

Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren

Manfred T. Reetz*

Professor K. Barry Sharpless zum 60. Geburtstag gewidmet

Kombinatorische Methoden in der Entwicklung enantioselektiver homogener Katalysatoren stellen einen neuen Zweig der Katalyseforschung dar. Ziel ist es, Bibliotheken möglicher asymmetrischer Katalysatoren herzustellen und nicht dem traditionellen Ansatz folgend einen Katalysator nach dem anderen zu untersuchen. Verschiedene konzeptionelle Fortschritte in der parallelen Herstellung chiraler Liganden sind beschrieben worden. Die derzeit bedeutsamsten Systeme bestehen aus modular aufgebauten Liganden auf festen Trägermaterialien. Sie bieten einen hohen Grad an struktureller Diversität und maximieren somit die Wahrscheinlichkeit, enantioselektive Katalysatoren oder sogar neue Ligandenklassen für die asymmetrische Katalyse zu finden. Suchstrategien wurden entwickelt, die unter anderem zu Katalysatoren führten, die mit traditionellen Methoden wahrscheinlich nicht gefunden worden wären. Die konsequente Anwendung solcher Strategien beinhaltet Tausende

von Katalysatoren und erfordert Hochdurchsatz-Screeningsysteme zum Bewerten der Enantioselektivität. So wurden die ersten Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsysteme für die Anwendung in der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme entwickelt; diese Screeningsysteme basieren auf einer „Evolution im Reagensglas“ und stellen eine Kombination der Methoden der Zufallsmutagenese, der Genexpression und des *ee*-Assays dar. Da wahrscheinlich kein Screeningsystem universell anwendbar ist, sind verschiedene Ansätze notwendig. Diese umfassen bis heute Assays, die auf UV/Vis, Fluoreszenz, Circular dichroismus, Massenspektrometrie und sogar entsprechend modifizierter Gaschromatographie sowie speziellen Formen der Kapillarelektrophorese aufbauen. Eines der leistungsfähigsten Systeme, mit dem ungefähr 1000 genaue *ee*-Bestimmungen pro Tag möglich sind, beruht auf der massenspektrometrischen Detektion deuteriummarkierter Pseudoenantiomere und pseudoprochiraler

Verbindungen. Allerdings ist der Assay auf kinetische Racematspaltungen und/oder Reaktionen prochiraler Verbindungen, die enantiotopische Gruppen tragen, beschränkt. Ein Super-Hochdurchsatz-Screening auf Enantioselektivität ist in vielen Fällen durch Anwendung chiraler modifizierter parallelisierter Kapillarelektrophorese möglich. Damit können 7000 bis 30000 *ee*-Bestimmungen pro Tag durchgeführt werden. Diese und andere analytischen Entwicklungen werden voraussichtlich weitere Forschungsarbeiten in der kombinatorischen Suche nach asymmetrischen homogenen Katalysatoren und in der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme für Anwendungen in der Organischen Chemie stimulieren.

Stichwörter: Analytische Methoden • Asymmetrische Katalyse • Enzymkatalyse • Hochdurchsatz-Screening • Gerichtete Evolution • Kombinatorische Chemie

1. Einleitung

Die Bedeutung enantiomerenreiner oder -angereicherter Verbindungen in der pharmazeutischen, der Agro-, der präparativen Organischen und der Naturstoffchemie wächst stetig.^[1] Dies spiegelt sich auch in dem so genannten „chiralen Markt“ für industrielle pharmazeutische Produkte wider, der sich 1999 auf über 200 Milliarden DM belief und voraus-

sichtlich weiter wachsen wird.^[1d,e] Obwohl viele dieser Produkte nicht durch Totalsynthesen hergestellt werden können, sind dennoch etliche chirale Zielverbindungen der organischen Synthese zugänglich. Die klassische Enantiomerentrennung gekoppelt mit der Racemisierung des unerwünschten Stereoisomers ist zwar immer noch der industriell bevorzugte Prozess,^[1d] in Zukunft wird jedoch die enantioselektive Katalyse als ökonomisch und ökologisch attraktivste Strategie an Bedeutung zunehmen. In der Tat war in den vergangenen drei Jahrzehnten ein Großteil der Grundlagenforschung in der Organischen Chemie der Methodenentwicklung auf dem Gebiet der asymmetrischen Synthese gewidmet,^[2] aber weitere Bemühungen sind notwendig. Die beiden Optionen sind

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-2985
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

einerseits künstliche Katalysatoren, wie Übergangsmetallkomplexe,^[3] und andererseits Biokatalysatoren.^[4] Im ersten Fall wird eine bekannte Übergangsmetall-katalysierte Reaktion chiral modifiziert, indem chirale Liganden eingeführt werden. Obwohl die Anwendung eines solchen Katalysators in einer gegebenen Reaktion notwendigerweise über diastereomorphe Übergangszustände zu den beiden möglichen enantiomeren Produkten führt, kann die zugehörige Energiedifferenz $|\Delta G_R^* - \Delta G_S^*|$ so klein sein, dass keine merkliche Enantioselektivität zustande kommt. So wurden z. B. mehr als 2000 chirale phosphorhaltige Liganden hergestellt, von denen sich nur eine Handvoll als wirklich enantioselektiv ($ee \geq 95\%$) erwies. Darüber hinaus ist die Anwendung dieser Katalysatoren in der Regel auf bestimmte Substratklassen oder sogar auf spezifische Substitutionsmuster beschränkt.^[3] Zur weiteren Ligandenoptimierung werden zweite und n -te Generationen von Katalysatoren in einem Prozess entwickelt, der nach wie vor Erfahrung, Intuition, Kenntnis des Reaktionsmechanismus, die Fähigkeit, Molecular Modeling und andere theoretische Techniken anzuwenden, sowie zu einem Großteil trial and error erfordert (Abbildung 1 a). In fast allen

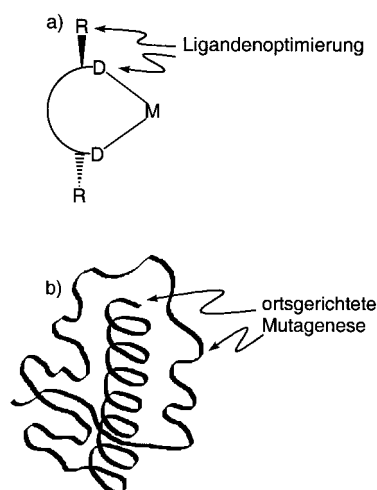


Abbildung 1. a) Schematische Darstellung der Ligandenoptimierung im Entwurf eines chiralen Übergangsmetall(M)-Katalysators (die C_2 -Symmetrie ist willkürlich dargestellt); die Pfeile symbolisieren Punkte möglicher Strukturveränderungen, und D steht für Donor-Atome. b) Schematische Darstellung des De-novo-Designs eines enantioselektiven Enzyms; die Pfeile symbolisieren den Austausch von Aminosäuren mittels ortsgerichteter Mutagenese.

Fällen müssen nicht nur sterische und elektronische Eigenschaften der chiralen Liganden berücksichtigt werden, sondern auch die Natur des Metalls, die Temperatur, das Lösungsmittel und chirale oder achirale Zusätze. Da jeder Katalysator Schritt für Schritt optimiert wird, ist dies mit einer enormen Menge an Arbeit und Kosten verbunden. Die Stereoselektivität wird routinemäßig ermittelt, indem der Enantiomerenüberschuss (ee) eines gegebenen Produkts durch konventionelle Verfahren wie Gaschromatographie (GC),^[5] Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)^[6] oder (weniger oft) Kapillarelektrophorese (CE)^[7] an chiralen stationären Phasen gemessen wird. Einige Dutzend Proben können so pro Tag analysiert werden, was sicherlich nicht den langsamsten Schritt im Gesamtprozess der Entwicklung eines enantioselektiven Katalysators ausmacht. Fällt die Wahl auf die Biokatalyse, werden so viele kommerziell erhältliche Enzyme wie möglich getestet, bis sich der Erfolg einstellt.^[4] Wenn die Enantioselektivität für eine gegebene Reaktion dennoch inakzeptabel bleibt, kann ein Prozess in Analogie zur Ligandenoptimierung in der Übergangsmetallkatalyse angewandt werden: der Austausch einer Aminosäure an einer bestimmten Position gegen eine der verbleibenden 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren mittels ortsgerichteter Mutagenese^[8] (Abbildung 1 b). Aufgrund der strukturellen Komplexität der Enzyme und des Fehlens zuverlässiger theoretischer Verfahren sind bis jetzt leider nur sehr wenige erfolgreiche Fälle beschrieben worden.

Außer der Enantioselektivität kennzeichnen auch solche Parameter wie Aktivität, Stabilität und Wiedergewinnbarkeit die Qualität eines Katalysators. Die Herausforderungen bei der Herstellung aktiver und enantioselektiver Übergangsmetallkatalysatoren oder bei der Optimierung von Enzymen für den Einsatz in asymmetrischen Umsetzungen erinnern daher an die Probleme (sind aber nicht identisch mit ihnen), denen Chemiker in der traditionellen Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe vor dem Aufkommen der kombinatorischen Chemie gegenüberstanden, d. h. als Substanzen sequentiell, eine nach der anderen, in einer arbeitsintensiven Art und Weise synthetisiert und getestet wurden. Kombinatorische Methoden stellen bei der Entdeckung von Wirkstoffen und anderen biologisch aktiven Verbindungen Werkzeuge bereit, mit denen große Bibliotheken von Verbindungen rasch synthetisiert und bewertet werden können.^[9] Zwei Strategien werden angewendet: die iterative Split-and-mix- (auch Split-



Manfred T. Reetz, geboren 1943 in Deutschland, erhielt 1965 seinen B.S. von der Washington University, St. Louis, und 1967 den M.S. in Chemie von der University of Michigan. 1969 erhielt er mit einer unter der Anleitung von U. Schöllkopf angefertigten Arbeit den Doktorgrad von der Universität Göttingen. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei R. W. Hoffmann an der Universität Marburg habilitierte er sich dort 1974 und verbrachte zwei Jahre als C3-Professor an der Universität Bonn, bevor er 1980 C4-Professor in Marburg wurde. 1991 wechselte er nach Mülheim an der Ruhr, und zwei Jahre später wurde er Direktor des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung. Seine derzeitigen Interessen umfassen metallorganische Reagentien und Katalysatoren in der organischen Synthese, nanostrukturierte Übergangsmetallcluster und die gerichtete Evolution als Methode zur Bildung enantioselektiver Biokatalysatoren.

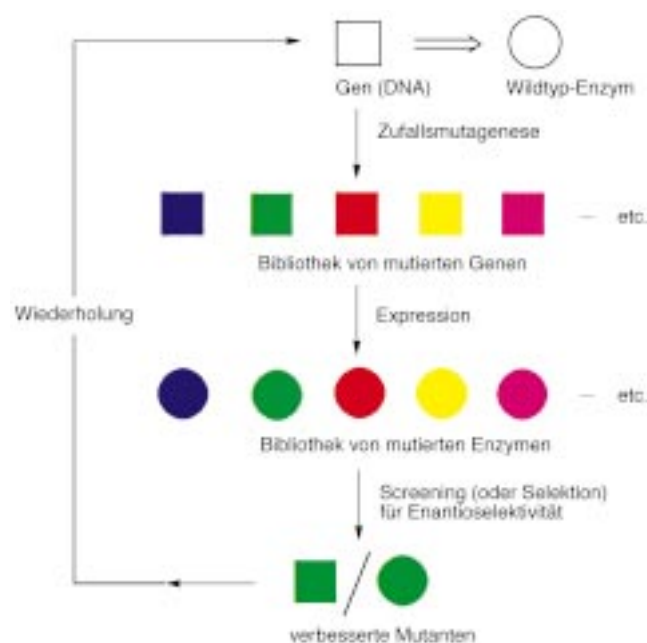
and-pool-) Methode und die Parallelsynthese. Der Vorteil der Split-and-mix-Synthese, die auf polymeren Trägerharzen durchgeführt wird, liegt in der enorm hohen Zahl an Verbindungen, die in kurzer Zeit aufgrund der Permutationsmöglichkeiten, die durch die Zahl der Synthesestufen und Reaktionspartner gegeben sind, theoretisch zugänglich sind. Die Identifizierung der Mitglieder einer solchen Bibliothek im Zuge der Dekonvolution oder Kodierung erfordert jedoch Zeit und Mühe.^[9] Bei der Parallelsynthese werden alle Reaktionen in gesonderten Gefäßen mit automatisierten Geräten durchgeführt, wobei die Produkte zwar in niedrigerer Zahl, dafür aber jedes in einem Gefäß mit definierter Position verfügbar ist. Solche räumlich adressierbaren Verbindungsbibliotheken sind direkt einem Hochdurchsatz-Screening auf biologische Eigenschaften zugänglich, wobei viele Methoden auf fluoreszenzaktiven oder radioaktiv markierten Rezeptoren beruhen. Obwohl ein Konsens bezüglich der Terminologie noch nicht erzielt ist,^[10] war streng gesehen der Begriff „kombinatorisch“ ursprünglich als Bezeichnung von Split-and-mix-Methoden reserviert.^[9] Parallelmethode in Lösung oder an einer Festphase sind tatsächlich nicht grundlegend neu, außer dass Automatisierung und Roboter unter Anwendung miniaturisierter Ausrüstung, wie Mikrotiterplatten, einen hohen Durchsatz in kleinem Maßstab ermöglichen. Vielleicht spiegelt die von Combs vorgeschlagene vereinfachte Definition der kombinatorischen Chemie die Meinung der Mehrheit der auf diesem Gebiet tätigen Forscher wider:^[11] „the applied use of technologies and automation for the rapid chemical syntheses of relative large numbers of compounds“. In der Wirkstoff-Forschung wird eine steigende Betonung der Parallelsynthese verzeichnet, allerdings sind zukünftige Trends schwierig vorherzusagen.^[9]

Die Erfolge der kombinatorischen Methoden zunächst in der pharmazeutischen^[9] und später auch in der materialwissenschaftlichen Forschung^[12] haben Chemiker dazu angeregt, diese Techniken in der Katalyse anzuwenden.^[12] Anstatt Katalysatoren individuell einen nach dem anderen in einem zeitraubenden Prozess zu synthetisieren und zu testen, wie bei der Entwicklung des Haber-Bosch-Verfahrens zur Herstellung von Ammoniak, in der Tausende von Katalysatoren und Katalysatorformulierungen präpariert und nacheinander getestet werden mussten, besteht hier die Idee darin, eine viele Katalysatoren auf einmal (oder nahezu gleichzeitig) herzustellen und zu prüfen.^[12, 13] Die Bemühungen bezüglich dieser faszinierenden Aussicht waren aus zwei Gründen gehemmt, einem realen – die entsprechenden Verfahren fehlten – und einem psychologischen: Kritiker behaupteten, dass jede Strategie ohne strukturelle und/oder mechanistische Aspekte nicht nur aus intellektuellen Gründen (fehlende Kreativität!) unpassend, sondern auch zum Scheitern verurteilt sei. Tatsächlich aber ergänzen sich kombinatorische und traditionelle Methoden in der Katalysatorforschung, weshalb die eine Methode niemals die andere ersetzen wird.

Die Forschung in der kombinatorischen Suche nach enantioselektiven Übergangsmetallkatalysatoren hat immer zwei Probleme zu bewältigen: 1) die Entwicklung von Strategien und Methoden zur Herstellung großer Bibliotheken aus chiralen Liganden und/oder Katalysatoren mit hoher struktureller Diversität und 2) die Entwicklung von Analyseme-

thoden für das Hochdurchsatz-Screening solcher Katalysatoren. Das Testen der Katalysatoraktivität und -selektivität beinhaltet das Erfassen von kinetischen Eigenschaften. Daher kann dies schwieriger sein als die Entwicklung von auf Affinitätsphänomenen beruhenden Tests auf biologische Eigenschaften. Das Problem der Identifizierung chiraler Selektoren in großen Bibliotheken potentieller Kandidaten für die chromatographische Enantiomerenentrennung^[14] unterscheidet sich ebenso von der Herausforderung, Hochdurchsatz-Tests für die asymmetrische Katalysatoren zu entwickeln. Obwohl seit Mitte der 90er Jahre signifikante Fortschritte in der Entwicklung sehr schneller Detektionssysteme für achirale homogene und heterogene Katalysatoren erzielt wurden,^[12, 13] kam die entsprechende Forschung auf dem Gebiet der enantioselektiven Katalysatoren nur langsam in Gang.

