) **4** umfunktionalisiert. Die vorsichtige Entfernung der Tritylschutzgruppe an der C₂₈-Hydroxygruppe mit Me₂AlCl^[12] führte zum entsprechenden Alkohol,^[13] der mit Dess-Martin-Periodinan zum Aldehyd **5** oxidiert wurde. Das benötigte Phosphoniumsalz **7** wurde aus dem Benzylether **6**^[2] (Schema 2; siehe folgende Seite) nach Debenzylierung mit LDBB (96%), Mesylierung, Iodid-Substitution (94%) und Substitution mit Triphenylphosphan erhalten (91%). Die Deprotonierung von **7** (1.26 Äquiv.) mit LiHMDS und die nachfolgende Addition des Aldehyds **5** lieferten das gewünschte Wittig-Produkt **8** in 64% Ausbeute (Z:E > 95:5).^[14] Die Methoxyacetyl-Schutzgruppe der Hydroxygruppe an C₁ wurde mit NH₃/MeOH entfernt (82%). Es trat zwar keine Hydrolyse der Acetylgruppen an C₅ und C₁₅ ein, doch wurde in geringen Mengen ein Nebenprodukt isoliert, das durch β-Eliminierung des Acetylrests an C₁₅ entstanden war. Aufeinanderfolgende Dess-Martin-Oxidation (92%), Kraus-Oxidation in gepuffelter Lösung^[2] und Silylierung der entstandenen Carboxygruppe lieferten den TIPS-Ester **9** (72% über zwei Stufen).

In diesem Stadium der Synthese wurde die C₄₄-C₅₁-Seitenkette eingeführt. Die Epoxidierung der C₄₂-C₄₃-Doppelbin-

dung im F-Ring mit ca. 1.5 Äquiv. Dimethyldioxiran gelang dem ¹H-NMR Spektrum zufolge mit vollständiger Chemo- und Diastereoselektivität. Die sofortige Umsetzung des entstandenen Epoxids mit dem Allylstannan **10**^[2] (16 Äquiv.) und Tributylstannyltriflat (2 Äquiv.) lieferte in einer Ausbeute von 80–94% diastereoselektiv das gewünschte Addukt **11**, das bereits das komplette Kohlenstoffgerüst von Altohyrtin enthält. Das im Überschuß eingesetzte Allylstannan wurde nach der Säulenchromatographie vollständig zurückgewonnen. Zur Vorbereitung der Makrocyclisierung wurde an dem Ester **11** eine Reihe komplexer Reaktionen zur Entfernung der Silylschutzgruppen vorgenommen: Die Behandlung mit gepuffertem HF·Pyridin (THF, 0°C) führte zur selektiven Entfernung der TIPS-Gruppe am C-Terminus sowie der TMS-Gruppe an C₄₇ und der TES-Gruppe an C₄₁,^[15] während die Hydroxygruppen an C₉, C₂₅, C₃₅ und C₃₈ silylgeschützt verblieben. Die Yamaguchi-Makrolactonisierung^[16] der Trihydroxycarbonsäure **12** (2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, iPr₂NEt, DMAP) führte zu einem Produkt, das wir als das erwünschte Cyclisierungsprodukt mit einer Trichlorbenzoylgruppe an der C₄₇-Hydroxygruppe identifizierten. Deshalb wurde **12** vor der Makrolactonisierung selektiv als TES-Ether an der C₄₇-Hydroxygruppe geschützt (61% bezogen auf **11**).^[17]

Die Umsetzung von **13** unter den Yamaguchi-Bedingungen lieferte das Lacton **14** als einziges regioisomeres Produkt in 86% Ausbeute. Nach Entfernung der Schutzgruppen wurde der gewünschte Naturstoff erhalten, der nach Umkehrphasen-HPLC in 85% Ausbeute isoliert werden konnte. Die Regioselektivität der Makrocyclisierung wurde zweifelsfrei anhand des Kopplungsmusters der Signale der Protonen an C₄₀–C₄₄ in einem COSY-Spektrum der Zielverbindung in [D₆]DMSO nachgewiesen, das eine eindeutige Zuordnung der C₄₁H- und C₄₂H-Signale ermöglichte: Sowohl die Lage des C₄₁H-Signals bei tiefem Feld (δ = 4.68 für C₄₁H, δ = 3.04 für C₄₂H) als auch die C₄₂H–C₄₂OH-Kopplung bestätigten die Makrolactonisierung an der C₄₁-Hydroxygruppe. Daß die Seco-Carbonsäure **13**, die eine ungeschützte Hydroxygruppe an C₄₂ enthält, direkt zum Makrolid **14** cyclisiert werden kann, vereinfacht die Endphase der Synthese. Wir hatten entsprechend dem ursprünglichen Syntheseplan versucht, die Cyclisierung in dieser Weise durchzuführen, denn jede Schutzgruppe an der C₄₂-Hydroxygruppe bedeutet eine beträchtliche sterische Hinderung der C₄₁-Hydroxygruppe und damit eine Beeinträchtigung der Makrolactonisierung.

