

**12:** Eine Mischung von 50 mg ( $5.1 \times 10^{-2}$  mmol) **10** und 70 mL 10proz. KOH (in Ethanol/Wasser, 1/1) wurde 4 h unter Rückfluß erhitzt. Zur abgekühlten Reaktionsmischung wurden 70 mL Wasser und anschließend 140 mL 3N HCl gegeben. Nach 12 h bei  $4^\circ\text{C}$  wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und sorgfältig mit Wasser gewaschen. Man erhielt 40 mg (88%) der Hexacarbonäureform von **10** ( $\text{R} = \text{COOH}$ ). Durch Erhitzen der Säure in einer Pyrex-Ampulle bei  $320^\circ\text{C}$  entstand **12** (15 mg, 56%) in Form farbloser Kristalle. Schmp.  $198\text{--}223^\circ\text{C}$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 1700\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ );  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.60\text{--}2.95$  (br., 24H,  $\text{CH}_2$ ), 2.95–3.16 (br., 6H,  $\text{CH}$ ), 6.95–7.15 (br., 12H, Aryl-H); EI-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 630 (100) [ $M^+$ ]; C,H-Analyse von  $\text{C}_{45}\text{H}_{42}\text{O}_3$  (630.82): gef. (ber.): C 85.40 (85.72), H 6.70% (6.66); Röntgenstrukturanalyse siehe Lit. [13].

**13:** 50 mg ( $5.1 \times 10^{-2}$  mmol) **11** wurden so wie **10** bei der Herstellung von **12** umgesetzt und ergaben in 64% Gesamtausbeute 21 mg **13**. Schmp.  $214\text{--}216^\circ\text{C}$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 1700$  ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1490, 1444  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.60\text{--}3.11$  (br., 30H), 7.00 (br.s, 4H, Aryl-H), 7.17 (br.s, 8H, Aryl-H); EI-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 630 (100) [ $M^+$ ]; C,H-Analyse von  $\text{C}_{45}\text{H}_{42}\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  (639.83): gef. (ber.): C 84.68 (84.52); H 6.66% (6.57).

**1:** 50 mg ( $8.0 \times 10^{-2}$  mmol) **13**, 5 mg *p*-Toluolsulfonsäure und 31 mg (0.5 mmol) Ethylenglycol wurden in einer Mischung aus 3 mL Benzol und 3 mL Nitrobenzol 48 h lang unter Rückfluß erhitzt. Man ließ die Reaktionsmischung abkühlen, isolierte den entstandenen Niederschlag und wusch ihn sorgfältig mit Hexan. Man erhielt 42 mg **1** (68%). Schmp.  $345\text{--}347^\circ\text{C}$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 1103\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ );  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.91\text{--}2.56$  (m, 18H), 2.83–3.31 (m, 8H), 3.93–4.09 (m, 12H,  $\text{OCH}_2$ ), 5.77 (s, 4H, Aryl-H), 6.40–6.62 (m, 8H, Aryl-H); EI-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 762 (17) [ $M^+$ ]; C,H-Analyse von  $\text{C}_{51}\text{H}_{54}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (781.00): gef. (ber.): C 78.46 (78.48); H 7.02% (6.92).

Eingegangen am 24. Februar 1998 [Z11512]