Meine Arbeitsgruppe stieß 1995 auf die Notwendigkeit, Hochdurchsatz-Screeningssysteme für die Bewertung der Enantioselektivität tausender Biokatalysatoren zu entwickeln.^[15] Wir hatten gerade ein Projekt begonnen mit dem Ziel, die Methoden der gerichteten Evolution^[16] auf die Bildung enantioselektiver Enzyme für die organische Synthese anzuwenden.^[17] Daher bildete die geeignete Kombination molekularbiologischer Methoden für die Zufallsmutagenese^[16, 18] und Genexpression mit den passenden Hochdurchsatz-Screeningssystemen die Grundlage unserer Strategie (Schema 1).^[17, 19]



Schema 1. Gerichtete Evolution eines enantioselektiven Enzyms.^[19]

Der Ausgangspunkt zur Entwicklung eines enantioselektiven Katalysators für eine gegebene Reaktion $A \rightarrow B$ ist ein Wildtyp- (d.h. natürlich vorkommendes) Enzym, das die chemische Umsetzung zwar katalysiert, aber nicht mit einem akzeptablen Maß an Enantioselektivität. Das Gen, welches das Enzym kodiert, wird der Zufallsmutagenese mittels fehlerhafter Polymerase-Kettenreaktion (error-prone polymerase chain reaction, epPCR)^[16a,b] oder rekombinanter

Methoden wie DNA-Shuffling unterworfen.^[16c] Nach der Expression in einem geeigneten bakteriellen Wirtorganismus werden Tausende mutierter Enzyme produziert, die dann auf ihre Enantioselektivität in der interessierenden Reaktion $A \rightarrow B$ getestet werden müssen.^[17] Da die herkömmlichen Verfahren zur Bestimmung des *ee*-Werts einer Reaktion (wie GC oder HPLC)^[5, 6] nicht geeignet sind, in kurzer Zeit solch große Zahlen von Proben zu bewältigen, mussten neue Methoden entwickelt werden.^[15] Zwar waren Screeningsysteme dieser Art 1995 nicht verfügbar, doch hatten wir zumindest keine Probleme bezüglich Dekonvolution oder Kodierung. Der Grund dafür ist einfach. Nach dem Ausplattieren des biologischen Materials auf Agarplatten produziert jede Bakterienkolonie nur ein mutiertes Enzym, weil sie von einer einzigen Zelle abstammt. Indem die Bakterienklone mit einem automatischen Kolonienpicker einzeln geerntet und in die mit Nährmedium gefüllten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt werden, werden somit Anordnungen tausender potentiell enantioselektiver Katalysatoren für die Tests räumlich adressierbar, d.h. zugänglich (Schema 2).^[15, 17, 19]

An diesem Punkt hat die Methode den Charakter einer kombinatorischen Katalyse. Der Gesamtprozess geht jedoch viel weiter als die kombinatorische Chemie, denn nun kommt der Gedanke der Evolution ins Spiel. Nach der Identifizierung des enantioselektivsten Enzyms wird die entsprechende Mutante erneut der Mutagenese und dem Screening unterworfen, und dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis die Enantioselektivität den gewünschten Wert erreicht hat.^[17, 19] Weil die minderwertigen Enzyme/Gene aussortiert werden und nur mit dem enantioselektivsten weitergearbeitet wird, haben wir es mit einer Art „Evolution im Reagensglas“ zu tun. Dieser Ansatz, Enantioselektivität zu erzielen, ist grundlegend verschieden von allen anderen Strategien wie der Ligandenoptimierung in der homogenen Metallkatalyse,^[3] dem De-novo-Design von Enzymen^[8] oder der Bildung katalytischer Antikörper,^[20] weil er keine strukturellen oder mechanistischen Überlegungen erfordert. In einem gewissen Sinn ist solch eine evolutionäre Vorgehensweise vollkommen rational. Das erste Beispiel für dieses Konzept wurde 1997 vorgelegt (Abschnitt 3.1),^[17] und seitdem sind weitere Fortschritte erzielt worden.^[19, 21]

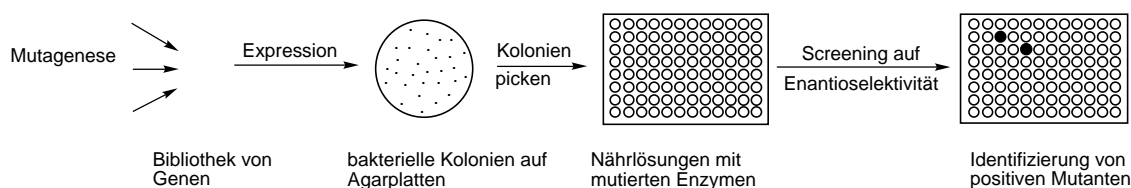
Die meisten Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsysteme, die für die Bewertung enzymkatalysierter Reaktionen entwickelt wurden, dürften genauso gut bei asymmetrischen Übergangsmetall-katalysierten Prozessen funktionieren. Aus diesem Grund haben viele neuere Arbeiten zur Entwicklung solcher Tests Beachtung gewonnen, und diese Forschung hält weiter

an. Bevor die Screeningsysteme, die wir und andere bislang beschrieben haben (Abschnitt 3), vorgestellt und bewertet werden, ist ein kurzer Überblick über die wichtigsten Entwicklungen in der kombinatorischen Herstellung enantioselektiver Übergangsmetallkatalysatoren angebracht (Abschnitt 2). Dabei wird deutlich werden, dass diese grundlegenden Beiträge den Beginn eines faszinierenden neuen Forschungsgebiets darstellen, dass aber das eigentliche Ziel, potentiell enantioselektive Katalysatoren in wirklich großer Zahl herzustellen und zu bewerten, noch nicht erreicht ist, in erster Linie aufgrund fehlender Screeningsysteme.

2. Strategien in der kombinatorischen Planung und Herstellung enantioselektiver Übergangsmetallkatalysatoren

Die ersten Studien über kombinatorische Methoden in der enantioselektiven Übergangsmetallkatalyse führten zu zwei grundlegenden Ansätzen: Bei dem einen werden Analoga bekannter Ligandentypen hergestellt, und zwar vorzugsweise unter Verwendung modular einsetzbarer Bausteine, um so eine hohe Diversität bezüglich der sterischen und elektronischen Eigenschaften an der Metallbindungsstelle zu erreichen. Beim anderen werden die Reaktionsbedingungen einer gegebenen katalytischen asymmetrischen Transformation, wie Lösungsmittel, Temperatur etc., unter Verwendung bekannter Liganden optimiert. Die Vorteile der Festphasensynthese, die sich als ideal für die Herstellung von Bibliotheken potentieller therapeutischer Stoffe herausgestellt hat,^[9] sollten auch bei der Herstellung chiraler Liganden für die asymmetrische Katalyse genutzt werden können. Insbesondere eröffnet die Parallelsynthese, im Unterschied zur Split-and-pool-Methode, einen räumlich adressierbaren Zugriff auf jeden hergestellten Liganden, d. h., die Katalysatoren können einzeln getestet werden. In der Theorie begrenzt dies natürlich die Diversität und damit die Größe der Bibliotheken, was die Frage aufwirft, ob die Methode nur für die Optimierung bekannter Liganden verwendet werden kann oder ob sich auch neue *Typen* von chiralen Ligandensystemen auf kombinatorischem Weg mittels Parallelsynthese entdecken lassen. Wir halten die zweite Möglichkeit durchaus für realistisch, allerdings setzt sie die kreative Entwicklung von Suchsystemen voraus.

Aufbauend auf früheren Berichten über die Verwendung chiraler β -Aminoalkohole als katalytisch aktive Liganden in der enantioselektiven Addition von Et_2Zn an Aldehyde berichteten Ellman und Mitarbeiter 1995 über die parallele



Schema 2. Einzelne Schritte in der gerichteten Evolution eines enantioselektiven Enzyms.^[19]

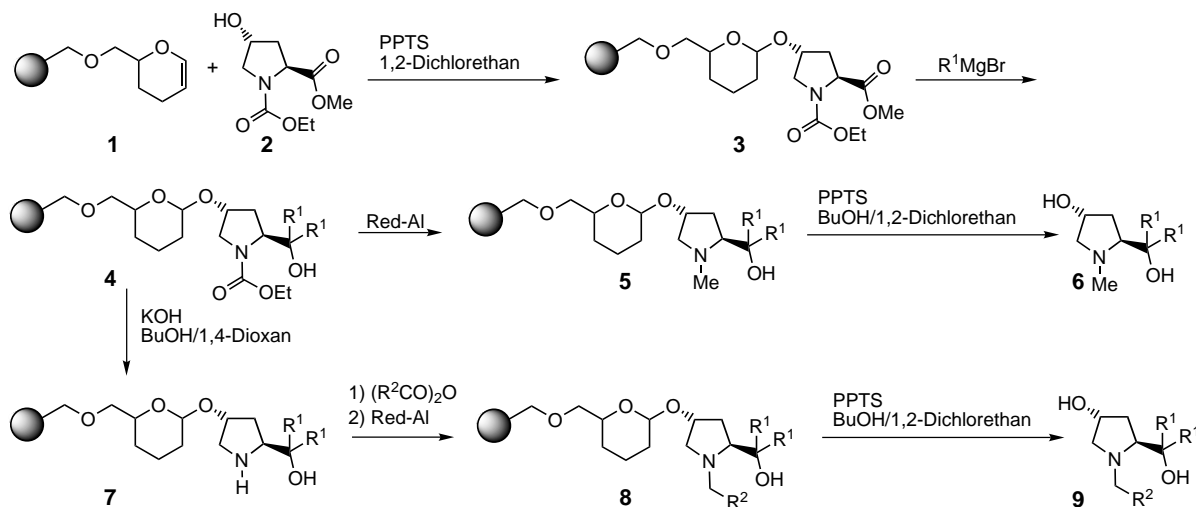
Festphasensynthese einer kleinen Bibliothek substituierter 2-Pyrrolidinmethanolderivate **6** und **9** (Schema 3).^[22] *trans*-4-Hydroxy-L-prolinmethylester **2** wurde zunächst auf Polystyrol(Merrifield)-Harz **1** über einen abspaltbaren Tetrahydropyranol-Linker verankert. Die Zugabe verschiedener Grignard-Reagentien und anschließende Schutzgruppenumwandlungen am Stickstoffatom lieferten zehn immobilisierte Liganden **5** und **8**, die mit Säure hydrolytisch vom Harz abgespalten werden konnten und so **6** bzw. **9** gaben. Diese Verbindungen wurden dann eine nach der anderen in Et₂Zn-Additionen an verschiedene Aldehyde unter klassischen Bedingungen getestet und die *ee*-Werte durch konventionelle GC an chiraler stationärer Phase bestimmt. In den besten Fällen (bei aromatischen und aliphatischen Aldehyden bis zu 94 bzw. 85 % *ee*) wurde auch die Selektivität der trägergebundenen Liganden untersucht, sie war gegenüber der Enantioselektivität des jeweiligen freien Liganden in Lösung leicht unterlegen. Dieser frühe Beitrag demonstriert die Durchführbarkeit der parallelen Festphasensynthese neuer Mitglieder einer speziellen Ligandenklasse, aber er enthält keinen Hinweis darauf, wie ein Hochdurchsatz-Screening in realen Anwendungen erreicht werden kann. Die Autoren haben allerdings auch nicht den Anspruch erhoben, das Konzept der Hochdurchsatz-Herstellung und -Bewertung neuer enantioselektiver Katalysatoren in die Tat umgesetzt zu haben. Möglicherweise könnte die Diversität der Bibliothek und damit die Wahrscheinlichkeit, noch bessere Katalysatoren zu finden, durch Verwendung einer größeren Zahl von Grignard-Reagentien und *N*-Schutzgruppen erhöht werden. Eine Automatisierung würde so in kurzer Zeit größere Ligandenbibliotheken zugänglich machen.

In einem anderen Ansatz hat Gilbertson die Polyethylenstäbchen-Methode von Geysen angewendet, um eine 63 Mitglieder zählende Bibliothek phosphanmodifizierter Peptide als Liganden in der enantioselektiven Rh-katalysierten Hydrierung von Methyl-2-acetamidoacrylat zu synthetisieren.^[23] Ein individuelles Screening wurde konventionell in trägergebundener Form in einem Parallelreaktor mit 24 Gefäßen mittels GC durchgeführt. Zwar überstiegen die *ee*-

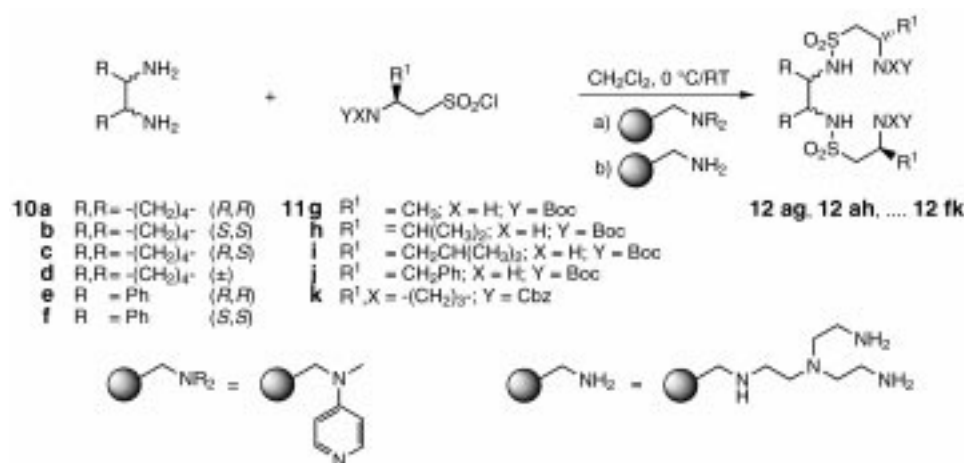
Werte 18 % nicht, doch wurden Korrelationen zwischen der Peptidsequenz und der Enantioselektivität festgestellt. Die eigentliche Chemie ist zwar neu, aber kaum als kombinatorische Katalyse zu bezeichnen, da wirklich große Ligandenbibliotheken sowie geeignete Hochdurchsatz-Screeningsysteme nicht berücksichtigt wurden. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit ein bemerkenswerter erster Schritt, weil Phosphane eine sehr wichtige Ligandenklasse sind. In der Tat bleibt die effiziente kombinatorische Herstellung und Bewertung chiraler Phosphane eine Herausforderung. Gilbertson hat eine ähnliche Strategie zur Optimierung von Pd-Katalysatoren für den Einsatz in der asymmetrischen allylischen Substitution beschrieben (*ee* bis zu 85 %).^[24]

Gennari ging bei der Entwicklung neuer enantioselektiver Katalysatoren mittels Parallelsynthese einen Schritt weiter, obwohl wiederum ein wirkliches Hochdurchsatz-Screening nicht Teil der Bemühungen war.^[25] Neue Mitglieder einer bekannten Familie chiraler Sulfonamidliganden wurden in einer modularen Weise durch Festphasenextraktion (SPE) gebildet. Vicinale Diamine **10** wurden mit Sulfonylchlorid **11** im Überschuss versetzt, um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten (Schema 4). Um die aufwändige Reinigung der Sulfonamidprodukte **12** zu vermeiden, wurden die Reaktionen in Dichlormethan in Gegenwart von polymeregebundenem Dimethylaminopyridin durchgeführt, das nicht nur die Kupplungsreaktion katalysiert, sondern auch freigesetztes HCl abfängt. Der Überschuss an Sulfonylchlorid wurde dann durch Reaktion mit festphasengebundenem Tris(2-aminoethyl)amin entfernt. Somit waren die modulare Herstellung und die leichte Abtrennung der „Nebenprodukte“ von den „reinen“ Liganden in einfacher Weise möglich.

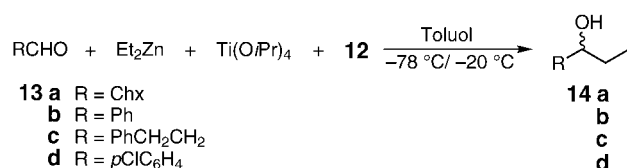
Die Disulfonamid-Bibliothek wurde sodann in der Ti(OiPr)₄-vermittelten Addition von Et₂Zn an Aldehyde **13** getestet (Schema 5).^[25] eine Reaktion, die zuerst von Yoshio-ka und Ohno mit dem Bistrifluormethylsulfonamid von 1,2-Diaminocyclohexan beschrieben wurde.^[26] Die Tests wurden in paralleler Weise in 30 Reaktionsgefäßen durchgeführt. Um den Durchsatz zu erhöhen, wurde jedes Gefäß mit vier Aldehyden beladen, und die Enantioselektivitäten der vier



Schema 3. Festphasensynthese von chiralen 2-Pyrrolidinmethanolliganden.^[22] PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat.



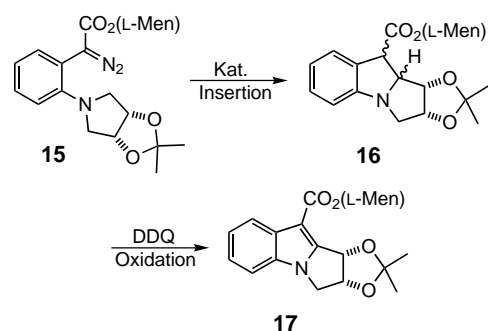
Schema 4. Festphasensynthese von chiralen Sulfonamidliganden.^[25] Boc = *tert*-Butoxycarbonyl; Cbz = Benzyl-oxy-carbonyl.



Schema 5. Ti-vermittelte enantioselective Addition von Et₂Zn an Aldehyde in Gegenwart katalytischer Mengen chiraler Sulfonamidliganden.^[25] Chx = Cyclohexyl.

Reaktionsprodukte wurden durch konventionelle GC-Analyse der Rohmischungen bestimmt. Die Idee, einen gegebenen Katalysator zu verwenden, um kombinatorisch die Reaktionen verschiedener Substrate zu testen, war vorher in einem anderen Zusammenhang von Kagan vorgeschlagen worden.^[27] Im vorliegenden Fall benötigte man für den Test jeder Mischung etwa eine Stunde, d.h., dass etwa 96 *ee*-Bestimmungen der Produkte **14** pro Tag durchgeführt werden konnten. Insgesamt wurden 120 Ergebnisse gesammelt, wobei die besten Enantioselectivitäten bei >90% *ee* lagen. Vor kurzem wurde von Liskamp ein ähnlicher Ansatz verfolgt, bei dem durch Festphasensynthese eine kleine Bibliothek von Peptidosulfonamiden als chirale Liganden für die gleiche Reaktion hergestellt wurde (bis zu 66% *ee*).^[28] Wiederum waren vermutlich etwa 96 *ee*-Bestimmungen pro Tag mittels GC möglich, aber nur einige wenige Dutzend wurden tatsächlich durchgeführt.

Aufbauend auf früheren Arbeiten von Sulikowski über die enantioselective Cu-katalysierte intramolekulare C-H-Insertion von Metall-Carbenoiden^[29] hat Burgess ein interessantes System zur Optimierung der geeigneten Kombination von Ligand, Übergangsmetall und Lösungsmittel für die Reaktion der Diazoverbindung **15** vorgeschlagen (Schema 6).^[30] Unter Verwendung einer Standard-Mikrotiter-/Filtrationsplatte mit 96 Vertiefungen wurden die Reaktionsparameter systematisch variiert. Fünf Liganden, sieben Metallvorstufen und vier Lösungsmittel wurden in einem iterativen Optimierungsverfahren getestet. Nach Oxidation mit 2,3-Dichlor-5,5-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ) wurde die Stereoselectivität mittels Standard-HPLC überprüft. Diese Art der Katalysa-



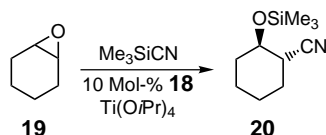
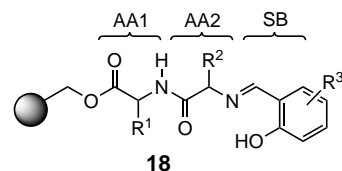
Schema 6. Katalytische stereoselective intramolekulare Carbeninsertion.^[30] L-Men = L-Menthyl; DDQ = 2,3-Dichlor-5,5-dicyan-1,4-benzochinon.

Verfahren gegenüber dem traditionellen Ansatz, bei dem einzelne Katalysatoren nacheinander unter verschiedenen Bedingungen getestet werden, eindrucksvoll veranschaulichen.