Die synthetisch hergestellte Verbindung war identisch mit einer Probe von natürlichem Spongistatin 2,^[18] wie durch ¹H-NMR-Spektroskopie (500 MHz, CD₃CN), HPLC, Electrospray-Massenspektrometrie und UV-Spektroskopie festgestellt wurde. Ein Vergleich der Drehwerte bestätigte, daß die absolute Konfiguration beider Verbindungen identisch ist (synthetisch: [α]_D²⁴ +21.3°, c = 0.03 in MeOH; natürlich: [α]_D²⁴ +29.2°, c = 0.12 in MeOH). Weitere detaillierte Vergleiche durch 1D-¹H-NMR- und 2D-COSY-Spektren (500 MHz, [D₆]DMSO) ergaben, daß unsere synthetisch hergestellte Probe ebenfalls identisch mit dem natürlichen Altohyrtin C ist.^[19] Bei Spongistatin 2 und Altohyrtin C handelt es sich also um dieselbe Verbindung, und wir vermuten, daß die Zuordnung der Konfiguration von Altohyrtin auf die übrigen Mitglieder der Spongipyranfamilie ausgedehnt werden kann. Die hier beschriebene Synthese sollte sich problemlos auf Altohyrtin A (Spongistatin 1) und Altohyrtin B^[3] übertragen lassen, die sich von Altohyrtin C nur in der Seitenkette unterscheiden. Dabei sollte sich das Intermediat **9** als



Schema 2. Abschließende Syntheseschritte. a) LDBB, THF, -78°C ; b) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 ; c) NaI , NaHCO_3 , Na_2SO_3 , Aceton; d) PPh_3 , CH_3CN ; e) LiHMDS , THF, -78°C , dann 5, -20°C ; f) NH_3 , MeOH ; g) Dess-Martin-Periodinan, Pyridin, CH_2Cl_2 ; h) NaClO_2 , 2-Methyl-2-buten, Ethyl-1-propenylether, $t\text{BuOH}$, pH 5.5; i) TIPSCl , Et_3N , THF; j) Dimethyldioxiran, Aceton, CH_2Cl_2 ; k) 16 Äquiv. 10, 2 Äquiv. Bu_3SnOTf , -78°C ; l) $\text{HF} \cdot \text{Pyridin}$, Pyridin, THF, 0°C ; m) TESCl , Imidazol, CH_2Cl_2 , 0°C (61% bezogen auf 11); n) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, $i\text{Pr}_3\text{NET}$, Benzol, dann DMAP, Benzol, Rückfluß; o) HF , H_2O , MeCN . Siehe Lit. [4] für Abkürzungen.

gemeinsame Vorstufe für die Synthese dieser Verbindungen und nicht natürlicher Analoga verwenden lassen.^[20]

Eingegangen am 22. Oktober 1997 [Z11067]

Stichwörter: Althoyrtin • Cytostatika • Naturstoffe • Spongistatin • Totalsynthesen

[1] D. A. Evans, P. J. Coleman, L. C. Dias, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2951–2954; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2738–2741.

- [2] D. A. Evans, B. W. Trotter, B. Côté, P. J. Coleman, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2954–2957; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2741–2744.
- [3] Repräsentative IC_{50} -Werte gegen Tumorzelllinien: a) M. Kobayashi, S. Aoki, K. Gato, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 2142–2149; Althoyrtin A ($\text{X} = \text{Cl}$) 0.01 ng mL^{-1} , Althoyrtin B ($\text{X} = \text{Br}$) 0.02 ng mL^{-1} , Althoyrtin C ($\text{X} = \text{H}$) 0.40 ng mL^{-1} ; b) R. Bai, G. F. Taylor, Z. A. Cichacz, C. L. Herald, J. A. Kepler, G. R. Pettit, E. Hamel, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9714–9721; Spongistatin 1 ($\text{X} = \text{Cl}$) 0.13 nM ; Spongistatin 2 ($\text{X} = \text{H}$) 0.85 nM .
- [4] Abkürzungen: *dr* = Diastereomerenverhältnis, 9-BBN = 9-Borabicyclo-[3.3.1]nonan, *cHex* = Cyclohexyl, *TIPS* = Triisopropylsilyl, *TBS* = *tert*-Butyldimethylsilyl, *TES* = Triethylsilyl, *TMS* = Trimethylsilyl, *Tr* = Trityl =