**Stichwörter:** Cyclovoltammetrie • Cyclophane • Kationen • Stapelwechselwirkungen

- [1] T. Benzing, T. Tjivikua, J. Wolfe, J. Rebek, *Science* **1988**, 242, 266; S. K. Burley, G. A. Petsko, *ibid.* **1985**, 229, 23; S. Mataka, J. Ma, T. Thiemann, J. M. Rudziński, H. Tsuzuki, T. Sawada, M. Tashiro, *Tetrahedron* **1997**, 53, 885–902; D. A. Evans, K. T. Chapman, D. Tan Hung, A. T. Kawaguchi, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 1197–1199; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 1184–1186, zit. Lit.
- [2] A. V. Muehldorf, D. van Engen, J. C. Warner, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6561–6562; T. Ishi-i, T. Sawada, S. Mataka, M. Tashiro, T. Thiemann, *Chem. Ber.* **1996**, 129, 289–296.
- [3] W. L. Jorgensen, D. L. Severance, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4768–4774, zit. Lit.
- [4] Siehe: D. J. Cram, R. H. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 5971–5977; L. A. Singer, D. J. Cram, *ibid.* **1963**, 85, 1080–1084.
- [5] Übersicht: S. M. Rosenfeld, K. A. Choe in *Cyclophanes* (Hrsg.: P. M. Keehn, S. M. Rosenfeld), Academic Press, New York, **1983**.
- [6] Paracyclophane weisen im Vergleich zu gleichartig substituierten Verbindungen mit offenen Arenketten eine bathochrome Verschiebung in ihren UV-Vis-Spektren auf. Verursacht wird dieser Effekt durch die Deformation des aromatischen Systems. Cram hat durch Verkürzung der Ansa-Kette an  $[n]$ Paracyclophanen gezeigt, daß die Deformation des aromatischen Ringes für die bathochrome Verschiebung verantwortlich ist: D. J. Cram, C. S. Montgomery, G. R. Knox, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 515–525.
- [7] Die Absorptionsspektren von mehrfach gestapelten [2.2]Paracyclophanen weisen mit zunehmender Anzahl von Lagen sowohl eine bathochrome als auch eine hyperchrome Verschiebung auf. Verglichen mit Spektren von einfachen Doppeldecker-[2.2]Paracyclophanen kann dieser Effekt ausgeprägt sein und nur durch transanulare  $\pi\text{-}\pi$ -Wechselwirkung erklärt werden: T. Otsubo, S. Mizogami, J. Otsubo, Z. Tozuka, A. Sakagami, Y. Sakata, S. Misumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, 46, 3519–3530; S. Misumi, *Multilayered Cyclophanes*, in Lit. [5].
- [8] Siehe auch: F. Vögtle, *Cyclophane Chemistry – Synthesis, Structures and Reactions*, Wiley, Chichester, **1993**, S. 57–58.

[9] a) S. J. Cristol, D. C. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 1467–1487; b) H. Prinzbach, G. Sedelmeier, C. Krüger, R. Goddard, H.-D. Martin, R. Gleiter, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 297–305; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17, 271; c) W. Grimme, H. T. Kämmerling, J. Lex, R. Gleiter, J. Heinze, M. Dietrich, *Angew. Chem.* **1991**, 25, 215–217; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 205–207; d) S. Mataka, K. Takahashi, T. Hirota, K. Takuma, H. Kobayashi, M. Tashiro, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 973–973.

[10] a) S. Mataka, K. Takahashi, T. Mimura, T. Hirota, K. Takuma, H. Kobayashi, M. Yashiro, K. Imada, M. Kuniyoshi, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2653–2656; b) S. Mataka, Y. Mitoma, T. Sawada, M. Tashiro, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 65–68; c) S. Mataka, Y. Mitoma, T. Thiemann, T. Sawada, M. Taniguchi, M. Kobuchi, M. Tashiro, *Tetrahedron* **1997**, 53, 3015–3026.

[11] Starre [3.3]Orthocyclophane erhält man außer über die Acetalisierung der Ketogruppe auch durch 1,2-Addition eines Grignard-Reagens an die Ketogruppe (**14**,  $\text{X} = \text{OH}$ ,  $\text{Y} = \text{CH}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ )<sup>[10a]</sup> und durch Reduktion einer Spirocyclopropan-substituierten Verbindung<sup>[12]</sup> zu einer mit geminal dimethylsubstituierter Brücke (**14**,  $\text{X} = \text{Y} = \text{CH}_3$ ).



14

[12] S. Mataka, M. Taniguchi, Y. Mitoma, T. Sawada, M. Tashiro, *J. Chem. Res. Synop.* **1997**, 48–49; *J. Chem. Res. Miniprint* **1997**, 437–452.

[13] Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-101215“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

[14]  $E^0[\text{Ag}|\text{AgNO}_3, (10^{-2}\text{ M in CH}_3\text{CN})] = +0.53\text{ V}$  gegen Normalwasserstoffelektrode (NHE); siehe auch: C. K. Mann in *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 3 (Hrsg.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1969**, S. 64.

[15] M. Dietrich, J. Mortensen, J. Heinze, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1131–1132, zit. Lit.