Burgess hat auch die Pd-katalysierte allylische Substitution untersucht, indem er sieben Phosphanyloxazolin-Liganden in verschiedenen Ligand-zu-Metall-Verhältnissen einsetzte.^[32] In den 27 Vertiefungen eines Aluminiumblocks wurden die Reaktionen unter Schutzgas (Handschuhkasten) parallel durchgeführt. Die Analysen wurden mit konventioneller GC an einer chiralen Phase und einem automatischen Probengeber durchgeführt. Dieser Aufbau ermöglichte ungefähr 33 Katalysatorbewertungen pro Tag. Offenbar wurden im Rahmen der Untersuchung nur ein paar Dutzend Ansätze bewertet, was zur Identifizierung eines Katalysators führte, der in der Reaktion von 4-Acyloxy-2-penten mit Malonat einen *ee*-Wert von 74% gab. Möglicherweise könnte eine weitere Diversifizierung der Liganden zu einem selektiveren Liganden als dem in diesem Fall besten, dem Trost-Katalysator (92% *ee*), führen.^[33]

Eine wichtige Entwicklung bezüglich der Optimierung asymmetrischer Katalysatoren wurde 1996 von Snapper und Hoveyda beschrieben.^[34] Sie bahnten unter anderem den Weg für diversitätsbezogene Vorgehensweisen in der Ti-vermittelten enantioselectiven Ringöffnung von *meso*-Epoxiden wie

19 mit Cyanotrimethylsilan (TMSCN) zum Nitril **20** (Schema 7). Als Katalysatoren wurden Peptide gewählt, die aus drei unabhängig voneinander variablen Untereinheiten aufgebaut sind: einer Schiff-Base (SB), einer Aminosäure 1 (AA1) und einer weiteren Aminosäure 2 (AA2). Der modulare Aufbau dieses Systems gestattet einen höheren Grad an



Schema 7. Ti-katalysierte Ringöffnung von **19** in Gegenwart modular aufgebauter Liganden **18**.^[34]

Diversität und ist deshalb ideal geeignet für die kombinatorische Katalysatorforschung. So ist mit 20 unterschiedlichen Aldehyden für die Schiff-Base und 20 natürlichen Aminosäuren prinzipiell die Synthese von 8000 chiralen Liganden möglich. Da zum Zeitpunkt dieser grundlegenden Arbeiten allerdings keine Hochdurchsatz-Screeningsysteme existierten, entschied man sich, eine solch große Bibliothek *nicht* herzustellen, sondern nur eine recht kleine. Die Liganden dieser Bibliothek wurden alle vom Träger abgelöst und in der Ti-katalysierten Reaktion von Cyclohexenoxid **19** mit TMSCN in Lösung unter Verwendung konventioneller GC untersucht. Später wurde eine ähnliche Untersuchung mit den katalytisch aktiven Kügelchen selbst durchgeführt.^[35a]

Snapper und Hoveyda benutzten eine Suchstrategie, die ihrer Meinung nach die Identifizierung effektiver Liganden ohne die Untersuchung aller Möglichkeiten ermöglicht.^[34, 35a-c] Dementsprechend wurde jede der drei modularen Untereinheiten sukzessive optimiert, während die anderen beiden Untereinheiten jeweils konstant gehalten wurden (Abbildung 2). Aus der Gesamtheit von nur 60 Katalysatoren wurde der beste mit einer Enantioselektivität von 89 % *ee* in der Modellreaktion identifiziert. Wie die Autoren betonen, liegt dem Abrastern der Positionen nach diesem Muster die Annahme zugrunde, dass sich die drei Untereinheiten additiv, aber nicht kooperativ verhalten. Obwohl diese Bewertung nicht bewiesen oder widerlegt werden kann, ohne größere Bibliotheken zu prüfen, erscheint sie plausibel. Eine ähnliche Suchstrategie wurde von den Autoren in der Ti-katalysierten enantioselektiven Addition von Cyanid an Imine angewandt.^[35d,e] Nichtsdestoweniger könnte das Auffinden und Optimieren modular aufgebauter Katalysatorsysteme, bei denen *sehr wohl* synergistische Effekte zwischen den Unter-

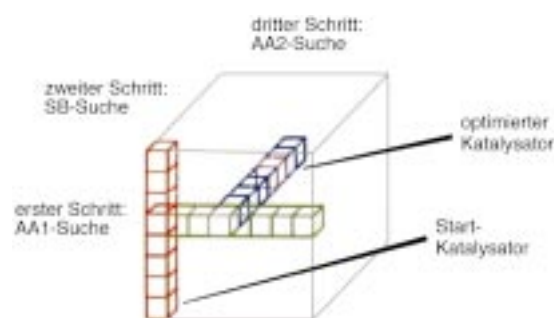
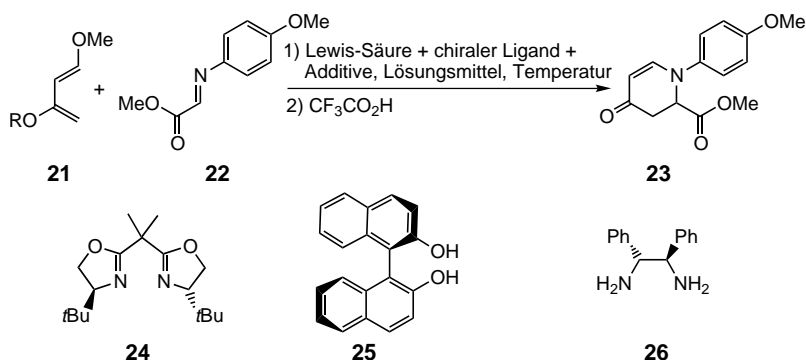


Abbildung 2. Suchstrategie für das Testen enantioselektiver modular aufgebauter Katalysatoren.^[34, 35] AA = Aminosäure; SB = Schiff-Base.

einheiten auftreten, ein interessantes Ziel für die Zukunft sein.

Auf der Suche nach den optimalen Bedingungen für eine enantioselektive Lewis-Säure-katalysierte Aza-Diels-Alder-Reaktion (**21** + **22** → **23**; Schema 8) hat Whiting verschiedene Parameter parallel verändert.^[36] Die Literaturvorgaben für den Katalysator waren nicht sehr klar, es war lediglich

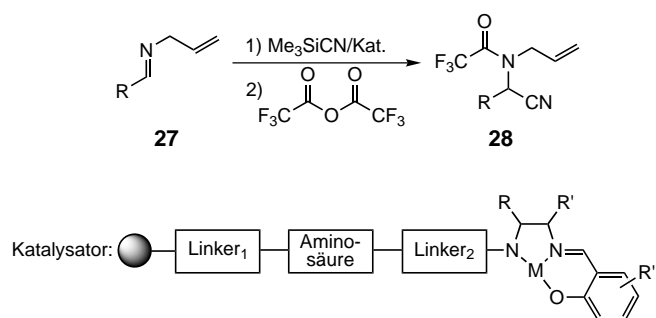


Schema 8. Hetero-Diels-Alder-Reaktion, katalysiert durch Lewis-Säuren in Gegenwart der Liganden **24**, **25** oder **26**.^[36] R = Trimethylsilyl.

bekannt, dass viele Lewis-Säuren, einschließlich $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (Tf = Trifluormethansulfonyl), Diels-Alder-Reaktionen katalysieren. Drei bekannte chirale Liganden wurden in Verbindung mit $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, MgI_2 und FeCl_3 als Lewis-Säuren getestet und weiterhin eine begrenzte Zahl von Additiven und Lösungsmitteln. Mit einem Autosampler und einem konventionellen HPLC-Gerät mit einer chiralen Säule wurden 144 Ausbeuten und *ee*-Werte in etwa einer Woche erhalten, sodass in diesem System etwa 20 Bewertungen von Katalysatorsystemen für eine gegebene Reaktion pro Tag möglich sind. Vier der besten Treffer wurden dann in vergrößerten Ansätzen untersucht. Der optimale Katalysator, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ /**26**, lieferte das Cycloaddukt **23** mit 97 % *ee* in 64 % Ausbeute (Schema 8). Obwohl diese Art der Suche in diesem konkreten Fall recht erfolgreich war, ist es nicht klar, wie effektiv sie wirklich ist, da die Ligandendiversität kaum beachtet wird. Mit Bibliotheken aus modular aufgebauten chiralen Liganden oder aus einfachen chiralen Liganden in Verbindung mit einer hohen Diversität an achiralen Addi-

ven sind die besten Ergebnisse in der kombinatorischen Suche nach enantioselektiven Katalysatoren zu erwarten.

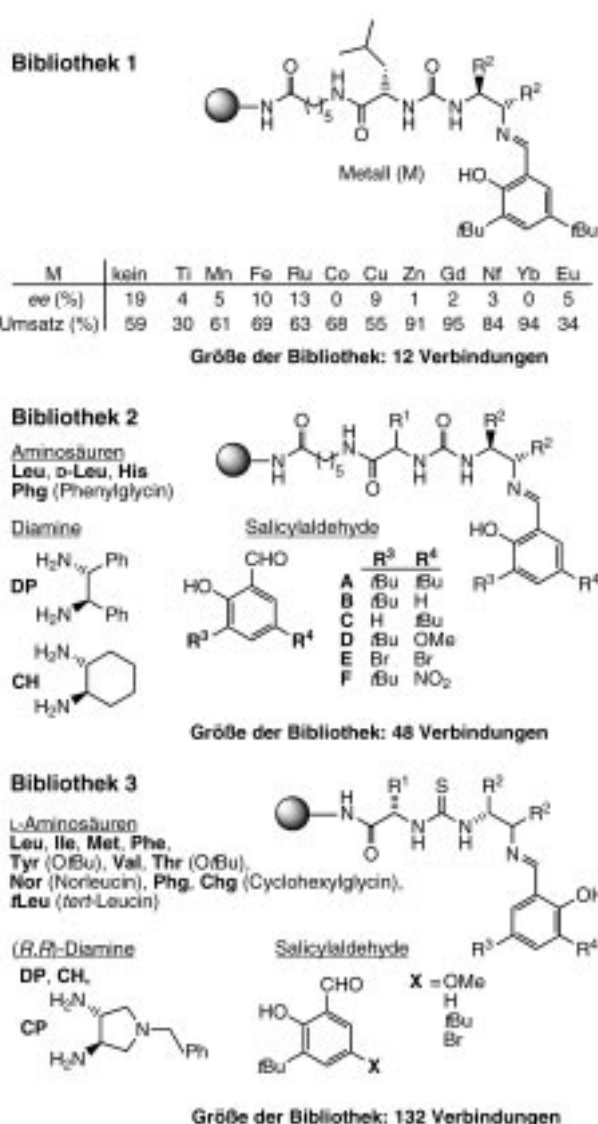
Jacobsen beschrieb 1998 eine kombinatorische, auf Diversität beruhende Methode zur Entdeckung hoch enantioselektiver Katalysatoren, die mit dem traditionellen Einer-nach-dem-anderen-Ansatz zur Katalysatoroptimierung nicht so einfach möglich gewesen wäre.^[37] Eine Strategie für die Parallelsynthese einer bestimmten Klasse modular aufgebauter Liganden für die katalytische asymmetrische Strecker-Reaktion von Iminen **27** (Schema 9) wurde beschrieben. Wie im Fall von Snapper und Hoveyda^[34, 35] ist der erste Schritt in



Schema 9. Asymmetrische Strecker-Reaktion der Aldimine **27**, katalysiert durch modular aufgebaute Metallkomplexe.^[37]

der parallelen Herstellung einer Katalysatorbibliothek die Auswahl eines Ligandensystems, das an der Festphase hergestellt und dessen Struktur systematisch variiert werden kann.^[37] Zusätzlich zu der Voraussetzung, dass die Reaktionen in der modularen Herstellung der Liganden hohe Ausbeuten liefern, ist eine geeignete Stelle für die Anbindung an den festen Träger notwendig. Viele herkömmliche C_2 -symmetrische Liganden würden mehrere langatmige Syntheseschritte erfordern. Dagegen sind dreizählige Schiff-Base-Verbindungen, die als Liganden für eine Reihe katalytischer Reaktionen bekannt sind, in der Tat geeignet für die Festphasensynthese.^[37] Diese Systeme sind gewöhnlich aus drei Einheiten aufgebaut, einem chiralen Aminoalkohol, einem Salicylaldehydderivat und einem Metallion. In der vorliegenden Studie wurde die Aminoalkoholeinheit durch ein chirales Diamin ersetzt; darüber hinaus trugen auch die beiden Linker zur strukturellen Diversität bei (Schema 9).

Zuerst wurde ein gegebenes Ligandensystem an der Festphase hergestellt und eine kleine Katalysatorsammlung (Bibliothek 1) aufgebaut, indem 11 verschiedene Metalle sowie in einem Fall kein Metall zugegeben wurden (Schema 10). Der beste *ee*-Wert (19 %) wurde mit dem metallfreien System erhalten. Aufgrund dessen wurde eine parallele Ligandenbibliothek mit 48 Mitgliedern (Bibliothek 2) aus zwei 1,2-Diaminen und einer Vielzahl von Aminosäuren und Schiff-Basen hergestellt. Die Kombination aus L-Leucin und einem (*R,R*)-Diamin stellte sich als optimal heraus, wobei das Substitutionsmuster im aromatischen Substituenten des Salicylaldehyds ebenfalls eine entscheidende Rolle spielte. Danach wurden die Linkerelemente durch den traditionellen Einer-nach-dem-anderen-Ansatz optimiert, was ergab, dass die selektivsten Katalysatoren Thioharnstoff-Linker enthal-

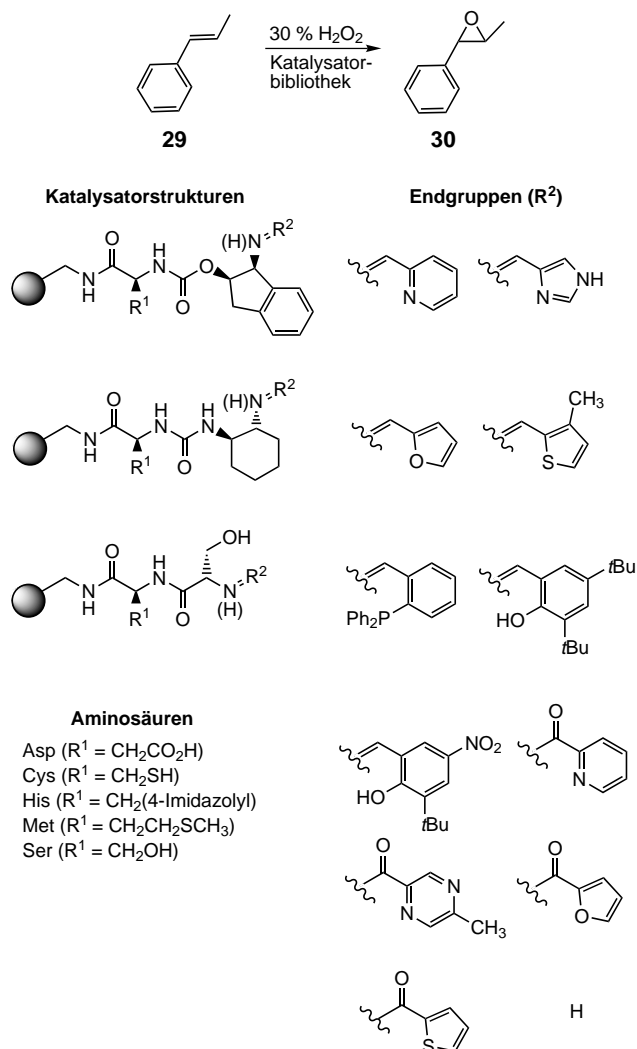


Schema 10. Katalysatorbibliotheken für die asymmetrische Strecker-Reaktion.^[37] DP = 1,2-Diphenyl-1,2-ethandiamin; CH = 1,2-Cyclohexandiamin; CP = *N*-Benzyl-3,4-diaminopyrrolidin.

ten. Dementsprechend wurde die Bibliothek 3 hergestellt, die 132 Thioharnstoffderivate enthielt (Schema 10). Die Enantioselektivitäten in der Addition von HCN an eine Vielzahl von Iminen betrugen > 80 %, im besten Fall, einem Ansatz im Labormaßstab, betrug sie 91 % *ee* bei -78°C .^[37] Die *ee*-Bestimmungen wurden mit konventioneller HPLC an einer chiralen Phase durchgeführt. Der tatsächliche Durchsatz wurde nicht angegeben. Die Bedeutung dieses Beitrags besteht jedoch darin, dass er die Frage der Komplexität berührt, die sich aus den voneinander abhängigen Variablen in katalytischen Prozessen ergibt. In der Tat führte die diversitätsgestützte Methode zu zwischen den Katalysator-komponenten auftretenden synergistischen Effekten, die unerwartet waren und nicht der „normalen“ Intuition entsprechen.

Der nächste wichtige konzeptionelle Fortschritt, der ebenfalls von Jacobsen beschrieben wurde, betrifft die Frage, ob kombinatorische Methoden zur Entdeckung neuer Typen

chiraler Liganden herangezogen werden können.^[38] In diesem Fall konzentrierten sich die Bemühungen auf die kombinatorische Suche nach einem chiralen Ligand/Metall-System, das die H₂O₂-vermittelte enantioselektive Epoxidierung von *trans*- β -Methylstyrol **29** katalysiert (Schema 11). Zunächst wurden modular aufgebaute Liganden, die aus 1) einer von



Schema 11. Ligandenbibliotheken für die asymmetrische metallkatalysierte Epoxidierung des Olefins **29**.^[38]

fünf Aminosäuren, 2) 1-Amino-2-indanol, *trans*-1,2-Diaminocyclohexan oder Serin und 3) einer von 12 Endgruppen zusammengesetzt waren, auf einem Wang-Harz hergestellt. Um auch solche Liganden einzuschließen, die bekanntermaßen metallkatalysierte Epoxidierungen begünstigen, wurde auch endgruppengeschütztes Salicylamin an das Wang-Harz angeknüpft. Die Bibliothek aus insgesamt 192 Liganden wurde dann mit 30 verschiedenen Metallsalzen versetzt, sodass theoretisch 5760 Metall-Ligand-Komplexe entstehen konnten. Aufbauend auf früheren Erfahrungen bezüglich der Anwendung metallbindender kombinatorischer Bibliotheken zur Identifizierung von Koordinationskomplexen^[39] war es möglich, mit Farbtassays und qualitativ anhand der Farbe der anorganischen Spezies zu zeigen, dass sich ungefähr 80 % der

5760 möglichen Metall-Ligand-Kombinationen gebildet hatten.^[38]

Um das aktivste und stereoselektivste Kügelchen zu identifizieren, musste eine Dekonvolutionsstrategie entwickelt werden. Dazu wurde eine Mischung aller 192 Liganden jeweils nur mit einer Metallquelle versetzt, und jede der so erhaltenen 30 Katalysatorgruppen wurde in der Modell-Epoxidierungsreaktion getestet. Eine konventionelle GC-Analyse dieser 30 Experimente ergab, dass die mit VOSO₄ und FeCl₂ erhaltenen Gruppen die aktivsten waren. Da VOSO₄ an sich bereits katalytisch recht aktiv ist, konzentrierte man sich nun auf FeCl₂. Es wurden 12 Ligandenbibliotheken hergestellt, von denen jede die 16 Grundstrukturen und eine der Endgruppen enthielt, und mit FeCl₂ versetzt. Das normale Screeningverfahren ergab, dass die aktivsten Katalysatoren diejenigen sind, die eine Endgruppe vom Pyridintyp enthalten. Danach wurden die 16 Liganden mit der aktivsten Endgruppe getestet. Da jedoch bei einem solch restriktiven Vorgehen theoretisch aktive Katalysatoren übersehen werden könnten, wurde eine weitere Verschlüsselung nicht vorgenommen,^[38] vielmehr wurden alle FeCl₂-Komplexe der ursprünglich 192 Liganden auf Aktivität untersucht. Die Liganden mit Pyridinendgruppen erwiesen sich als die aktivsten. Diese kleine Gruppe wurde dann auf Enantioselektivität hin untersucht: Es wurden drei FeCl₂/Ligand-Komplexe identifiziert, die das Produkt **30** der Modellreaktion mit *ee*-Werten von 15–20 % lieferten. Obwohl die Enantioselektivitäten moderat sind, wird hier zum ersten Mal deutlich, dass es möglich ist, neue Ligandstrukturen für die Anwendung in der asymmetrischen Katalyse zu entdecken. Nichtsdestoweniger ist bislang noch kein kombinatorisches Suchsystem entworfen worden, das auf der strikten Analogie zur Split-and-mix-Strategie basiert, wie sie in der pharmazeutischen Wirkstoff-Forschung angewendet wird. Eine der Herausforderungen wäre somit die Frage des Hochdurchsatz-Screenings.