- Triphenylmethyl, Tf = Trifluormethylsulfonyl, Bn = Benzyl, LDBB = Di-*tert*-butylbiphenyllithium, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, MsCl = Methylsulfonylchlorid, LiHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid.
- [5] D. A. Evans, E. Vogel, J. V. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6120–6123.
 - [6] Die Umsetzung des (*E*)-Borenolats von **1** mit Isobutyraldehyd verlief mit geringerer Diastereoselektivität (2:1).
 - [7] Ein hohes Maß an 1,2-Diastereoselektion bei der Addition von Nucleophilen an α -Methyl- β -methylensubstrate wurde festgestellt: a) F. Sato, Y. Takeda, H. Uchiyama, Y. Kobayashi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1132–1134; b) F. Sato, M. Kusakabe, Y. Kobayashi, *ibid.* **1984**, 1130–1131; c) F. Sato, M. Kusakabe, T. Kato, Y. Kobayashi, *ibid.* **1984**, 1331–1332.
 - [8] a) D. A. Evans, J. L. Duffy, M. J. Dart, unveröffentlichte Ergebnisse; b) D. A. Evans, J. V. Nelson, t. Taber, *Top. Stereochem.* **1982**, *13*, 1–115; c) W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4151–4157.
 - [9] K. Ganesan, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7162–7169.
 - [10] Der Aldehyd **2** wurde ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt. Chromatographie von **2** an Kieselgel führte zur Isomerisierung zum α,β -ungesättigten Aldehyd.
 - [11] Die Desilylierung wurde vorzeitig abgebrochen; ein geringer Anteil (15 %) der monosilylierten Verbindung (Hydroxygruppe an C₅) wurde zurückgewonnen.
 - [12] Zur Entfernung einer Tritylschutzgruppe mit Et₃AlCl siehe: H. Köster, N. D. Sinha, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2641–2644.
 - [13] Die Verwendung von wäßrigem Rochelle-Salz war während der Isolierung notwendig, um die Organoaluminiumsalze vor dem Einengen zu entfernen, denn sonst isomerisierte das Spiroketal Aluminium-vermittelt zum unerwünschten diaxialen Anomer.
 - [14] Nicht umgesetzter Aldehyd **5** (11 %) wurde ebenfalls diastereomerenrein zurückgewonnen.
 - [15] Die mäßige Ausbeute dieser Reaktion kann teilweise auf Schwierigkeiten bei der Isolierung der polaren Trihydroxycarbonsäure beim Arbeiten in kleinem Maßstab zurückgeführt werden. Die DC-Kontrolle der Reaktion deutet auf eine saubere und einheitliche Umsetzung hin.
 - [16] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989–1993.
 - [17] Das erste Produkt der Reaktion ist der entsprechende C₁-TES-Ester, der während der Reinigung an Kieselgel gespalten wird.
 - [18] Wir danken Professor G. R. Pettit für eine Probe von natürlichem Spongistatin **2**.
 - [19] Wir danken Professor M. Kobayashi für Kopien der Spektren von natürlichem Althohyrtin **C**.
 - [20] Eine noch spätere Einführung der Seitenketten nach der Lactonisierung der Seco-Carbonsäure erscheint zwar zunächst möglich, doch haben erste Untersuchungen dieser alternativen Route ergeben, daß die Epoxidierungs/Allylstannan-Additionssequenz am Makrocyclus schwieriger ist.