## Neuartige Biokatalysatoren durch chemische Modifikation bekannter Enzyme: quer-vernetzte Mikrokristalle der semisynthetischen Peroxidase Seleno-Subtilisin\*\*

Dietmar Häring und Peter Schreier\*

Professor Helmut Werner zum 65. Geburtstag gewidmet

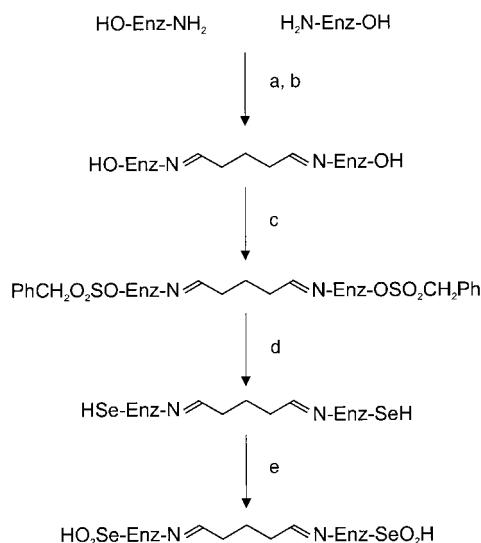
Obwohl Enzyme als wertvolle Katalysatoren in der chemischen Synthese breite Akzeptanz finden, sind ihre „natürlichen“ Eigenschaften wie Aktivität, Selektivität oder Stabilität oft unzureichend. Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um diese Probleme zu überwinden. Durch gentechnische Verfahren kann die Gesamtstabilität verbessert werden,<sup>[1]</sup> aber neue katalytische Zentren sind damit schwer zu erreichen. Monoklonale katalytische Antikörper eröffneten viele Möglichkeiten in diesem Bereich, doch ist es bisher

[\*] Prof. Dr. P. Schreier, Dipl.-Chem. D. Häring  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität  
Am Hubland, D-97074 Würzburg  
Fax: (+49) 931-888-5484  
E-mail: schreier@pzlc.uni-wuerzburg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 347 „Selektive Reaktionen Metall-aktivierter Moleküle“) unterstützt.

schwierig, brauchbare Katalysatoren für die asymmetrische Synthese zu erhalten.<sup>[2]</sup> Außerdem wurden Anstrengungen unternommen, synthetische Enzymmimetica zu entwickeln. Der Durchbruch bezüglich katalytischer Effizienz und Enantioselektivität steht aber noch aus.<sup>[2]</sup> Die ältesten Techniken, um maßgeschneiderte Enzyme herzustellen, sind „chemische“ Methoden. Durch gezielte chemische Modifizierung des katalytisch aktiven Zentrums erhält man semisynthetische Enzyme mit völlig veränderten katalytischen Eigenschaften.<sup>[3]</sup> Wir berichten hier von einem neuen Typ chemisch veränderter semisynthetischer Enzyme für die organische Synthese, wobei modifizierte katalytische Aktivität, nachvollziehbare Substratselektivität und außergewöhnliche Stabilität in einem Biokatalysator kombiniert werden.

Die Serin-Protease Subtilisin [3.4.21.62] ist ein gut untersuchtes Enzym, von dem mehrere Tonnen pro Jahr für industrielle Anwendungen produziert werden. Umfassende Substratuntersuchungen, verschiedenste gentechnisch veränderte Mutanten und mehrere Kristallstrukturanalysen wurden beschrieben.<sup>[4]</sup> Diese detaillierten Einblicke in die Eigenschaften von Subtilisin bieten eine solide Basis für die rationale Vorgehensweise bei chemischen Modifikationen des Enzyms. Um das Potential dieser Methode zu veranschaulichen, wurden sowohl das aktive Zentrum von Subtilisin als auch dessen Peptidgerüst durch einfache chemische Reaktionen modifiziert. Wir synthetisierten quervernetzte Kristalle der semisynthetischen Peroxidase Seleno-Subtilisin entsprechend Schema 1. Die „Batch“-Kristallisation von



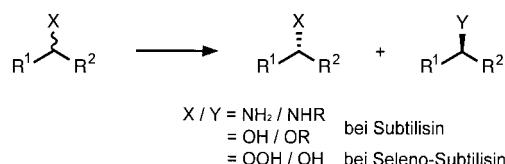
Schema 1. Umwandlung von Subtilisin in quervernetzte Mikrokristalle von Seleno-Subtilisin (siehe *Experimentelles*). a) Kristallisation; b) Glutardialdehyd; c) PMSF; d) NaHSe; e)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . PMSF = Phenylmethansulfonylfluorid.