Es wurde in diesem Abschnitt deutlich, dass eine Reihe wichtiger konzeptioneller Fortschritte im Hinblick auf die Synthese von Bibliotheken chiraler Liganden und Katalysatoren erzielt werden konnte. Verschiedene Systeme wurden entworfen, um eine relativ hohe Diversität der Liganden zu ermöglichen, obwohl die Zahl der tatsächlich hergestellten Liganden bei weitem nicht in die Nähe der theoretischen Grenzen getrieben wurde. Weitere Beispiele sind erschienen.^[40] Die Probleme bezüglich des zweiten Teils der Umsetzung der asymmetrischen kombinatorischen Katalyse in die Praxis, die Entwicklung und konsequente Anwendung von Hochdurchsatz-Screeningsystemen zur Erfassung der Enantioselektivität wirklich großer Zahlen von Katalysatoren, wurden in diesen Arbeiten kaum angegangen.

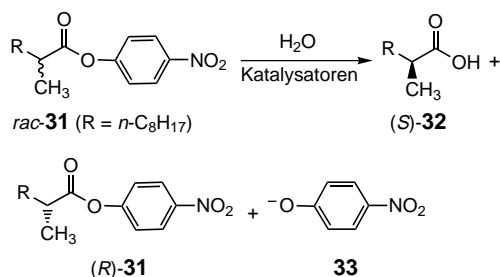
3. Hochdurchsatz-Screeningsysteme zur Bewertung enantioselektiver Katalysatoren und Enzyme

In den 90er Jahren wurden verschiedene Systeme entwickelt für das Hochdurchsatz-Screening der Aktivität von Enzymen^[16] und Übergangsmetallkatalysatoren^[12, 13] in nicht-enantioselektiven Reaktionen. Gewöhnlicherweise genügen

Farbtests oder einfache massenspektrometrische (MS-) Messungen. Zudem sind viele dieser Assays recht ungenau, aber ausreichend effektiv, um besonders aktive Katalysatoren aus großen Bibliotheken zu identifizieren. Einmal ermittelt, werden diese „Treffer“ konventionellen kinetischen Messungen unterworfen, um präzise Aktivitätsdaten zu erhalten. Leider war die Ausweitung dieser Systeme auf enantioselektive Prozesse keineswegs einfach, sodass neue Konzepte entwickelt werden mussten. Tatsächlich gab es vor 1997 kein einziges Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsystem.

3.1. UV/Vis-gestützte Systeme

Wie in Abschnitt 1 geschildert, wurden wir zum ersten Mal mit dem Problem, ein Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsystem zu entwickeln, in unseren Arbeiten zur gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme (Schema 1) konfrontiert.^[17] Das konkrete Ziel war die Bildung hoch enantioselektiver Enzyme für die hydrolytische kinetische Racematspaltung von racemischem 2-Methyldecanoat **31** (Schema 12). Ausgangspunkt war die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*, die die Hydrolyse des Substrats katalysiert, allerdings nur mit verschwindend niedriger Enantioselektivität (Selektivitätsfaktor $E \approx 1.1$, relative Reaktionsgeschwindigkeit des (*S*)- bzw. (*R*)-Esters, entsprechend 2–8% *ee* bei 40–50% Umsatz) zugunsten der Säure (*S*)-**32**.



Katalysatorbibliothek: 30 000 Lipasemutanten aus *P. aeruginosa*

Ergebnis: $ee = 2\text{--}8\%$ ($E \approx 1.1$) $\xrightarrow{\text{Evolution}}$ $ee > 90\%$ ($E = 25$)

Schema 12. Kinetische Racematspaltung des Esters **31**, katalysiert durch Lipasemutanten, die durch gerichtete Evolution erhalten wurden.^[17, 19, 21]

Nicht der Methyl-, sondern der *p*-Nitrophenylester wurde in den Untersuchungen verwendet, denn die Bildung des gelben *p*-Nitrophenolats **33** als eines der Produkte im Puffermedium erlaubt die einfache Verfolgung der Reaktion durch Messung der Absorption bei 410 nm als Funktion der Zeit. Da das Racemat lediglich kinetische Informationen bezüglich der Gesamtaktivität liefern würde, wurden die Ester (*R*)- und (*S*)-**31** synthetisiert und *getrennt* paarweise für jede Lipasemutante getestet. Somit konnten auf einer Standard-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen 48 Mutanten in wenigen Minuten getestet werden. Zwei typische experimentell erhaltene Diagramme sind in Abbildung 3 dargestellt. Das obere zeigt den Reaktionsverlauf mit einer kaum stereoselektiven Lipase (in diesem Fall dem Wildtyp), das untere die gesteigerte Enantioselektivität der besten Mutante,

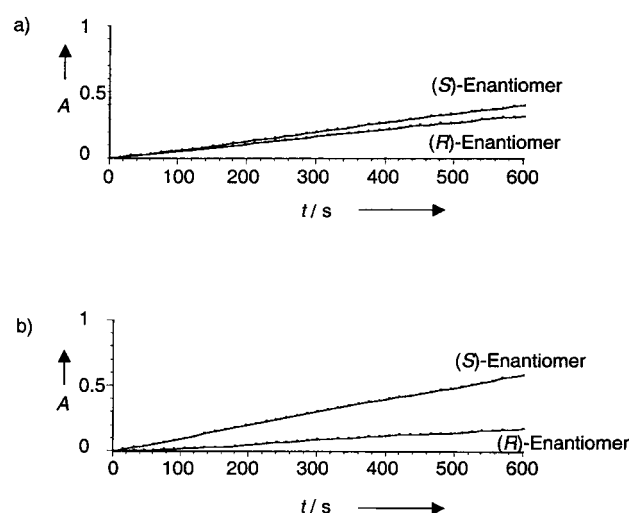


Abbildung 3. Zeitlicher Verlauf der Lipase-katalysierten Hydrolyse der Ester (*R*)- und (*S*)-**31**.^[17] a) Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa*, b) verbesserte Mutante der ersten Generation.

die in der ersten Bibliothek mit ungefähr 1500 Mitgliedern gefunden wurde.^[17]

In den folgenden drei Runden der Zufallsmutagenese wurden in jeder Generation etwa 2000–2400 Mutanten getestet. Die Enantioselektivität der jeweils selektivsten Mutante („Treffer“) wurde anschließend in der kinetischen Racematspaltung mit konventioneller GC bestimmt. Im Schnitt wurden sechs bis sieben verbesserte Varianten pro Bibliothek aus 2000–2400 Enzymmutanten entdeckt. Das Gen der besten Variante wurde in der jeweils folgenden Mutagenese verwendet. Nach vier Mutageneserunden war eine Lipasemutante identifiziert, die einen Selektivitätsfaktor von $E = 11.3$ aufwies, der einem *ee*-Wert von 81% bei 30% Umsatz zugunsten von (*S*)-**32** entspricht.^[17] Verbesserte Methoden zur Erforschung des Proteinsequenzraums in Hinblick auf Enantioselektivität, die auf der Kombination von epPCR und Sättigungsmutagenese basieren, führten zu einer kleinen Familie von Lipasemutanten mit E -Werten von 20–25 ($ee > 90\text{--}93\%$).^[19, 21] Der Gesamtaufwand für dieses Ergebnis umfasst etwa 30 000 Mutanten, die alle mit dem oben genannten Assay bewertet wurden. Durch Umkehrung des Evolutionsdrucks – der Proteinsequenzraum wurde einfach nach *R*-selektiven Mutanten durchsucht – konnte die Richtung der Enantioselektivität umgekehrt werden.^[19]

In der frühen Phase dieser Studie wurden viele Schritte per Hand ausgeführt, z. B. das Kolonienpicken oder das Pipettieren, wodurch die Zahl der Mutanten, die getestet werden konnten, limitiert wurde.^[15, 17, 41] Trotzdem ließen sich etwa 500 Katalysatoren pro Tag untersuchen. Dies wurde später auf ca. 1000 Mutanten pro Tag erhöht, hauptsächlich durch die Verwendung eines Pipettierroboters. Durch komplette Automatisierung unter Verwendung eines automatischen Kolonienpickers und einer Roboter-Arbeitsstation konnte der Durchsatz auf ca. 1500 Mutanten pro Tag erhöht werden.^[42] Da die Zufallsmutagenese zumeist einen gewissen Prozentsatz von Enzymmutanten hervorbringt, die überhaupt keine Lipaseaktivität aufweisen („tote Varianten“), haben wir kürzlich einen groben Vortest eingeführt, der auf dem

Tributyryn-Test beruht.^[42] Dabei werden die Agarplatten, die die Bakterienklone enthalten (Schema 2), mit Glyceryltributyryl (Tributyryn) versetzt, das ein wohlbekanntes Substrat für Lipasen ist. Aufgrund seiner Unlöslichkeit im Medium haben die Platten ein milchiges Aussehen. Eine katalytisch aktive Mutante hydrolysiert das Tributyryn unter Bildung wasserlöslicher Produkte, und es resultieren klare Höfe um die betreffenden Kolonien (Abbildung 4). Das Ausbleiben solcher klarer Bereiche signalisiert fehlende katalytische Aktivität. Die entsprechenden Bakterienkolonien werden nicht weiter berücksichtigt, sodass sich die Zahl der zu untersuchenden Mutanten verringert.

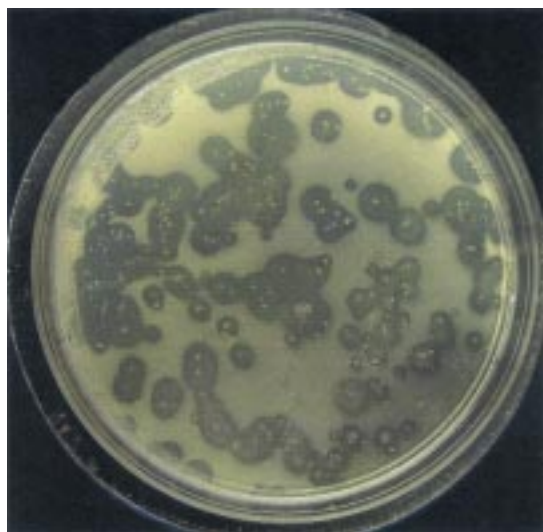
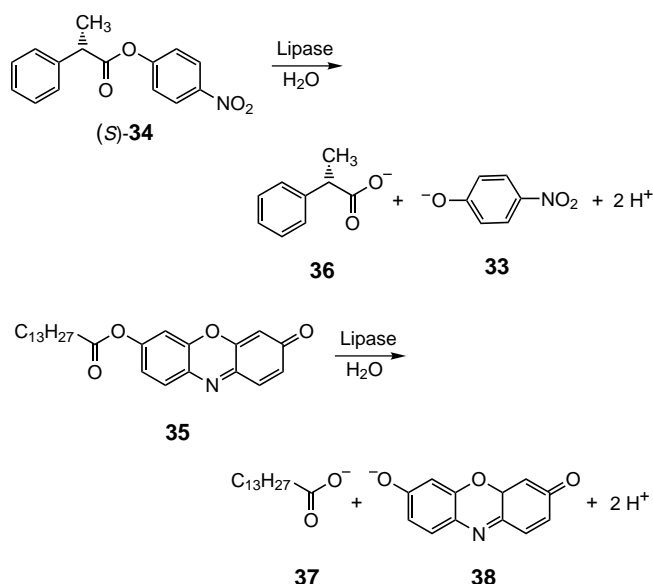


Abbildung 4. Typischer Tributyryn-Test auf Lipaseaktivität, in dem die Agarplatte zur Veranschaulichung auf einen schwarzen Hintergrund gestellt wurde.^[42] Weiße Punkte repräsentieren Bakterienkolonien; solche ohne (klaren) schwarzen Hintergrund beinhalten inaktive Mutanten.

Diese UV/Vis-Methode ist das erste Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsystem, das allerdings zwei Einschränkungen aufweist. Da die Substrate (*R*)- und (*S*)-**31** getrennt untersucht werden müssen, ist die Substratkonzurrenz im Hinblick auf das Enzym nicht gewährleistet. Normale enzymatische Bedingungen liegen also nicht vor. Deshalb können aus den kinetischen Diagrammen in Abbildung 3 keine verlässlichen *E*- oder *ee*-Werte abgeleitet werden. Der Test stellt lediglich einen bequemen Weg dar, positive „Treffer“ zu identifizieren. Ferner ergeben sich bei hohen *ee*-Werten Probleme. Ein schwerwiegenderer Nachteil hängt damit zusammen, dass die evolutionsgestützte Optimierung mit dem *p*-Nitrophenylester **31** und nicht mit einem praxisrelevanteren Kandidaten, z. B. dem Methylester, durchgeführt wird.

Kazlauskas hat ein kolorimetrisches Assay zum Testen der Enantioselektivität von Lipasen oder Esterasen in Esterhydrolysen entwickelt.^[43] Um die Konkurrenzsituation eines enzymatischen Prozesses zu simulieren, wurde der so genannte Quick-*E*-Test entwickelt. Dabei wird die Mischung des chiralen *p*-Nitrophenylesters **34** und des Resorufinesters **35** der enzymkatalysierten Hydrolyse unterworfen (Schema 13), wobei Letzterer die Rolle des „Enantiomers“ übernimmt. Die beiden Hydrolysen lassen sich durch Aufnahme der UV/Vis-Absorption der Produkte **33** und **38** bei zwei deutlich



Schema 13. Quick-*E*-Test zur Bestimmung der Enantioselektivität von Lipasen oder Esterasen.^[43]

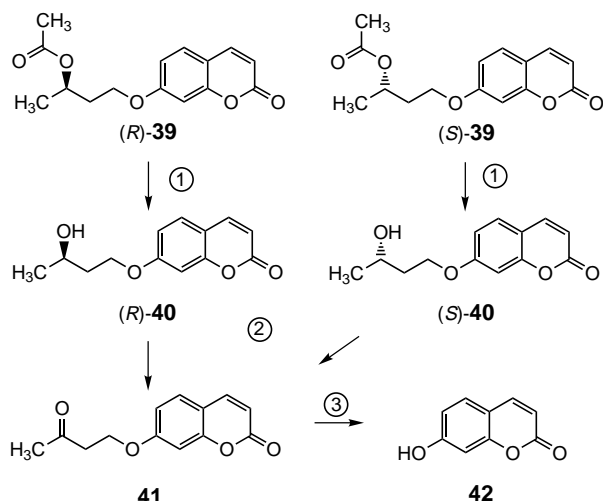
verschiedenen Wellenlängen (410 bzw. 570 nm) bequem verfolgen. Gleiches wird mit (*R*)-**34/35** durchgeführt. Obwohl dies eine genauere Bestimmung des *E*-Wertes ermöglicht, weist die Methode den gleichen Nachteil auf wie unser System, die Notwendigkeit, den *p*-Nitrophenylester der chiralen Säure einzusetzen.^[43] Dessen ungeachtet sollte eine geeignete Automatisierung einen Durchsatz von mehreren tausend Proben pro Tag ermöglichen.

Später schlug Kazlauskas einen zweiten Test vor, der darauf beruht, dass die Hydrolyse zu einer Änderung des Säuregehalts führt.^[44] Durch Verwendung eines Puffers (*N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure) und eines pH-Indikators (*p*-Nitrophenol) mit gleichem pK_a -Wert wurde eine lineare Korrelation zwischen der Menge der freigesetzten Säure und dem Grad der Protonierung des Indikators hergestellt. In diesem Fall wurden die beiden enantiomeren Ester getrennt paarweise ähnlich unserem Test^[17] eingesetzt, und die Farbänderung infolge der Protonierung wurde in beiden Fällen kolorimetrisch verfolgt. Noch ist unklar, wie allgemeingültig und wie genau diese Methode wirklich ist, denn später wurde festgestellt, dass in einigen Fällen deutliche Unterschiede zwischen den so erhaltenen und den in Kontrollexperimenten konventionell gemessenen *E*-Werten bestehen.^[45]

In der Folgezeit wurden weitere verwandte kolorimetrische Hochdurchsatz-Tests für enantioselektive Enzyme beschrieben.^[46] Diese und die hier behandelten Systeme sind nicht auf die Bewertung enantioselektiver Enzyme beschränkt, da jeder enantioselektive Katalysator einem solchen Screening zugänglich sein sollte. Allerdings erfordern die meisten Systeme eine chromophore Einheit, sodass sich die evolutionäre Entwicklung eines Enzyms oder die kombinatorische Optimierung eines Übergangsmetallkatalysators auf Reaktionen beschränkt, deren Substrate durch Einbau eines Chromophors modifiziert wurden und somit nicht zu den üblicherweise in Reaktionen im Labor- oder Industriemaßstab eingesetzten Verbindungen zählen.

3.2. Fluoreszenz-Assays

Ein großer Vorteil der auf Fluoreszenz beruhender Tests ist die hohe Empfindlichkeit auch bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen und extrem kleinen Katalysatormengen.^[47] Dies ist nicht immer notwendig, aber in einigen Fällen können die Bedingungen nicht abgeändert werden, z.B. bei der Untersuchung katalytischer Antikörper in Zellkulturen. Raymond hat einen einfachen und praktischen Fluoreszenztest für die hydrolytische kinetische Racematspaltung chiraler Acetate wie **39** entwickelt (Schema 14).^[48] Dieser Test beinhaltet zwei enzymatische Schritte, die ein Paar enantiomerer

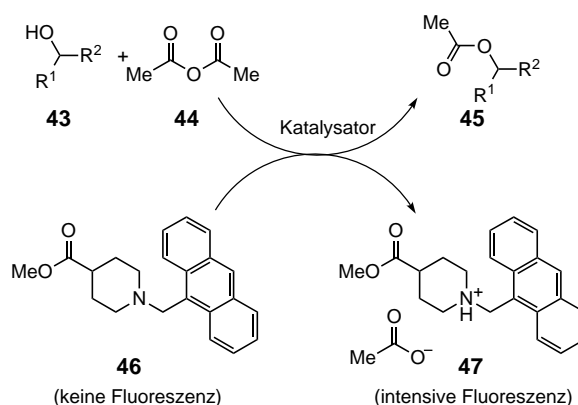


Schema 14. Fluoreszenz-Test zur Bestimmung der Enantioselektivität von katalytischen Esterhydrolysen.^[48]

Alkohole, die bei der untersuchten asymmetrischen Hydrolyse gebildet werden (z.B. (*R*)- und (*S*)-**40**), in ein fluoreszierendes Produkt (z.B. **42**) umwandeln. Im ersten Schritt werden die Substrate (*R*)- und (*S*)-**39** getrennt der hydrolytischen Reaktion unterzogen. Die Umwandlung wird durch eine Enzymmutante (Lipase oder Esterase), einen katalytischen Antikörper oder im Prinzip auch einen synthetischen Katalysator, der mit dem System kompatibel ist, katalysiert. Ziel des Tests ist die Messung der Enantioselektivität einer solchen kinetischen Racematspaltung. Die relative Menge an (*R*)- und (*S*)-**40**, die nach einer gegebenen Reaktionszeit gebildet wurde, ist ein Maß für die Enantioselektivität und kann schnell, aber nicht direkt, ermittelt werden. Folgende chemische Umwandlungen sind notwendig. Im zweiten Schritt werden die enantiomeren Alkohole (*R*)- und (*S*)-**40** getrennt mit Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (HLDH) zum Keton **41** oxidiert, aus dem das fluoreszierende Endprodukt Umbelliferon **42** jeweils durch die katalytische Wirkung von Rinderserumalbumin (BSA) freigesetzt wird. Durch getrennte Messung der Fluoreszenz von **42** für das (*R*)- und das (*S*)-Substrat ist es somit möglich, die relativen Mengen von (*R*)- und (*S*)-**40** zu bestimmen. Die Autoren testeten 30 Esterasen und Lipasen und verfolgten die Geschwindigkeit der Freisetzung von **42** in den Vertiefungen einer Standard-Mikrotiterplatte anhand der Fluoreszenz.^[48] Durch Kontrollexperimente wurde sichergestellt, dass die

scheinbare Geschwindigkeit der Freisetzung von Umbelliferon direkt proportional zur Geschwindigkeit der Esterhydrolyse ist. Die so ermittelten und in Kontrollversuchen überprüften *E*- und *ee*-Werte (Standardanalyse mittels HPLC an einer chiralen Phase) lagen im Bereich von $\pm 20\%$. Nur in einem Fall wurde eine größere Abweichung beobachtet, was vermutlich an der ungewöhnlich niedrigen Michaelis-Konstanten K_M eines der Enantiomere lag. Da der Test auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen durchgeführt werden kann, sollte ein hoher Durchsatz möglich sein. Allerdings weist auch diese Methode den bereits genannten inhärenten Nachteil aller kolorimetrischen Tests auf: Die Optimierung eines potentiellen Katalysators ist auf Substrate wie **39** beschränkt, die durch den Einbau einer Sonde, in diesem Fall der fluorogenen Einheit **42**, verändert wurden.