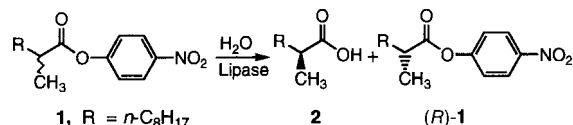
Erzeugung enantioselektiver Biokatalysatoren für die Organische Chemie durch In-vitro-Evolution

Manfred T. Reetz,* Albin Zonta, Klaus Schimossek, Klaus Liebeton und Karl-Erich Jaeger*

Die Entwicklung chiraler Katalysatoren für die enantioselektive Synthese optisch aktiver Verbindungen ist von großem akademischen^[1] und industriellen^[2] Interesse. Trotz weltweit intensiver Forschung auf dem Gebiet der homogenen Übergangsmetallkatalyse ist die Zahl der wirklich effizienten enantioselektiven Katalysatoren begrenzt. Aufgrund fehlender allgemeiner Prinzipien ist bei der Entwicklung eines einzigen hochwirksamen chiralen Katalysators die arbeits-

aufwendige Herstellung und Erprobung von sehr vielen Liganden erforderlich. Als Alternative bieten sich Biokatalysatoren an, die jedoch naturgemäß eine begrenzte Substratspezifität aufweisen.^[3] Durch ortsspezifische Mutagenese können in Einzelfällen Verbesserungen hinsichtlich Enzymaktivität und Selektivität herbeigeführt werden, nicht jedoch eine allgemeine Lösung des Problems, denn das Verfahren erfordert detaillierte Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Enzyms und dessen Wirkmechanismus sowie ein gewisses Maß an Intuition bei der Wahl der auszutauschenden Aminosäure.^[4] Wir beschreiben hier einen neuen Ansatz zur Entwicklung enantioselektiver Katalysatoren: die In-vitro-Evolution als Methode zur schrittweisen Erhöhung der Enantioselektivität eines gegebenen unselektiven Biokatalysators.^[5] Das dabei zugrunde liegende Prinzip – „Evolution im Reagensglas“ – erfordert keine Kenntnisse der Enzymstruktur oder des Katalysarmechanismus. Das Verfahren der In-vitro-Evolution^[6] wurde schon zur Steigerung der thermischen Stabilität und Aktivität von Enzymen erfolgreich angewendet.^[7,8] Die Kombination geeigneter molekularbiologischer Methoden zur Zufallsmutagenese und Gen-Expression mit einem effizienten Screening-System zur raschen Identifizierung von enantioselektiven Mutanten bildet die Basis unserer Strategie.^[5]

Als Testreaktion wählten wir die enantioselektive Hydrolyse von racemischem 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester **1**. Die freie (*S*)-konfigurierte Säure gehört zu einer Klasse von chiralen Verbindungen, die bei der Herstellung von bestimmten Pharmazeutika, Pflanzenschutzmitteln und chiralen Bausteinen in der organischen Synthese Anwendung finden.^[2] Als Biokatalysator wurde eine Lipase aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 verwendet, die im prozessierten Zustand aus 285 Aminosäuren besteht.^[9] Das Wildtyp-Enzym weist eine Enantioselektivität (*ee*) von nur 2 % zugunsten der (*S*)-konfigurierten Säure **2** auf.



Die Zahl von Mutanten eines gegebenen Enzyms, bei dem in jedem Enzymmolekül eine Aminosäure gegen eine der 19 verbliebenen ausgetauscht wurde, ergibt sich nach Gleichung (a), mit *N* = Zahl der Mutanten, *M* = Zahl der ausge-

$$N = 19^M X! / [(X - M)! M!] \quad (a)$$

tauschten Aminosäuren pro Enzymmolekül (in diesem Fall 1) und *X* = Zahl der Aminosäuren im Enzym. Demnach enthält eine entsprechende Mutantenbibliothek der *P. aeruginosa*-Lipase 5415 Mutanten. Obwohl eine solche Bibliothek an sich schon relativ klein ist, ergeben unsere Untersuchungen, daß bereits beim Screening einer noch geringeren Zahl von Mutanten Katalysatoren mit deutlich verbesserter Enantioselektivität erhalten werden können.

Unter Anwendung der sogenannten fehlerhaften Polymerase-Kettenreaktion (fPCR)^[10] wurde das aus 933 Basenpaaren bestehende Lipase-Gen einer Zufallsmutagenese unterworfen.^[11a] Dazu wurde die Mutationsfrequenz durch Veränderung der PCR-Reaktionskomponenten sowie -bedingungen, z. B. durch Variation der Mg²⁺-Konzentration, empirisch so eingestellt, daß statistisch ein bis zwei Basenaustau-

* Prof. M. T. Reetz, Dr. A. Zonta, Dipl.-Chem. K. Schimossek
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr
Telefax: Int. + 208/306-2985
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

* Priv.-Doz. Dr. K.-E. Jaeger, Dipl.-Biol. K. Liebeton
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität
D-44780 Bochum
Telefax: Int. + 234/7094-425
E-mail: karl-erich.jaeger@ruhr-uni-bochum.de