Subtilisin wurde durch langsame Zugabe einer gesättigten Natriumsulfat-Lösung zum frisch gefällten Aceton-Niederschlag erreicht und ergab mikrokristalline Nadeln (typischerweise  $100 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$ ). Die Quervernetzung der Kristalle mit Glutardialdehyd bewirkte, daß das Material sich weder in Wasser noch in organischen Lösungsmitteln löste. Tüchsen und

Ottesen<sup>[5]</sup> haben nachgewiesen, daß während einer Reaktionszeit von 45 min drei Lysinreste auf der Oberfläche von Subtilisin mit den Nachbarmolekülen im Kristall reagiert hatten. Kristallstrukturanalysen ergaben dieselbe Tertiärstruktur für quervernetztes Subtilisin und Subtilisin in unbeschädigten Kristallen.<sup>[6]</sup>

Der Serinrest 221 im aktiven Zentrum mußte vor dem Seleneinbau mit PMSF aktiviert werden, einem typischen Inhibitor von Serin-Proteasen. Die nucleophile Substitution des PMSF-substituierten Serins durch Natriumhydrogensele-nid erforderte zweitägiges Erwärmen auf 45 °C. Während der Synthese konnten wegen der Unlöslichkeit des Enzympräparats keine chromatographischen Reinigungsschritte durchgeführt werden. Daher mußten die Enzymkristalle mit wässriger Natriumborhydrid-Lösung gewaschen werden, um den Überschuß an niedergeschlagenem Selen in Lösung zu bringen und zu entfernen. Die Selenolgruppe an Position 221 wurde anschließend mit Wasserstoffperoxid zur Seleninsäuregruppe oxidiert und lieferte damit die stabile Form der quervernetzten Kristalle (CLC, „cross-linked crystals“) von Seleno-Subtilisin.

Als Folge des Seleneinbaus in die Protease Subtilisin entstand das semisynthetische Seleno-Subtilisin mit Glutathionperoxidaseaktivität,<sup>[7]</sup> das die kinetische Racematspaltung verschiedener Hydroperoxide katalysiert (Schema 2).<sup>[8, 9]</sup> Bisher war die präparative Anwendung von semisynthetischen Enzymen auf den Bereich von 10 µmol beschränkt, und



Schema 2. Vergleich der katalytischen Aktivität der Protease Subtilisin und der semisynthetischen Peroxidase Seleno-Subtilisin. Substrat- und Stereoselektivität sind aufgrund identischer Bindungstaschen ähnlich.<sup>[9, 14]</sup>

die chemisch modifizierten Enzyme waren nicht wiederverwendbar. Im Unterschied dazu ist CLC-Seleno-Subtilisin unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln und wird nach der Synthese einfach durch Zentrifugieren oder Filtrieren zurückerhalten. In Abbildung 1 sind der hohe

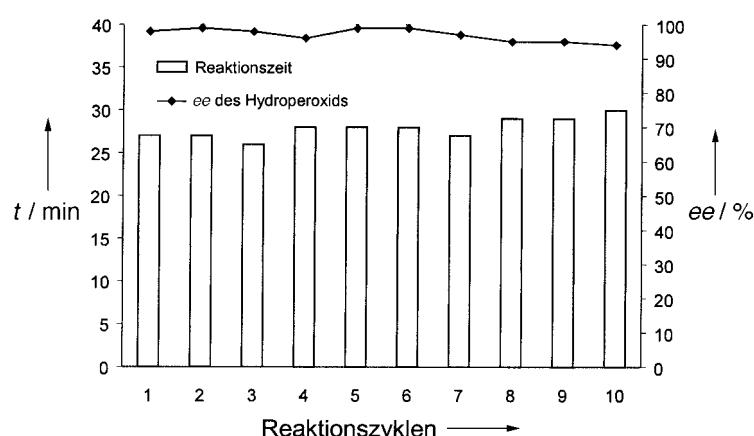


Abb. 1. Enantioselektive Katalyse und Wiederverwendung von CLC-Seleno-Subtilisin (siehe *Experimentelles*).