Von Miller stammt eine neue Fluoreszenz-Methode, um die Aktivität von Katalysatoren in Acylierungen zu untersuchen.^[49] Da es im Prinzip möglich sein sollte, diese Methode auf die Bestimmung von Enantioselektivitäten auszuweiten, beschreiben wir sie hier detailliert. Die zugrunde liegende Idee beinhaltet die Verwendung einer molekularen Sonde, die bei der Bildung eines Produktes fluoresziert (Schema 15). In Vorversuchen wurde Isopropanol **43** ($R^1 = R^2 = \text{CH}_3$) mit



Schema 15. Fluoreszenz-Screeningsystem für die Bewertung von Acylierungskatalysatoren.^[49]

Essigsäureanhydrid **44** in Gegenwart der nichtfluoreszierenden Chemosonde **46** umgesetzt. Ohne einen Katalysator trat keine Fluoreszenz auf. Mit bekannten Katalysatoren wie Dimethylaminopyridin (DMAP) oder Piperidinopyridin (PPY) wurde eine intensive Fluoreszenz festgestellt, die darauf beruht, dass die Chemosonde durch die freigesetzte Essigsäure unter Bildung von **47** protoniert wird. Die weitergehenden Arbeiten wurden dann mit diesen und anderen Katalysatoren durchgeführt. Dazu gehörten modular aufgebaute Tetrapeptide, die zuvor von den Autoren in der Acylierung eines racemischen chiralen Alkohols eingesetzt worden waren.^[49] Sieben Katalysatoren wurden in drei Konzentrationen zu Lösungen des Substrats in Toluol in den Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte gegeben, und jede Reaktion wurde zweimal wiederholt, sodass insgesamt 63 Experimente resultierten. Die Reaktionen wurden über 30–40 Minuten mittels eines Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegeräts verfolgt; die Ergebnisse waren in ausgezeichneter

Übereinstimmung mit den durch Standardkinetiken erhaltenen Ergebnissen von Kontrollexperimenten. Interessanterweise bestand im Fall der enantioselektiven chiralen Tetrapeptid-Katalysatoren eine Korrelation zwischen der absoluten Geschwindigkeit und dem traditionell bestimmten Grad der asymmetrischen Induktion.^[49] In diesem Sinn kann das System als Assay zur *ee*-Wert-Bestimmung aufgefasst werden. Es kann allerdings nicht einfach auf andere Substrate und/oder Katalysatoren übertragen werden. Die Bestimmung von *E*- und *ee*-Werten sollte jedoch, wie noch praktisch zu zeigen sein wird, dadurch möglich sein, dass die Tests auf der Mikrotiterplatte für das (*R*)- und das (*S*)-konfigurierte Substrat getrennt durchgeführt werden, wie in unserem UV/Vis-Assay^[17] (Abschnitt 3.1).

Miller et al. konnten zeigen, dass ihr Aktivitätstest für das Echtzeit-Simultanscreening von kombinatorischen One-bead/one-compound-Bibliotheken verwendet werden kann.^[49] In dieser interessanten Variante wurden die Aminomethylantracen-Sonde und der modular aufgebaute Tetrapeptidkatalysator mittels Festphasensynthese an einen Träger gebunden. Indem Serien von Kügelchen den Reaktionsbedingungen ausgesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die relativen Fluoreszenzintensitäten, die durch Fluoreszenzmikroskopie gemessen wurden, mit den relativen Reaktionsgeschwindigkeiten, die zuvor in Lösung mit Standardverfahren ermittelt wurden, korrelierten. Dieser Ansatz, entsprechend modifiziert und erweitert, könnte ein beträchtliches Potential für das Hochdurchsatz-Screening enantioselektiver Acylierungskatalysatoren haben.

In Fortsetzung seiner Arbeiten über Fluoreszenztests hat Raymond ein Katalysator-Screeningsystem entwickelt, das Antikörpersonden verwendet.^[50] Obwohl es noch nicht auf enantioselektive Prozesse zugeschnitten ist, erscheint dieses System sehr viel versprechend. Es beruht auf einer Idee, die von Green und Mitarbeitern^[51] entwickelt wurde, die zeigten, dass katalytische Aktivität durch Immunoassays wie in gewöhnlichen ELISAs (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt werden kann. Der catELISA, wie er jetzt genannt wird, wurde von Raymond verwendet, um die Hydrolyse eines Esters auf einem festen Träger zu verfolgen,^[50] ein Vorgehen, dass auch von Hilvert in seinen Arbeiten über Antikörper-katalysierte Diels-Alder-Reaktionen^[52] angewandt und weiterentwickelt wurde. Das Substrat wird zunächst an einen festen Träger gebunden, der dann einer Lösung ausgesetzt wird, die potentielle Katalysatoren enthält. Nach einer ausreichenden Reaktionszeit wird die Testlösung gewaschen und das Produkt quantitativ mittels ELISA analysiert, wobei ein produktspezifischer polyklonaler Kaninchenantikörper zum Einsatz kommt. Während im ursprünglichen catELISA eine chromophore Gruppe vonnöten ist, benutzte Raymond eine aus einem produktspezifischen Antikörper aufgebaute Sonde, die fest an ein Produktanalogon gebunden ist. Letzteres ist mit einem empfindlichen Fluoreszenzmarker (Acridon) versehen.^[50] Das System ist für eine Durchführung auf Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Vertiefungen geeignet und ermöglicht einen hohen Durchsatz. Interessant ist die Frage, ob das Konzept auf die quantitative Bewertung enantioselektiver Prozesse erweitert werden kann.

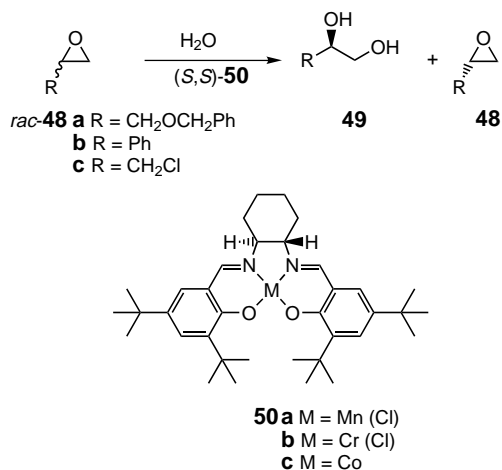
Ein anderer Zugang zu Fluoreszenz-*ee*-Assays ist theoretisch mit fluoreszenzaktiven Sonden möglich, die zwischen Enantiomeren unterscheiden können. Das Prinzip ist seit einiger Zeit bekannt, wenn sich auch die erforderlichen Effekte, hohe Fluoreszenzintensität (oder -löschung) und effiziente Enantiomererkennung, als sehr klein herausstellten.^[53] Trotzdem wurde eine Abhängigkeit zwischen den Fluoreszenzeigenschaften und der Enantiomerenreinheit festgestellt. Ein Beispiel wurde von Mattay beschrieben, der 2,2'-Dihydroxy-1,1'-binaphthyl (BINOL) **25** (siehe Schema 8) als schwach fluoreszierende Sonde in der chiralen Unterscheidung von Aminen verwendete, die bei entsprechender Wechselwirkung die Fluoreszenz löschen.^[53a] Wir haben eine sehr fluoreszenzstarke Sonde entwickelt, die ungewöhnlich effizient Enantiomere unterscheiden kann: die helicale Verbindung [2,15]-Dihydroxyhexahelicen.^[54] Wie anhand der Fluoreszenzlöschung ermittelt, ist die chirale Unterscheidung zwischen enantiomeren Aminen und Aminoalkoholen ausgesprochen groß. Es bleibt abzuwarten, ob daraus ein Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsystem entwickelt werden kann. Schließlich sei darauf hingewiesen, dass die Fluoreszenz auch zur Detektion in der Chromatographie Anwendung findet (siehe Abschnitt 3.6).

3.3. IR-thermographische Assays

Alle Gegenstände emittieren Infrarotstrahlung (Schwarzkörperstrahlung), ein Vorgang, der mit modernen photovoltaischen IR-Kameras, die mit einem Focal-plane-array (FPA)-Detektor ausgestattet sind, detektiert werden kann.^[55] Das so erhaltene Bild ist ein zweidimensionales Wärmebild, das nichts anderes ist als eine räumliche Kartierung der Temperatur- und Emissivitätsverteilung aller Gegenstände auf dem Bild. Es ist üblich, in den Bildern verschiedene Farben zu verwenden, um unterschiedliche Photonenintensitäten der aufgenommenen Infrarotstrahlung zu visualisieren, z. B. zeigen rote Gebiete „heiße Zonen“ (hot spots) an, blaue Gebiete bedeuten „kalte Zonen“ (cold spots). Die Technik wurde zuerst von Pawlicki^[56] verwendet, um die Dynamik von Reaktionen auf Festkörperoberflächen zu verfolgen, und wurde von Sermon^[57] weiterentwickelt, um Temperaturprofile exothermer, von SiO₂-geträgerten Platinteilchen katalysierter Gasphasenreaktionen zu erhalten. Der erste Fall eines parallelen Aktivitätstests der Mitglieder einer kleinen Katalysatorbibliothek wurde 1996 von Moates^[58] beschrieben. Zwei Jahre später zeigte Morken, dass die Aktivität von Acylierungskatalysatoren auf Trägern, die durch die Split-and-pool-Methode erhalten wurden, IR-thermographisch detektiert werden kann, vorausgesetzt, die Kügelchen schwimmen auf der Oberfläche der Lösung, die den Alkohol und das Acylierungsmittel enthält.^[59] Ungefähr zur selben Zeit berichteten Maier et al. über einen weiteren konzeptionellen Fortschritt,^[60] die emissivitätskorrigierte IR-Thermographie großer Bibliotheken heterogener Katalysatoren, eine Technik, die nur sehr kleine Katalysatormengen erfordert (<200 µg). Der Hauptzweck dieser Studie war es, Temperaturunterschiede, die allein auf der katalytischen Aktivität von Katalysatoren beruhen, zu visualisieren. Dies wurde erreicht,

indem das Detektorsignal linear korrigiert wurde und das IR-Bild der Bibliothek kurz vor dem Start als Hintergrund von den Bildern während der Katalysatorexperimente subtrahiert wurde. Damit sind räumliche Emissivitätsunterschiede nicht mehr sichtbar, sodass ausschließlich die Wärmeentwicklung aufgrund der katalytischen Reaktionen auf einer Mikrotiterplatte verlässlich detektiert werden kann. Dies wurde erfolgreich auf große Bibliotheken heterogener Katalysatoren in Gasphasenhydrierungen und -oxidationen angewandt.^[60] Jedoch steht eine Quantifizierung hier, wie auch bei anderen IR-thermographischen Untersuchungen, noch aus.

In unseren eigenen Bemühungen, die auf die Entwicklung von Hochdurchsatz-Screeningsystemen für die Bewertung der Enantioselektivität abzielten, fassten wir die Anwendung der IR-Thermographie in der kinetischen Racematspaltung chiraler Substrate ins Auge.^[61] Es war jedoch nicht sicher, ob die IR-Thermographie überhaupt auf homogene Lösungen angewandt werden kann, da sich diese Frage vorher nie gestellt hatte. Unter Verwendung einer AIM-256²-IR-Kamera, die mit einem PtSi-FPA-Detektor und einer Germaniumlinse ausgestattet ist, machten wir uns daran, dieses Konzept zu testen, indem wir die hydrolytische kinetische Racematspaltung chiraler Epoxide **48** untersuchten, die in homogener Lösung in wasserhaltigem Toluol durch den Jacobsen-Komplexe **50**^[62] katalysiert wird (Schema 16).^[61] Nach einigem



Schema 16. Hydrolytische kinetische Racematspaltung der Epoxide **48** mit dem Jacobsen-Katalysatoren **50**. Screening mittels IR-Thermographie.^[61]

Experimentieren bezüglich der optimalen Materialien^[63] entwickelten wir eine spezielle Mikrotiterplatte, die eine effiziente Wärmeübertragung sicherstellt und die geschüttelt werden kann, um so eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Ein kommerziell erhältlicher Eppendorf-Thermomixer wurde dazu so modifiziert, dass das Oberteil durch eine Aluminiumplatte mit Vertiefungen ersetzt wurde, in die zylindrische Glasgefäße mit ungefähr 8 mm Durchmesser und 35 mm Höhe platziert wurden (Abbildung 5). So konnte die gesamte Mikrotiterplatte geschüttelt werden, um die Durchmischung der Reaktionslösungen in jedem Gefäß zu gewährleisten.

Da der Einsatz eines Racemats lediglich Informationen über die Gesamtaktivität des Katalysators liefern würde,



Abbildung 5. Kommerziell erhältlicher Eppendorf-Schüttler mit modifizierter Aluminiumplatte, auf welche die Mikrotiterplatte gesetzt wird (zur besseren Verdeutlichung ist die halbe Aluminiumplatte unbedeckt).^[61, 63]

wurden die (*S*)- und (*R*)-Enantiomere paarweise in getrennten Gefäßen der Mikrotiterplatte getestet. Das ist derselbe Trick, den wir in unserem UV/Vis-gestützten Screeningsystem (Abschnitt 3.1) angewandt hatten.^[17] Im vorliegenden Fall haben wir auch das Racemat untersucht. Nachdem wasserhaltige Toluollösungen des Katalysators (*S,S*)-**50** in die Gefäße der Mikrotiterplatte gefüllt worden waren, wurden (*R*)- und (*S*)-Epichlorhydrin, (*R*)- und (*S*)-**48c**, hinzugefügt und die Temperatur im Bereich 24–39 °C eingestellt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von Wasser gestartet. Nach einer gewissen Zeit wurde das Schütteln für 10 s unterbrochen, 500 IR-thermographische Bilder wurden aufgenommen und deren Mittelwert wurde als Bild ausgegeben. Die zeitaufgelösten Ergebnisse (Abbildung 6) zeigen zum ersten Mal, dass zum einen die IR-Thermographie benutzt werden kann, um die Wärmeentwicklung einer Reaktion in homogener Lösung zu detektieren, und dass zum anderen ein hoch enantioselektiver Katalysator tatsächlich identifiziert werden kann.^[61] So wies der Cobaltkomplex (*S,S*)-**50c** die höchste Katalysatoraktivität und -selektivität auf; er reagiert enantioselektiv mit dem Epoxid (*S*)-**48c**. Der Chromkatalysator (*S,S*)-**50b** ist ebenfalls selektiv, wenn auch weniger aktiv, während der Mangankomplex (*S,S*)-**50a** keine signifikante Aktivität aufweist. Das stimmt mit den Resultaten von Jacobsen et al. überein, die bei Reaktionen im Labormaßstab Benzoessäure als Nucleophil eingesetzt hatten.^[62] Man kann auch sehen, dass im Fall des Cobaltkomplexes die Wärmeentwicklung für die Reaktion von (*S*)-**48c** und *rac*-**48c** nach sieben Minuten so stark ist, dass visuell kein signifikanter Unterschied mehr im verwendeten Temperaturfenster (1 Grad) detektiert werden kann. Deshalb wurde das Temperaturfenster auf 10 Grad vergrößert, sodass die „heißeste“ Reaktion nun eindeutig identifiziert werden konnte (vgl. Abbildung 6 e und 6 f).^[61]

Mit dem Cobaltkatalysator (*S,S*)-**50c** wurde darüber hinaus ein Substratscreening durchgeführt, bei dem die chiralen

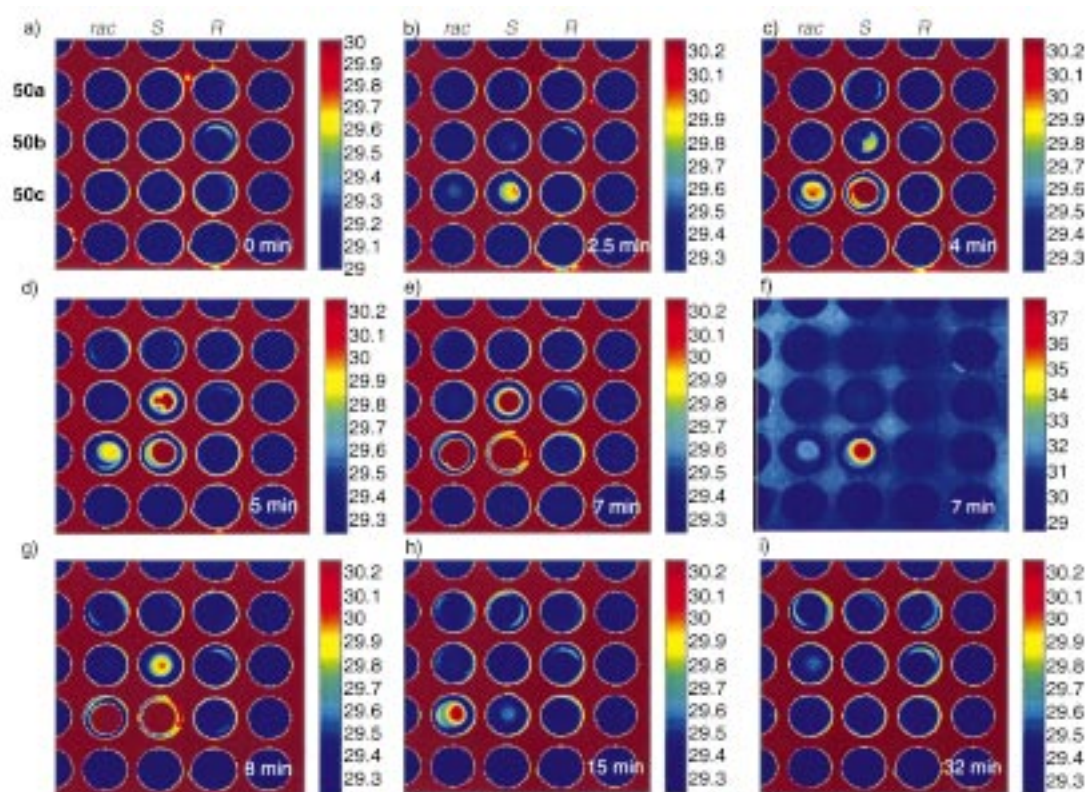
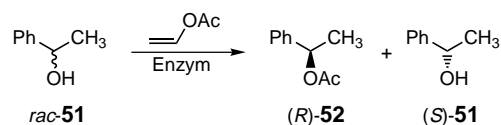


Abbildung 6. Zeitaufgelöste IR-thermographische Bilder der enantioselektiven Hydrolyse des Epoxids **48c**, katalysiert durch (*S,S*)-**50a–c** nach a) 0, b) 2.5, c) 4, d) 5, e) 7, g) 8, h) 15 und i) 32 min.^[61] In f) ist das gleiche Bild wie in e) dargestellt, das Temperaturfenster erstreckt sich hier aber über 10 Grad. Die Balken auf der äußeren rechten Seite jedes Bildes sind der Temperatur/Farb-Schlüssel zum verwendeten Temperaturfenster [°C].