Aktivitätsgrad und die Selektivität während zehn Reaktionszyklen zusammengefaßt. Die kinetische Racematspaltung von 2-Hydroxy-1-phenylethylhydroperoxid **1** wurde nach 25–30 min mit durchschnittlich 97% *ee* erreicht. Die Reaktionen von **1** und 1-Phenylethylhydroperoxid **2** ließen sich in den 1-mmol-Maßstab übertragen, ohne daß ein Verlust an Aktivität oder Selektivität gemessen wurde.

Die außergewöhnlichen Eigenschaften von quervernetzten Enzymkristallen wurden 1964 von Quiocho und Richards<sup>[10a]</sup> entdeckt. Sie sind stabil bei unterschiedlichen pH-Werten, hohen Temperaturen, gegenüber proteolytischem Abbau oder in organischen Lösungsmitteln, und die Reaktionskinetiken sind mit denen amorpher Enzyme vergleichbar.<sup>[10]</sup> Dementsprechend hatte das CLC-Seleno-Subtilisin kinetische Parameter ( $k_{\text{cat}} = 458 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m = 17.9 \text{ mM}$  für **2**; Assay siehe<sup>[8]</sup>) ähnlich denen der amorphen Peroxidase und eine sehr hohe Stabilität unter denaturierenden Bedingungen. In Abbildung 2 werden die Aktivitäten von amorphem und CLC-Seleno-Subtilisin in verschiedenen Reaktionsmedien verglichen. In allen Versuchen verhinderte die quervernetzte Kristallstruktur eine schnelle Denaturierung über Entfaltungsmechanismen.

entsteht. Durch die Verwendung gut untersuchter Enzymgerüste können Detailkenntnisse der Selektivität oder der Affinität der Substrate ausgehend vom Templat auf das semisynthetische Enzym übertragen und vorhergesagt werden.<sup>[9]</sup>

### Experimentelles

Subtilisin Carlsberg (Novo Nordisk, 54% (w/w) aktives Protein) wurde durch fraktionierende Acetonfällung vorgereinigt und in 30 mM Acetat/NaOH-Puffer (12%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 5.5, 16 °C) kristallisiert.<sup>[11]</sup> Die Behandlung der Subtilinkristalle mit 1.5% Glutardialdehyd (45 min) in 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  (13%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 7.5) lieferte quervernetzte Kristalle von Subtilisin (25% Gesamtausbeute im Gramm-Maßstab).<sup>[12]</sup>

Vor dem Einbau von Selen wurde CLC-Subtilisin mit 5 mM PMSF 1 h in 50 mM PIPES-Puffer (pH 7.0) und 20 mM  $\text{CaCl}_2$  inkubiert. Frisch hergestelltes Natriumhydrogenselenid<sup>[13]</sup> wurde unter Argon zugegeben und die Reaktionsmischung 45 h bei 45 °C gehalten. Der rote Seleniederschlag wurde durch dreimaliges Waschen mit wäfigriger 25 mM  $\text{NaBH}_4$ -Lösung entfernt. Die Selenolfunktionen von CLC-Seleno-Subtilisin wurden durch 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min bei 20 °C) zur Seleninsäurefunktion oxidiert. Nach wiederholtem Waschen mit 50 mM Citrat/NaOH-Puffer (pH 5.5), der 20 mM  $\text{CaCl}_2$  enthielt, wurden die Enzymkristalle im selben Puffer gelagert und für weitere Experimente durch Zentrifugieren bei 1000 g isoliert. 1.0 g CLC-Subtilisin ergaben typischerweise 0.96 g CLC-Seleno-Subtilisin mit 11–15 nmol aktivem Enzym pro Milligramm Kristalle (Messung durch Titration des aktiven Zentrums mit 2-Nitro-5-sulfanylbenzoësäure (TNB)<sup>[7]</sup>).