Epoxide **48a–c** parallel untersucht wurden. Es stellte sich heraus, dass (*S*)-**48a** das reaktivste Substrat ist, gefolgt von (*S*)-**48c** und (*R*)-**48b**. Die relative Reaktivität von (*R*)-**48b** und (*S*)-**48c** entspricht der von Jacobsen in Reaktionen im Labormaßstab festgestellten,^[62] während die Reaktion von (*S*)-**48a**, die im Screening die schnellste war, zuvor nicht beschrieben worden war. Die IR-thermographischen Bilder liefern also ein interessantes chemisches Ergebnis.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde eine enantioselektive enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung durch zeitaufgelöste IR-thermographische Detektion visualisiert.^[61] In diesem Fall wurde das Enzym (die Lipase aus *Candida antarctica*) in immobilisierter Form, d. h. als heterogener Biokatalysator, in die Gefäße der Mikrotiterplatte gegeben. Mit (*R*)- und (*S*)-1-Phenylethanol, (*R*)- und (*S*)-**51**, als Substrat und Vinylacetat als Acylierungsmittel wurde nachgewiesen, dass die Reaktion hoch *R*-selektiv ist (Schema 17): Heiße Zonen traten bei den Gefäßen der Mikrotiterplatte auf, die (*R*)-**51** enthielten. Das ist in perfekter Übereinstimmung mit den Literaturdaten, denen zufolge bei 50 % Umsatz der *ee*-Wert der acylierten Form > 99 %



Schema 17. Enzymatisch katalysierte kinetische Racematspaltung des Alkohols **51**. Screening mittels IR-Thermographie.^[61]

zugunsten von (*R*)-**52** beträgt.^[64] Kürzlich haben wir diesen speziellen Test etwas tiefergehend studiert, indem wir eine IR-Kamera mit noch höherer Auflösung verwendeten.^[65]

Die IR-Thermographie ist ein ausgezeichnetes Werkzeug für die Hochdurchsatz-Identifizierung sehr aktiver und enantioselektiver Katalysatoren. Die Methode erlaubt es, solche „Treffer“ von anderen Mitgliedern einer Katalysatorbibliothek zu unterscheiden, die weitaus weniger aktiv oder enantioselektiv sind. Eine Quantifizierung steht allerdings noch aus. Daher können geringfügige Unterschiede in der Enantioselektivität, wie sie bei den sequentiellen Runden der Enzymmutagenese (siehe Schema 1) auftreten, (noch) nicht IR-thermographisch detektiert werden. Eine andere inhärente Beschränkung dieser Methode besteht darin, dass thermoneutrale Reaktionen, sofern spezielle Effekte wie die Bildung von Gasen ausbleiben, nicht verfolgt werden können. Endotherme Prozesse hingegen geben in den IR-Bildern „kalte Zonen“.^[66] Obwohl dieser interessante Effekt noch nicht bei einem enantioselektiven Prozess nachgewiesen wurde, konnte er bei der Suche nach aktiven Olefinmetathese-Katalysatoren genutzt werden, die sich auf Mikrotiterplatten als „kalte Zonen“ identifizieren ließen.^[66]

3.4. Circular dichroismus-Assays

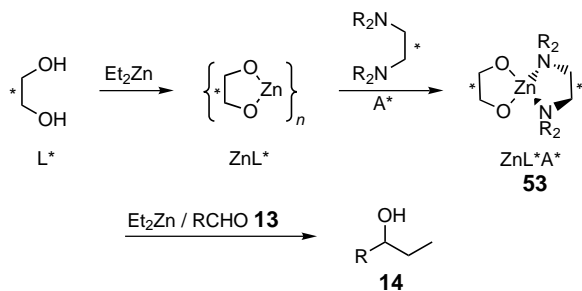
Es sollte prinzipiell möglich sein, die HPLC^[6] in der Hochdurchsatz-Bestimmung der Enantiomerenreinheit ein-

zusetzen, vorausgesetzt, dass eine effiziente Trennung der Enantiomere durch eine chiral modifizierte Säule in einer vernünftigen Zeit gelingt. Da eine schnelle Trennung in der Regel eine große Herausforderung darstellt, besteht eine Alternative darin, normale Säulen zu verwenden, mit denen lediglich die Ausgangsverbindungen von den enantiomeren Produkten abgetrennt werden. Der Enantiomerenüberschuss (*ee*) der Enantiomerenmischung wird dann durch Circular-dichroismus(CD)-Spektroskopie bestimmt. Dieses Prinzip wurde 1980 erstmals von Mason^[67] verwirklicht und von Salvadori^[68] und Mannschreck^[69] auf eine breite Basis gestellt. Wie Mikami gezeigt hat, kann die Methode zum Screening von kombinatorisch erhaltenen enantioselektiven Katalysatoren verwendet werden.^[70] Dazu wird ein empfindlicher HPLC-Detektor verwendet, der parallel den Circular-dichroismus ($\Delta\epsilon$) und die UV-Absorption (ϵ) einer Probe bei einer bestimmten Wellenlänge in einem Durchflusssystem misst.^[67–70] Das CD-Signal hängt nur von der Enantiomerenzusammensetzung der chiralen Produkte ab, während die Absorption deren Konzentration widerspiegelt. Damit sind nur kurze HPLC-Säulen notwendig.^[67–69] Wird der CD-Wert auf die Absorption normiert, erhält man den so genannten Anisotropiefaktor *g* [Gl. (1)].^[67]

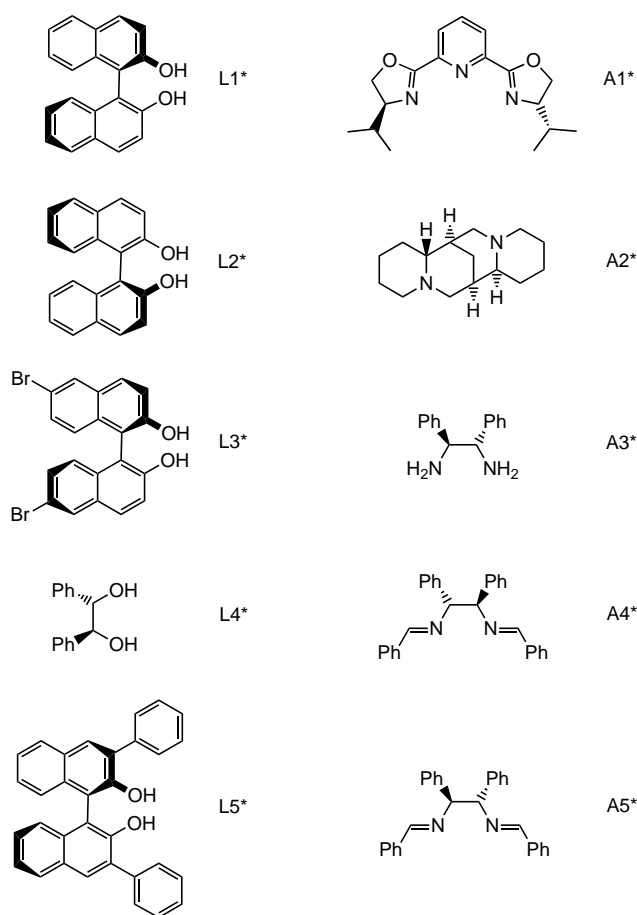
$$g = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon} \quad (1)$$

Der *ee*-Wert einer Enantiomerenmischung kann somit ohne Zuhilfenahme einer umständlichen Kalibrierung bestimmt werden. Es wurde wiederholt betont, dass diese Methode theoretisch nur dann anwendbar ist, wenn der *g*-Faktor konzentrationsunabhängig ist und linear vom *ee*-Wert abhängt.^[67–70] Diese Bedingungen sind nicht gegeben, wenn die chiralen Verbindungen Dimere oder Aggregate bilden, weil solche enantiomeren oder diastereomeren Spezies selbst CD-Signale geben würden. Zwar wurde über solche Fälle noch nicht berichtet, doch muss diese Möglichkeit vor der Untersuchung eines jeden neuen Systems ausgeschlossen werden.

Mikami et al. haben mehrere Bibliotheken chiraler Liganden und Aktivatoren bei der Addition von Et₂Zn an Aldehyde untersucht (Schema 18).^[70] Zunächst wurde die kombinatorische Bibliothek aus chiralen Liganden L1*–L5* und chiralen Aktivatoren A1*–A5* (Schema 19) untersucht, um die Leitstruktur für die nächste Generation chiraler Liganden und Aktivatoren zu optimieren. Die besten Kombinationen waren L5*/A4* und L5*/A5*, mit denen mit



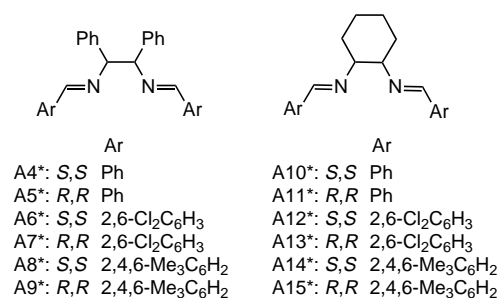
Schema 18. Addition von Et₂Zn an die Aldehyde **13**, katalysiert durch chirale Zn-Diolate in Gegenwart chiraler Diamine.^[70] Screening mittels CD-Messungen.



Schema 19. Chirale Dirole als Liganden und Diaminverbindungen als Zusätze in der Addition von Et₂Zn an die Aldehyde **13**.^[70]

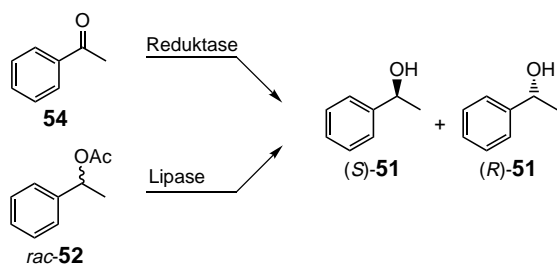
Benzaldehyd *ee*-Werte von bis zu 65% erhalten wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine neue Bibliothek untersucht, die aus chiralen Diimininen als Aktivatoren bestand (Schema 20).^[70] Als beste Kombination erwies sich L5*/A9* (*ee* = 90% bei Raumtemperatur und 99% bei –78 °C mit Benzaldehyd und *ee* = 92–99% mit anderen Aldehyden). Zwar wurden nur ein paar Dutzend Reaktionen mit einem JASCO-CD-995-Instrument verfolgt, doch dürfte der CD-Test für das Hochdurchsatz-Screening enantioselektiver Katalysatoren geeignet sein.

Unabhängig von der Veröffentlichung von Mikami^[70] berichteten wir über ein verwandtes System.^[71,72] In unserer



Schema 20. Chirale Dialdimine als Zusätze in der Addition von Et₂Zn an die Aldehyde **13**.^[70]

Arbeit zur gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme mussten wir schnelle und effiziente Wege entwickeln, die Enantiomerenreinheit von Alkoholen zu bestimmen, die enzymatisch entweder durch Reduktase-katalysierte Reduktion der prochiralen Ketone (z.B. **54**) oder durch Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung entsprechender *rac*-Acetate (z.B. *rac*-**52**) zugänglich sind (Schema 21). In beiden Fällen ist der Edukt **54** flüssigkeitschromatographisch vom Produkt (*S*)/(*R*)-**51** abgetrennt werden, im letzten Fall (*S*)/(*R*)-**51** von (*S*)/(*R*)-**52**.



Schema 21. Reduktase-katalysierte Reduktion des Ketons **54** und Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung des Acetats **52**. Screening mittels CD-Messungen.^[71]

Da Acetophenon **54** bei ca. 260 nm einen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten aufweist als 1-Phenylethanol **51**, war die Trennung der Ausgangsverbindungen vom Produkt unabdingbar; sie wurde auf einer relativ kurzen Umkehrphasen-HPLC-Säule bewerkstelligt. In ersten Experimenten wurde unter Verwendung des reinen Produkts **51** der maximale Wert des CD-Signals ermittelt.^[71] Mischungen von **51** mit verschiedenen Enantiomerenverhältnissen (*ee*-Werten) wurden hergestellt und zur Kontrolle mittels GC an chiraler Phase genau analysiert. Dieselben Proben wurden mittels CD untersucht, wobei eine Reihe von *g*-Werten erhalten wurde. Bei der Auftragung der *g*- gegen die *ee*-Werte wurde eine lineare Abhängigkeit mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.99995$ erhalten, die sich durch die einfache Gleichung (2) beschreiben lässt.

$$ee = 3176.4g - 8.0 \quad (2)$$

Dann haben wir die mögliche Abhängigkeit des *g*-Faktors von der Konzentration untersucht.^[71] Eine Lösung von (*S*)- und (*R*)-**51** mit *ee* = 20 % wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ in Acetonitril hergestellt und dann schrittweise verdünnt. Abbildung 7 zeigt eindeutig, dass *g* nicht von der Konzentration abhängt (Standardabweichung 2.6 %). Daher ist eine Aggregation aufgrund möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei oder mehr Molekülen des Produkts (*S*)- und (*R*)-**51**, die zu Artefakten führen könnte, in diesem Medium auszuschließen, und das System kann mittels CD-Messungen analysiert werden.

Die Frage, ob ein Hochdurchsatz-Screening des obigen Reaktionssystems tatsächlich in die Praxis umgesetzt werden kann, wurde nun auf das Problem einer effizienten und schnellen Trennung von **54** und (*S*)/(*R*)-**51** zurückgeführt. Obwohl keine vollständige Optimierung durchgeführt wurde,

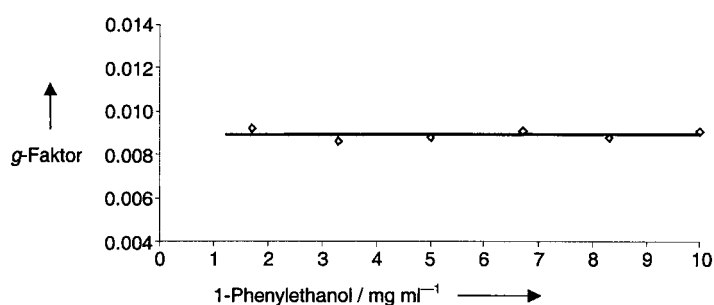


Abbildung 7. Abhängigkeit des *g*-Faktors von der Konzentration in einer Mischung aus (*S*)- und (*R*)-**51** (*ee* = 20 %).^[71]

ließ sich die Trennung mit Umkehrphasen-Kieselgel als Säulenmaterial und Methanol/Wasser (47/53) als Eluent problemlos durchführen. Angesichts der Ergebnisse zur Abhängigkeit des *g*-Faktors von der Konzentration (siehe oben) kann eine Aggregation in diesem protischen Medium ausgeschlossen werden. Abbildung 8 zeigt das entsprechende HPL-Chromatogramm, das Gemisch ist in weniger als 1.5 Minuten vollständig getrennt. Unter Verwendung eines JASCO-CD-1595-Instruments und eines automatischen Probengebers können so 700–900 genaue *ee*-Bestimmungen pro Tag durchgeführt werden.^[71, 72]

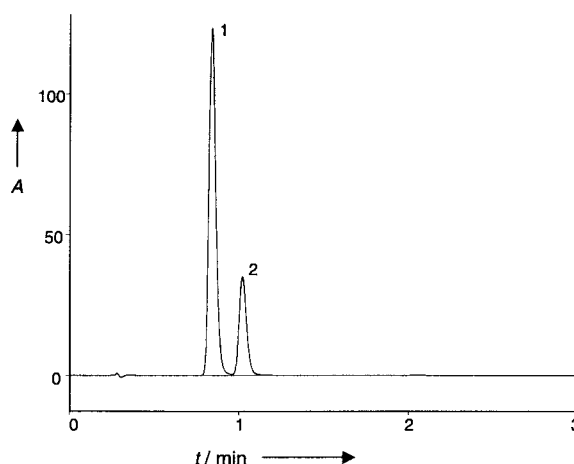
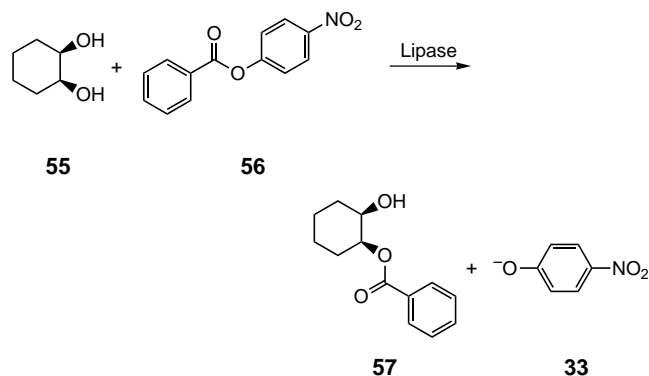


Abbildung 8. HPLC-Chromatogramm einer Mischung aus **54** (Peak 1) und (*S*)/(*R*)-**51** (Peak 2).^[71]

Schließlich möchten wir darauf hinweisen, dass verlässliche *ee*-Wert-Bestimmungen mit CD-Assays in bestimmten Systemen theoretisch sogar ohne vorherige flüssigchromatographische Trennung möglich sind.^[71–73] Voraussetzung ist ein prochirales Substrat (z.B. eine *meso*-Verbindung) sowie ein UV-aktives Produkt (Chromophor), das in dem Maß gebildet wird wie die enantioselektive Reaktion voranschreitet. Das Absorptionsmaximum des gebildeten Chromophors muss beträchtlich von dem des gewünschten chiralen Produkts abweichen. Dieses neue Prinzip wird anhand der Lipase-katalysierten enantioselektiven Acylierung des *meso*-Diols **55** mit Benzoesäure-*p*-nitrophenylester **56** unter Bildung des chiralen Produkts **57** und des gelben *p*-Nitrophenolats **33** mit einer charakteristischen UV/Vis-Absorption bei 410 nm illustriert (Schema 22). Mit der Messung des *g*-Werts am



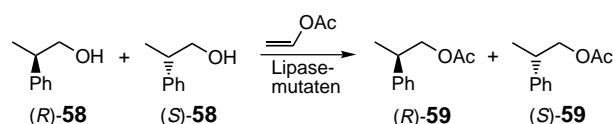
Schema 22. Lipase-katalysierte asymmetrische Acylierung des *meso*-Diols **55**. Screening mittels CD-Messungen.^[71–73]

Absorptionsmaximum von **57** und der zusätzlichen UV-Absorption von **33** sind alle Informationen zur Bestimmung des Umsatzes und der Enantiomerenreinheit zugänglich, *ohne* dass es einer LC-Trennung bedarf. Der Vorteil dieses neuen Ansatzes besteht in der Einfachheit der Durchführung und der begründeten Aussicht auf höheren Durchsatz.^[71–73]

Auf der Grundlage dieser und früherer Arbeiten können wir festhalten, dass in Einzelfällen bereits die HPLC-UV-CD- oder die UV-CD-Methode als Hochdurchsatz-Screeningsystem für enantioselektive (Bio-)Katalysatoren geeignet sein kann. Der Erfolg wird vom jeweiligen Substrat der Untersuchung abhängen und davon, ob die oben genannten Voraussetzungen erfüllt sind.