Enantioselektive Katalyse und Wiederverwendung von CLC-Seleno-Subtilisin (siehe Abb. 1). In 325 mL 30 mM Citrat/NaOH-Puffer (pH 5.5) und 2 mM EDTA wurden 3.8  $\mu\text{mol}$  CLC-Seleno-Subtilisin mit 0.06 mmol TNB 15 min vorinkubiert. 0.33 mmol **1** wurden zugegeben und die Reaktion durch langsame Zugabe von 0.33 mmol TNB gestartet. CLC-Seleno-Subtilisin wurde durch Zentrifugieren (1500 g) zurückgehalten. Das Hydroperoxid wurde mit Diethylether extrahiert und auf einer Kieselgelsäule gereinigt. Der *ee*-Wert von **1** wurde durch HPLC (Daicel-Chiralcel-OB-H-Säule) bestimmt. Anders als bei früheren Studien<sup>[8, 9]</sup> war bei Verwendung von CLC-Seleno-Subtilisin die Blindreaktion vernachlässigbar. Die kinetische Racematspaltung von **1** oder **2** wurde entsprechend im präparativen 1-mmol-Maßstab durchgeführt und lieferte typischerweise 42% der enantiomerenangereicherten Hydroperoxide (zur Stereoanalytik und Enantioselektivität siehe Lit. [8, 9]).

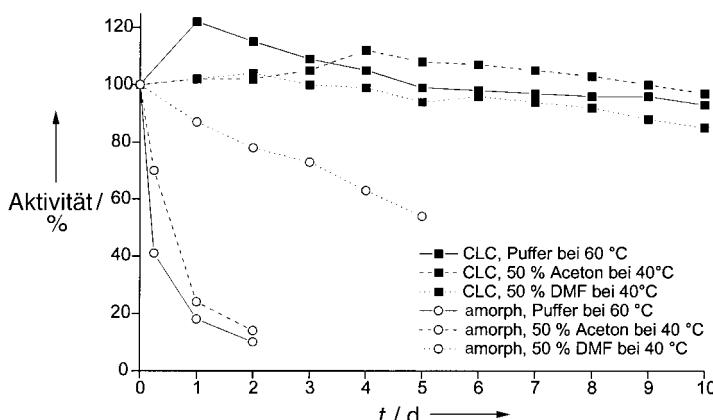


Abb. 2. Stabilität von amorphem und quervernetztem kristallinem Seleno-Subtilisin in organischen Lösungsmitteln oder bei erhöhter Temperatur. Die Peroxidaseaktivität wurde photometrisch bei 410 nm gemessen mit 0.2 mM Cumolhydroperoxid und 0.2 mM TNB in 50 mM Citrat/NaOH-Puffer (pH 5.5) und 2 mM EDTA. Die Werte für die spezifische Aktivität von kristallinem ( $33 \text{ mU mg}^{-1}$ ) und amorphem ( $12 \text{ mU mg}^{-1}$ ) Seleno-Subtilisin wurden jeweils auf 100% umgerechnet.

Wir fassen zusammen: Die quervernetzten Mikrokristalle von Seleno-Subtilisin sind ein neuer Typ chemisch veränderter Enzyme. Wir modifizierten zum ersten Mal sowohl das enzymatische Gerüst als auch das aktive Zentrum eines Enzyms durch chemische Reaktionen. Anders als bei anderen Methoden der Weiterentwicklung von Enzymen (z. B. Gentechnologie oder katalytische Antikörper) ist hier nur eine einfache Ausrüstung für chemische Synthesen im Gramm-Maßstab notwendig. Die Quervernetzung von Enzymkristallen liefert einen immobilisierten Biokatalysator mit außergewöhnlicher Stabilität. Die hohe Reinheit (kristallines Enzym!) zusammen mit der Stabilität bieten ideale Voraussetzungen für die weitere chemische Modifizierung des aktiven Zentrums, wodurch eine neue Katalyseaktivität

Eingegangen am 4. Mai 1998 [Z 11810]

**Stichwörter:** Asymmetrische Synthesen · Enzymkatalyse · Immobilisierung · Selen

- [1] a) D. L. Oxender, C. F. Fox, *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York, 1987; b) J. Damorsky, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 21–30.
- [2] a) P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 327–336; b) A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 705–724.
- [3] a) E. T. Kaiser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 945–955; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 913–922; b) E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505–511.
- [4] a) H. Takagi, *Int. J. Biochem.* **1993**, *25*, 307–312; b) J. A. Wells, D. A. Estell, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 291–297.
- [5] E. Tüchsen, M. Ottesen, *Carlsberg Res. Commun.* **1977**, *42*, 407–420.
- [6] P. A. Fitzpatrick, D. Ringe, A. M. Klibanov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *198*, 675–681.
- [7] Z.-P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5647–5648.
- [8] D. Häring, M. Herderich, E. Schüler, B. Withopf, P. Schreier, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 853–856.
- [9] D. Häring, B. Hubert, E. Schüler, P. Schreier, *Arch. Biochim. Biophys.* **1998**, *354*, 263–269.

- [10] a) F. A. Quiocho, F. M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *52*, 833–839; b) T. Zelinski, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 746–748; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 722–724; c) N. L. St. Clair, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314–7316.
- [11] M. Ottesen, I. Svendsen, *Methods Enzymol.* **1970**, *19*, 199–215.
- [12] Das Enzym wird unter dem Namen PeptiCLEC-BL (Altus Inc., USA) verkauft und verhält sich identisch.
- [13] D. L. Klayman, T. S. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 197–199.
- [14] K. L. House, R. B. Dunlap, J. D. Odom, Z.-P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8573–8579.

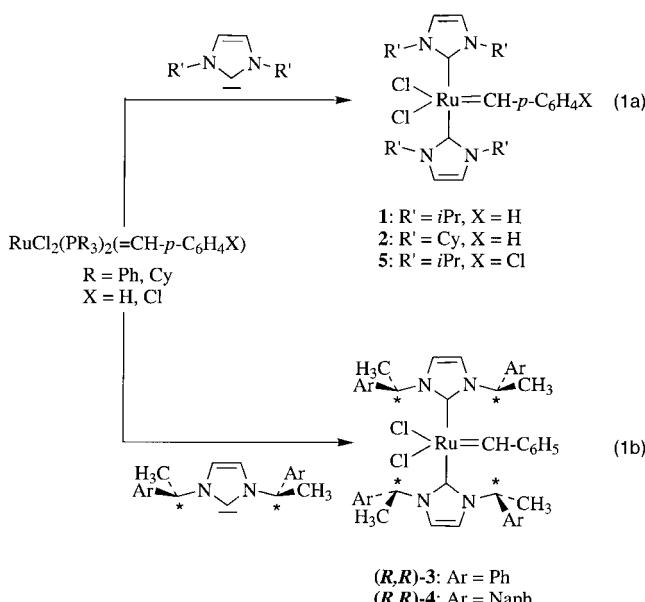
## Eine neue Generation von Rutheniumkatalysatoren für die Olefinmetathese\*\*

Thomas Weskamp, Wolfgang C. Schattenmann,  
Michael Spiegler und Wolfgang A. Herrmann\*

Professor Heinrich Nöth zum 70. Geburtstag gewidmet

Übergangsmetallkatalysierte C-C-Kupplungen stehen sowohl in der organischen Synthesekemie als auch in der Polymerchemie im Brennpunkt des Interesses.<sup>[1]</sup> Zu diesen C-C-Verknüpfungen gehört die Olefinmetathese, die Reaktionen wie die ringöffnende Metathesepolymerisation (ROMP), die acyclische Dienmetathese (ADMET), die Ringschlußmetathese (RCM) und die Metathese acyclischer Olefine umfaßt.<sup>[2]</sup> Phosphankomplexe des Rutheniums haben diesem Gebiet aufgrund ihrer Toleranz gegenüber einer Vielzahl funktioneller Gruppen erneut Aufschwung verliehen.<sup>[3]</sup> Wir stellen die ersten auf Ruthenium basierenden Beispiele einer neuartigen Verbindungsklasse vor, die sowohl Alkylidengruppen als auch N-Heterocyclencarbene<sup>[4–6]</sup> als Liganden enthalten, und berichten über deren Anwendung als Katalysatoren in der Olefinmetathese.