3.5. Chromatographische Assays

Mit konventioneller GC oder HPLC an chiralen stationären Phasen können nur ein paar Dutzend *ee*-Bestimmungen pro Tag bewerkstelligt werden.^[5, 6] Wir haben hingegen vor kurzem gezeigt, dass die GC so modifiziert werden kann, dass in bestimmten Fällen etwa 700 genaue *ee*- und *E*-Bestimmungen pro Tag möglich sind.^[74] Fallstudie war die Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung des chiralen Alkohols (*R*)/(*S*)-**58** unter Bildung der acylierten Form (*R*)/(*S*)-**59** (Schema 23). Tausende Mutanten der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* wurden durch epPCR^[17] für die Anwendung als Katalysator in der Modellreaktion hergestellt.^[72]



Schema 23. Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung des Alkohols **58**. Screening mittels GC.^[72, 74]

Um einen vernünftig hohen Durchsatz zu erreichen, wurden zwei GC-Säulen in einem Aufbau vereint. Im ersten Ansatz wurden zwei Säulen in einem GC-Ofen eingesetzt.^[72, 74] Es stellte sich jedoch heraus, dass dies mit einigen Nachteilen verbunden war. Der erfolgreiche Aufbau besteht aus zwei GC-Geräten,^[75] einem Prep-and-load(PAL)-Proben-

geber^[76] und einem PC (Abbildung 9). Die Geräte sind über einen standardisierten Datenbus (HP-IB)^[75] mit dem PC verbunden, der den Druck, die Temperatur etc. kontrolliert und auch die Messwerte des Detektors verarbeitet. Der Aufbau besteht weiterhin aus einer Waschstation sowie einem

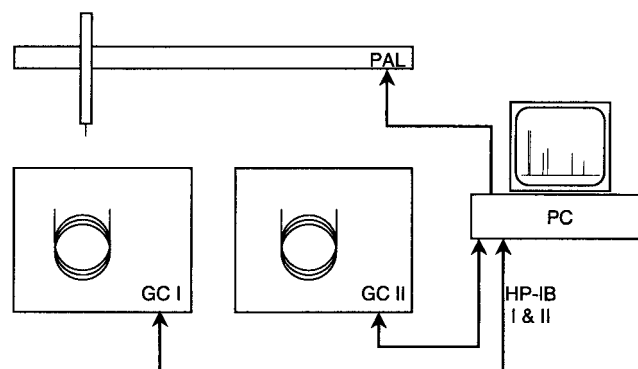


Abbildung 9. Schematische Darstellung eines aus zwei GC-Geräten aufgebauten GC-Screeningsystems.^[74]

Schubladensystem mit maximal acht Mikrotiterplatten. Mit einer eigens entwickelten Konstruktion war der Probengeber so angebracht worden, dass er beide Injektoren erreichen kann. Da der Probengeber Proben aus Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Gefäßen injizieren kann, können über 3000 Proben ohne manuelles Eingreifen verarbeitet werden. Die Software (Chemstation)^[77] bietet die Möglichkeit, vor und nach jedem Analysenlauf zusätzliche Programme (Makros) auflaufen zu lassen. So kontrolliert ein Makro den Probengeber, wobei jede Position auf der Mikrotiterplatte über die Sequenztabelle gekennzeichnet ist. Ein anderes Makro gewährleistet, dass die Auswertung nach jedem Analysenlauf in einer spezifizierten gleichartigen Weise verläuft, sodass die Peaks der chiralen Verbindungen **58** und **59** quantitativ analysiert werden. Die analytischen Daten werden via DDE (Dynamic Data Exchange)^[78] in eine Excel-Datei übertragen, die die Ergebnisse entweder in Tabellenform oder, zur schnellen Übersicht, im Mikrotiterplattenformat liefert. Da Wasserstoff als Trägergas verwendet wird, umfasst der Aufbau auch H₂-Wächter, die die H₂-Konzentration in den Öfen überwachen; bei Konzentrationen über 1 % (Explosionsgefahr bei >4 % H₂) wird automatisch auf Stickstoff als Trägergas umgeschaltet.^[72, 74]

Mit stationären Phasen auf der Basis von β -Cyclodextrin(CD)-Derivaten wie 2,3-Di-*O*-ethyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -CD wurden (*R*)- und (*S*)-**58** (aber nicht (*R*)- und (*S*)-**59**) in 3.9 Minuten vollständig getrennt.^[72, 74] Mit der in Abbildung 9 dargestellten Konfiguration aus zwei gleichzeitig arbeitenden GC-Einheiten sind so etwa 700 genaue *ee*-Bestimmungen von (*R*)/(*S*)-**58** pro Tag möglich. Darüber hinaus liefert das System automatisch auch die zugehörigen Werte für den Umsatz und den Selektivitätsfaktor *E* im Mikrotiterplattenformat. Ein typisches Beispiel ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Die *E*-Werte der selektivsten Enzymmutanten (*E* \geq 2.4) sind grau unterlegt.^[74] Bei Mutanten mit 0 % Umsatz fehlt die Enzymaktivität vollständig. Negative *ee*-Werte zeigen die Umkehrung der Enantioselektivität an.

WTP1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																
A	15	4	15	3	33	15	0	-	0	-	27	11	29	12	26	11	8	-	2	30	12	0	-	0	-	c	ee	
	1.6	1.4	2.1	-	-	2.0	2.1	2.1	0.7	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
B	0	-	19	5	16	4	0	-	0	-	21	8	26	10	0	-	18	4	12	2	21	5	18	0	-	c	ee	
	-	1.8	1.5	-	-	1.9	1.9	-	1.6	1.3	1.8	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
C	12	3	0	-	0	-	20	7	0	-	28	13	20	5	0	-	22	8	0	-	0	-	26	6	-	c	ee	
	1.5	-	-	-	1.8	-	2.2	1.5	-	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
D	29	13	27	11	8	-	4	19	7	25	16	30	13	16	4	26	12	0	-	29	13	6	-	2	26	11	c	ee
	2.2	2.0	0.4	2.0	2.1	2.1	1.5	2.2	-	2.3	0.8	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
E	12	2	29	13	0	-	35	18	22	8	0	-	19	5	27	13	0	-	6	-	24	10	17	5	-	-	c	ee
	1.6	2.2	-	2.4	1.9	-	1.8	2.4	-	0.9	2.2	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
F	0	-	29	9	27	12	12	1	29	9	29	9	16	4	13	2	29	9	18	6	29	8	12	2	-	-	c	ee
	-	2.1	2.2	1.1	2.1	2.0	1.7	1.4	2.0	1.9	1.9	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
G	27	10	0	-	26	11	9	0	0	-	0	-	29	13	12	1	22	7	0	-	0	-	5	-	-	-	c	ee
	2.0	-	2.2	1.1	-	-	2.2	1.2	1.8	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
H	37	21	0	-	17	5	18	6	31	15	22	8	0	-	10	0	0	-	0	-	13	3	18	6	-	-	c	ee
	2.5	-	1.7	1.9	2.3	1.9	-	1.1	-	-	-	1.5	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	

Abbildung 10. Excel-Tabelle der GC-Daten im Mikrotiterplatten(MTP)-Format, angegeben sind jeweils der Umsatz c [%], der ee -Wert [%] und der Selektivitätsfaktor E von Lipasemutanten, die die hydrolytische kinetische Racematspaltung des Alkohols **58** katalysieren.^[74]

Somit ist es entgegen der allgemeinen Meinung durchaus möglich, in geeigneten Fällen die GC für das Hochdurchsatz-Screening auf Enantioselektivität einzusetzen. Diese Art des GC-Aufbaus sollte auch im Screening achiraler Umsetzungen von Nutzen sein. Zudem kann der Durchsatz bisweilen weiter erhöht werden, indem Proben zu geeigneten Zeiten injiziert werden, die kürzer sind als die Gesamtlaufzeit des eigentlichen Chromatogramms (ineinander geschachtelte Chromatogramme), sodass die Zeit zwischen den Läufen optimal genutzt wird.^[72, 74] Der Hauptvorteil gegenüber der Verwendung von zwei vollständig getrennten GC-Einheiten besteht in der optimalen Ausnutzung des Laborplatzes und der Verwendung nur eines Probengeber- und Computersystems, wodurch eine hohe instrumentelle und ökonomische Effizienz erreicht wird. Obwohl für jede neue zu testende chirale Substanz eine Optimierung durchgeführt werden muss, kann man davon ausgehen, dass in geeigneten Fällen 600–800 Proben mühelos pro Tag verarbeitet werden können. Es bleibt abzuwarten, ob die HPLC ähnlich gut an die Erfordernisse einer gegebenen analytischen Fragestellung angepasst werden kann. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Hochdurchsatz- ee -Bestimmungen, d. h. viele Tausend Proben pro Tag, auf der Grundlage von GC oder HPLC erreicht werden können. Je nach Problemstellung mag ein Durchsatz von 600–800 ee -Bestimmungen pro Tag aber unter Umständen vollkommen ausreichen.

Eine verwandte Fragestellung beschäftigt sich mit dem Hochdurchsatz-Screening auf Enantioselektivität mittels Dünnschichtchromatographie (DC).^[72] Es ist bekannt, dass eine Enantiomerentrennung an chiral modifizierten stationären Phasen möglich ist und dass die relative Größe der DC-Flecken des (*R*)- und des (*S*)-Isomers mit der Enantiomerenreinheit (ee) korreliert.^[79] Günther hat diese Technik zur ee -Wert-Bestimmung chiraler Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren angewandt,^[79b] strebte hierbei aber keinen hohen Durchsatz an. Dieser kann prinzipiell durch eine geeignete Bildverarbeitung per Computer erreicht werden. Hierzu haben wir die Routine MORFO des kommerziell erhältlichen Softwarepakets IMAGIC-5 vorgeschlagen, die Flecken auf einer gegebenen Oberfläche erkennt und „integriert“.^[80, 81]

Die DC-Platte einer kinetischen Racematspaltung weist das in Abbildung 11 schematisch wiedergegebene Aussehen auf.^[72] Man kann sich leicht vorstellen, dass Hunderte dieser DC-Platten schnell abgetastet werden können. Die eigentliche Herausforderung besteht hier darin, effiziente chirale Selektoren zu finden, die eine ausreichende Enantiomerentrennung gewährleisten.

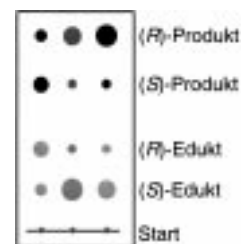


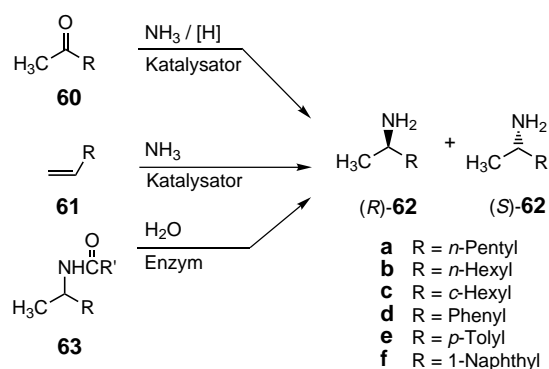
Abbildung 11. Schematische Darstellung einer DC-Platte mit dem Ergebnis einer kinetischen Racematspaltung eines *rac*-Edukts.^[72]

3.6. Parallelisierte chiral modifizierte Kapillarelektrophorese

Wie in Abschnitt 1 erwähnt, wird die Bestimmung der Enantiomerenreinheit bei herkömmlichen Problemstellungen bisweilen mittels Kapillarelektrophorese (CE) durchgeführt, wobei der Elektrolyt chirale Selektoren wie Cyclodextrin(CD)-Derivate enthält.^[7] Die konventionelle Form dieser Analysetechnik ermöglicht leider nur ein paar Dutzend ee -Bestimmungen pro Tag. Wegen des analytischen Bedarfs unter anderem im Rahmen des Human-Genom-Projektes wurde die CE jedoch in den letzten Jahren revolutioniert, sodass jetzt effiziente Techniken zur instrumentellen Miniatursierung verfügbar sind, die zum ersten Mal eine Super-Hochdurchsatz-Analyse von Biomolekülen ermöglichen.^[82, 83] Zwei Ansätze wurden entwickelt: die Kapillar-Array-Elektrophorese (CAE)^[82] und die CE auf Mikrochips (auch CAE auf Chips genannt).^[83] Beide Techniken können verwendet werden, um DNA-Sequenzanalysen vorzunehmen und/oder Oligonucleotide, DNA-Verdauungsfragmente oder PCR-Produkte zu analysieren. Viele Hunderttausend analytische Datenpunkte können so pro Tag gesammelt werden.^[82, 83] Wir gingen deshalb davon aus, dass durch chirale Modifizierungen dieser Techniken zum ersten Mal Super-Hochdurchsatz-Analysen der Enantiomerenreinheit möglich werden sollten.^[84]

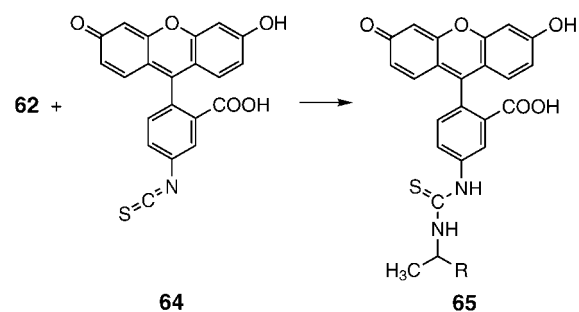
Im Fall der CAE wurden mittlerweile kommerziell erhältliche Instrumente entwickelt, bei denen eine große Zahl von Kapillaren parallel betrieben werden, wie die 96-Kapillaren-Einheit MegaBACE, die aus sechs Bündeln zu je 16 Kapillaren besteht.^[85] Dieses System kann daher eine komplette Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen verarbeiten. Jede Kapillare ist etwa 50 cm lang.

In unseren Bemühungen, daraus ein analytisches Super-Hochdurchsatz-System für ee -Bestimmungen zu entwickeln, verwendeten wir als Modellsubstrate zunächst chirale Amine des Typs **62**,^[86] die für die Synthese pharmazeutischer und agrochemischer Produkte von Bedeutung sind.^[87] Sie sind prinzipiell durch katalytische reduktive Aminierung der Ketone **60**, Markownikow-Addition von Ammoniak an Olefine **61** oder enzymatische Hydrolyse der Acetamide **63** (wobei die Rückreaktion möglich ist) zugänglich (Schema 24).



Schema 24. Katalytische Bildung der chiralen Amine **62**. Screening mittels CAE.^[86]

In ersten Experimenten wurden zunächst die Bedingungen für ein konventionelles CE-Assay der Amine optimiert, indem verschiedene α - und β -CD-Derivate als chirale Selektoren verwendet wurden.^[86] Um als empfindliches Detektionssystem die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) einsetzen zu können, wurden die Amine **62** zunächst in einer konventionellen Reaktion mit Fluoresceinisothiocyanat **64** derivatisiert, was zu den fluoreszenzaktiven Verbindungen **65** führte (Schema 25). Obwohl keine ausführliche Optimierung vorgenommen wurde (es wurden nur sechs CD-Derivate getestet), konnte in allen Fällen eine befriedigende Basislinientrennung erzielt werden (Tabelle 1).