Der von Grubbs et al. entwickelte Phosphankomplex  $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(=\text{CHPh})]$ <sup>[3d]</sup> reagiert mit 2,2 Äquivalenten des entsprechenden Imidazolin-2-ylidens zu den Verbindungen **1–4** (Cy = Cyclohexyl, Naph = 1-Naphthyl), die als luftstabile Feststoffe in 80–90 % Ausbeute isoliert werden können [Gl. (1a,b)].<sup>[7]</sup> Die angegebenen Komplexe können in ebensolchen Ausbeuten ausgehend von  $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)_2(=\text{CHPh})]$  hergestellt werden, was die höhere Lewis-Basizität der N-heterocyclischen Carbene gegenüber der von Trialkylphosphanen verdeutlicht. *(R,R)-3* und *(R,R)-4* erweisen sich wegen ihrer *chiralen* Imidazolin-2-ylidene als vielverspre-



chende Erweiterungen der bekannten Rutheniumkatalysatoren, die in der Olefinmetathese verwendet werden. Die Einkristallstrukturanalyse von **5** (Abb. 1)<sup>[8]</sup> ergibt, daß die

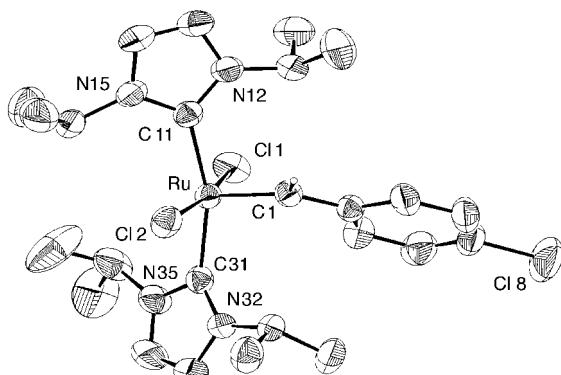


Abb. 1. Platon<sup>[9]</sup>-Darstellung von **5**. Die thermischen Schwingungsellipsoide entsprechen 50 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Wasserstoffatome sind außer an C1 der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeichnet. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und -winkel [°]: Ru-Cl1 2.3995(9), Ru-Cl2 2.3921(8), Ru-C1 1.821(3), Ru-C11 2.107(3), Ru-C31 2.115(3), Cl1-Ru-Cl2 170.32(3), Cl1-Ru-C1 98.37(10), Cl1-Ru-C11 88.26(8), Cl1-Ru-C31 94.76(8), Cl2-Ru-C1 91.14(10), Cl2-Ru-C11 89.21(8), Cl2-Ru-C31 85.14(8), C1-Ru-C11 94.48(12), C1-Ru-C31 100.92(13), C11-Ru-C31 163.68(11).

Verzerrung der quadratisch-planaren Koordination geringer ist als die in dem analogen Phosphankomplex  $[\text{RuCl}_2(\text{PCy}_3)_2(=\text{CH-}p\text{-C}_6\text{H}_4\text{Cl})]$ .<sup>[3d, 10]</sup> Die Ru-C-Bindungslängen des Alkylidens (1.821(3) Å) und der N-heterocyclischen Carbene (2.107(3), 2.115(3) Å) spiegeln die unterschiedliche Natur von Metall-„Carben“-Bindungen wider ( $\Delta d \approx 0.3$  Å).

Unsere neuartigen Verbindungen weisen ein auf den ersten Blick unerwartetes Verhalten in Lösung auf, was anhand ihrer  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopischen Daten demonstriert wird (Tabelle 1). Die Alkylideneinheit – üblicherweise mit einer Doppelbindung formuliert ( $\sigma$ -Donor/ $\pi$ -Acceptor) – rotiert bei Raumtemperatur frei um die Ru-C-Bindung. Dagegen stellt man bei den N-heterocyclischen Carbene

[\*] Prof. Dr. W. A. Herrmann, Dipl.-Chem. T. Weskamp,  
Dr. W. C. Schattenmann, Dipl.-Chem. M. Spiegler  
Anorganisch-chemisches Institut  
der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching  
Fax: (+49) 89-289-13473  
E-mail: lit@arthur.anorg.chemie.tu-muenchen.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie (Doktorandenstipendium für T.W.), der Bayerischen Forschungsförderung (Bayerischer Forschungsverbund Katalyse, FORKAT), der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Degussa AG (RuCl<sub>3</sub>-Spender) gefördert.