Schema 25. Derivatisierung der chiralen Amine **62** für die im CAE-Screening eingesetzte LIF-Detektion.^[86]

Im nächsten Schritt wurden die Modellverbindungen **62c/65c** durch CAE mit einer MegaBACE-Einheit analysiert. Mischungen der Amine **62c** mit bekanntem Enantiomerenüberschuss wurden in die fluoreszenzaktiven Derivate **65c** überführt, die dann mittels CAE analysiert wurden. Dabei konnten die Ergebnisse des konventionellen Einkapillarsystems aufgrund instabiler elektrophoretischer Läufe nicht reproduziert werden. Das Problem wurde gelöst, indem ein spezieller Elektrolyt mit einer höheren Viskosität verwendet wurde. Er setzt sich aus 40 mm 2-(*N*-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure (CHES; pH 9.1), 6.25 mm γ -CD (5/1) und einem Puffer, der lineares Polyacrylamid enthält, zusammen. Die MegaBACE-Einheit wurde bei einer Spannung von -10 kV (bei $8 \mu\text{A}$) pro Kapillare und einer Probenaufgabespannung von -2 kV (9 s) betrieben. Unter diesen Bedingungen war die Basisli-

nientrennung exzellent (Abbildung 12). Die Übereinstimmung der *ee*-Werte der (*R*)/(*S*)-Mischungen von **65c**, die mit CAE bestimmt wurden, und gaschromatographisch bestimmten *ee*-Werte der entsprechenden (*R*)/(*S*)-Mischungen von **62c** erwies sich als sehr gut.^[86]

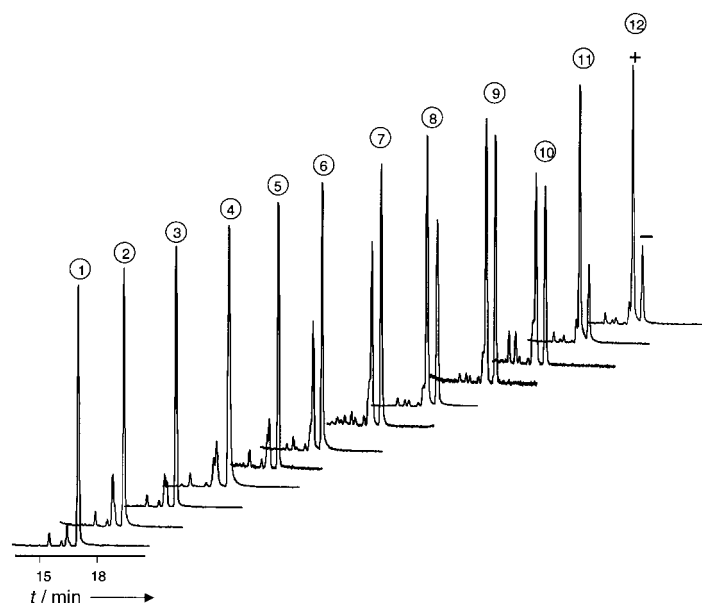


Abbildung 12. CAE-Enantiomerentrennung repräsentativer Proben von **65c**.^[86]

Die Enantiomerentrennung von (*R*)/(*S*)-**65c** mit der MegaBACE-Einheit dauerte ungefähr 19 Minuten. Damit sind bereits unter diesen nichtoptimierten Bedingungen mit diesem automatischen 96-Array-System mehr als 7000 *ee*-Bestimmungen pro Tag möglich.^[86] In ähnlichen Fällen konnten die Analysenzeiten für eine Enantiomerentrennung optimiert werden, sodass ein täglicher Durchsatz von 15000 bis 30000

Tabelle 1. Ergebnisse der CE-Enantiomerentrennung der Aminderivate **65** unter Variation der Elektrolytzusammensetzung.^{[a][86]}

Puffer, verwendetes Cyclodextrin ^[b]	65a	65b	65c	65d	65e	65f
40 mmol CHES, 40 mmol γ -CD + 15 % CH_3CN	B	B	–	n.g.	–	–
20 mmol Borat, 20 mmol DM- β -CD	–	–	–	–	–	–
40 mmol CHES, 20 mmol DM- β -CD	–	–	–	–	–	–
40 mmol CHES, 5 mmol DM- β -CD	–	–	–	A	–	–
40 mmol CHES, 40 mmol HE- β -CD	–	–	–	–	–	–
40 mmol CHES, 20 mmol HE- β -CD	A	–	–	A	A	–
40 mmol CHES, 10 mmol HE- β -CD	A	–	–	A	A	–
40 mmol CHES, 5 mmol HE- β -CD	fB	A	A	fB	fB	–
40 mmol CHES, 2.5 mmol HE- β -CD	fB	A	A	A	fB	–
40 mmol CHES, 5 mmol HP- α -CD	–	–	–	–	–	–
40 mmol CHES, 20 mmol HP- β -CD	–	–	–	A	–	–
40 mmol CHES, 5 mmol HP- β -CD	A	–	A	fB	A	–
40 mmol CHES, 20 mmol HP- β -CD + 15 % CH_3CN	A	–	–	A	–	A
40 mmol CHES, 25 mmol HP- γ -CD	–	–	A	–	–	–
40 mmol CHES, 6.25 mmol HP- γ -CD	–	–	B	–	A	fB
40 mmol CHES, 25 mmol HP- γ -CD + 15 % CH_3CN	–	–	B	–	–	–
40 mmol CHES, 10 mmol NH_2 - β -CD	–	–	–	–	–	–
40 mmol CHES, 10 mmol β -CD	–	–	–	–	–	–

[a] A: Antrennung; B: Basislinientrennung; fB: fast Basislinientrennung; –: keine Trennung; n.g.: nicht gemessen. [b] DM: Heptakis(2,6-di-*O*-methyl); HE: Hydroxyethyl; HP: Hydroxypropyl; NH_2 : 6 A -Amino-6 A -desoxy; CHES: 2-(*N*-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure.

ee-Bestimmungen realistisch ist. Solch ein Super-Hochdurchsatz-Screening auf Enantioselektivität ist mit keiner anderen zurzeit verfügbaren Methode möglich. In Anbetracht der Möglichkeit, den chiralen Selektor zu optimieren, und der Tatsache, dass die CAE viele Vorteile aufweist, wie extrem geringe Probenvolumina, so gut wie keinen Lösungsmittelverbrauch, keine Hochdruckpumpen und -ventile sowie die lange Standzeit der Säulen, sind wir zuversichtlich, dass unser CAE-Test ideal geeignet ist für die Hochdurchsatz-*ee*-Bestimmung.

Eine Variante der obigen Methode haben wir schon 1997 beschrieben, die Möglichkeit des Hochdurchsatz-*ee*-Screenings chiraler organischer Verbindungen mittels Kapillarelektrophorese auf Mikrochips.^[84] CE (oder spezieller CAE) auf (typischerweise 10 cm × 10 cm großen) Mikrochips wurde allgemein zuvor von Manz^[83a] und anderen^[83c–h] für die Analyse von Biomolekülen entwickelt. Traditionell werden dabei photolithographische Verfahren angewandt, um Kapillaranordnungen auf Kunststoff- oder Glaschips herzustellen.^[83] Wie wir feststellen mussten, ist die Enantiomerentrennung organischer Moleküle auf Kunststoffmikrochips aufgrund der chemischen Unbeständigkeit solcher Systeme nicht generell möglich. Im Fall von Glaschips ist die Situation dagegen ganz anders.^[86] So gelingt auf einem Glaschip beispielsweise die Enantiomerentrennung von **65c**, wobei zur Detektion die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) eingesetzt wird. Die Automatisierung mittels Robotern befindet sich gerade in der Optimierungsphase, sodass bald ein zweites CAE-gestütztes System zur Super-Hochdurchsatz-*ee*-Bestimmung zu Verfügung stehen wird. Angesichts der Berichte von Mathies^[83c] und Li^[83h] zur Enantiomerentrennung von Aminosäuren in wässrigen Lösungen auf CAE-Mikrochips, erwarten wir, dass dieser Assaytyp in Zukunft eine wichtige Rolle spielen wird.^[88] Natürlich muss für ein gegebenes analytisches Problem eine effiziente Derivatisierung und Antipodentrennung sichergestellt werden, weswegen eine universelle Allgemeingültigkeit nicht beansprucht werden kann.

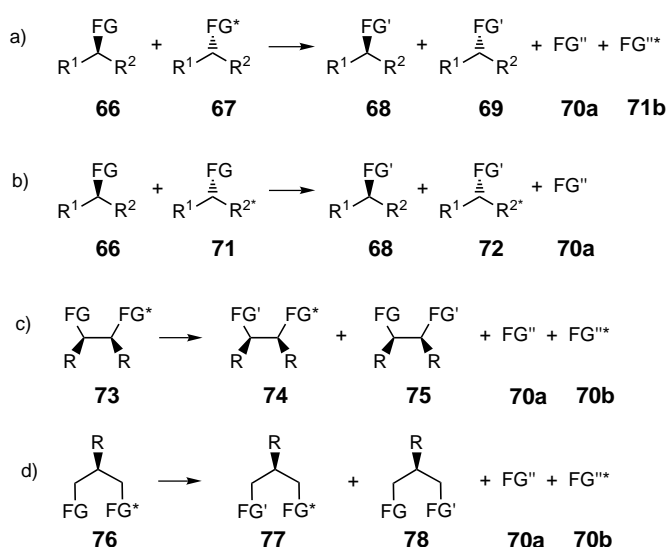
Die vorgestellten beiden Arten der Kapillarrayelektrophorese sind hoch effiziente Methoden zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit chiraler Verbindungen in einem wirklichen Hochdurchsatz-Screening. Verschiedene Abänderungen sind möglich, z.B. die Detektion per UV/Vis, MS oder elektrischer Leitfähigkeit. Zudem sind die chiralen Selektoren im CE-Elektrolyt nicht unbedingt notwendig, z.B. dann, wenn die Enantiomere zuvor – beispielsweise unter Verwendung fluoreszenzaktiver Derivatisierungsmittel – in Diastereomere überführt werden.^[86b]

3.7. Massenspektrometrie-Assays

Zwar wurden verschiedene massenspektrometrische Tests für den Einsatz in der kombinatorischen Katalyse entwickelt,^[12, 13b,d,g,j] doch ist die Anwendung auf das Screening enantioselektiver Katalysatoren nicht so leicht, einfach deswegen, weil die (*R*)- und (*S*)-Formen einer chiralen Verbindung identische Massenspektren geben. Wir haben uns davon nicht abschrecken lassen und ein MS-gestütztes System

entworfen, das die Bestimmung der Enantioselektivität (*ee*- und/oder *E*-Wert) ohne chromatographische Trennung oder Diastereomerenbildung ermöglicht. Typischerweise sind damit etwa 1000 Katalysator-Bewertungen pro Tag möglich.^[89] Die Ionisierung kann durch Standardmethoden vorgenommen werden, wie Elektrospray-Ionisierung (ESI) oder matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisierung (MALDI).^[63] Zwei grundsätzlich verschiedene stereochemische Prozesse können mit unserer Methode verfolgt werden: die kinetische Racematspaltung und die asymmetrische Umwandlung prochiraler Verbindungen mit enantiotopen Gruppen.^[89, 90]

Das zugrunde liegende Prinzip geht von der Verwendung isotoptenmarkierter Substrate in Form von Pseudoenantiomeren oder pseudoprochiralen Verbindungen aus (Schema 26). Der Verlauf der asymmetrischen Umsetzung wird anhand der relativen Mengen der Reaktanten und/oder Produkte mittels ESI-MS verfolgt.



Schema 26. a) Asymmetrische Umwandlung einer Pseudoenantiomerenmischung unter Abspaltung der funktionellen Gruppe FG und der markierten funktionellen Gruppe FG*. b) Asymmetrische Umwandlung einer Pseudoenantiomerenmischung unter Abspaltung oder Bindungsbildung an der funktionellen Gruppe FG; die Isotopenmarkierung an R² ist durch einen Stern gekennzeichnet. c) Asymmetrische Umwandlung eines Pseudo-meso-Substrats unter Abspaltung der funktionellen Gruppe FG und der markierten funktionellen Gruppe FG*. d) Asymmetrische Umwandlung eines pseudoprochiralen Substrats unter Abspaltung der funktionellen Gruppe FG und der markierten funktionellen Gruppe FG*.^[89]

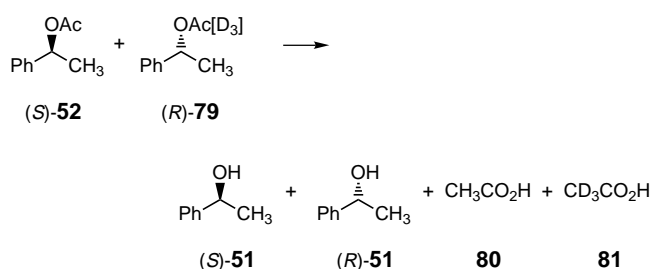
Im Fall der kinetischen Racematspaltung müssen die Verbindungen **66** und **67**, die sich in ihrer absoluten Konfiguration und der Markierung in der funktionellen Gruppe FG* unterscheiden, in enantiomerenreiner Form hergestellt und dann im Verhältnis 1:1 gemischt werden, um ein Racemat zu simulieren (Schema 26a). Bei der asymmetrischen Umwandlung der funktionellen Gruppe (in einer idealen kinetischen Racematspaltung bei 50 % Umsatz) werden die echten Enantiomere **68** und **69** sowie das nichtmarkierte und das markierte achirale Produkt **70a** bzw. **70b** gebildet. Das Verhältnis der Gesamtintensitäten von **66/67** und **70a/70b** in den Massenspektren (*m/z*-Intensitäten der Quasimolekülen) erlaubt die Bestimmung der Enantiomerenrein-

heit und daher der Enantioselektivität eines Katalysators. In einigen Fällen kann es vorteilhaft sein, einen internen Standard zur Umsatzermittlung einzusetzen.^[89]

Eine Variation dieses Themas ist die kinetische Racematspaltung der Pseudoenantiomere **66** und **71**, wobei hier der Rest R² von **71** markiert ist, unter Bildung eines neuen Paares von Pseudoenantiomeren **68** und **72** (Schema 26b). Aufgrund der *m/z*-Intensitäten der Quasi-Molekülonen von **66/71** und **68/72** können Umsatz, Enantioselektivität (*ee*) und Selektivitätsfaktor (*E*) erhalten werden. Ein interner Standard ist nicht notwendig.^[89]

Im Fall prochiraler Substrate mit enantiotopen Gruppen, z.B. *meso*-Verbindungen (Schema 26c), genügt die Synthese einer einzigen Pseudo-*meso*-Verbindung, z.B. **73**, da die interessierende stereodifferenzierende Reaktion eine Mischung aus zwei MS-detektierbaren Pseudoenantiomeren **74** und **75** liefert. Das Gleiche gilt für pseudoprochirale Verbindungen des Typs **76** (Schema 26d).

Zunächst untersuchten wir die kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat **52** (Schema 27).^[89] Zu diesem Zweck wurden die Pseudoenantiomere (*S*)-**52** und (*R*)-**79** in enantiomerenreiner Form hergestellt. Um das Testsystem zu



Schema 27. Kinetische Racematspaltung der Pseudoenantiomere (*S*)-**52** und (*R*)-**79**. Screening mittels ESI-MS.^[89]

überprüfen, wurden diese beiden Verbindungen in verschiedenen Verhältnissen gemischt und die entstandenen Mischungen gaschromatographisch analysiert, um die genauen Pseudo-*ee*-Werte als Kontrolle zu erhalten. Danach wurden die Proben mittels ESI-MS analysiert. Ein typisches ESI-Massenspektrum ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Da die Natriumaddukte von (*S*)-**52** und (*R*)-**79** aufgrund der Deuteriummarkierung Peaks bei verschiedenen *m/z*-Werten geben, ist

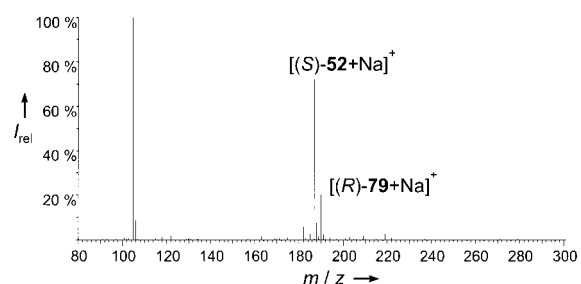


Abbildung 13. ESI-Massenspektrum einer Probe von (*S*)-**52** und (*R*)-**79**.^[89]

die Integration eine einfache Sache. Insgesamt wurden 17 Kontrollproben untersucht und die Übereinstimmung zwischen den gaschromatographisch und den per ESI-MS ermittelten *ee*-Werten waren ausgezeichnet ($\pm 5\%$).^[89] Im Unterschied zu vielen anderen Methoden, die den Nachteil aufweisen, dass die (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Substrate getrennt paarweise auf Mikrotiterplatten getestet werden, werden bei diesem System 1:1-Mischungen von Pseudoenantiomeren in kinetischen Racematspaltungen verwendet. Zudem sollten analoge Reaktionen an Festphasen keine Probleme mit sich bringen.

Der anschließend entwickelte experimentelle Aufbau für das Hochdurchsatz-Screening enantioselektiver Reaktionen besteht aus einem automatischen Flüssigkeitsprobengeber für 96er-Mikrotiterplatten und einem ESI-MS-System, die beide kommerziell erhältlich sind (Abbildung 14).^[89, 90] Mit diesem Aufbau können pro Tag die *ee*-Werte, Umsätze und damit auch die *E*-Werte von etwa 1000 Umsetzungen wie der oben beschriebenen Modellreaktion durchgeführt werden. Wie Schema 26 zeigt, kann sich die Deuteriummarkierung an irgendeiner Stelle im Substrat befinden. Es ist ratsam, eine einfache kinetische Studie des markierten und nichtmarkierten Substrats durchzuführen, um mögliche sekundäre Isotopeneffekte auszuschließen.

Als Beispiel für die asymmetrische Umsetzung einer prochiralen Verbindung betrachteten wir die bekannte Desymmetrisierung von *cis*-1,4-Diacetoxycyclopenten.^[89] In diesem Fall wurde die pseudoprochirale Verbindung **82** hergestellt (Schema 28). Die Produkte der asymmetrischen Umsetzung sind die Verbindungen **83** und **84**, die jeweils zwei stereogene Zentren enthalten. Da sie Pseudoenantiomere sind, können sie leicht mittels ESI-MS unterschieden werden. So untersuchen wir zurzeit die gerichtete Evolution

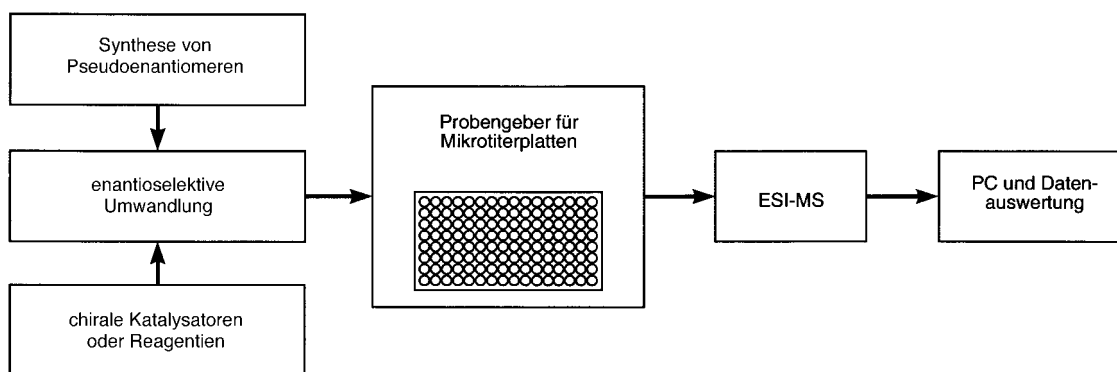
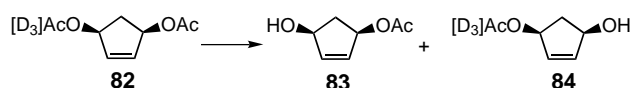


Abbildung 14. Experimenteller Aufbau eines ESI-MS-*ee*-Screeningsystems.^[89]



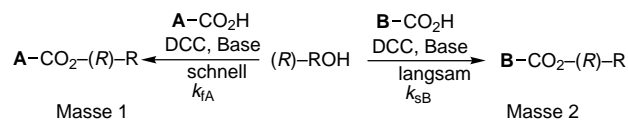
Schema 28. Desymmetrisierung eines pseudoprochiralen Substrats **82**. Screening mittels ESI-MS.^[89]

einer Lipase für diese Umsetzung, wobei das Screening mit dem in Abbildung 14 dargestellten Aufbau durchgeführt wird.

Dieser Ansatz ist eine ausgesprochen nützliche Methode zum Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Enzymen oder synthetischen asymmetrischen Katalysatoren. Statt der Deuteriummarkierung kann auch eine andere Massenkennzeichnung (z.B. Methylgruppen anstelle von Wasserstoff) an entfernten Positionen im Molekül verwendet werden. Unsere Methode hat jedoch Grenzen, da sie auf die Analyse der beiden Verbindungsklassen beschränkt ist, die die genannten Symmetrieeigenschaften aufweisen (siehe Schema 26). Das bedeutet, dass Umsetzungen prochiraler Verbindungen ohne enantiotopische Gruppen (z.B. die Reduktion von Acetophenon **54** zu 1-Phenylethanol **51**, Schema 21) nicht verfolgt werden können.

Ein anderer Ansatz, speziell zur Bestimmung der *ee*-Werte von Alkoholen, wurde von Finn et al.^[91] beschrieben und kann als Erweiterung der Methode von Horeau angesehen werden.^[92] Ihm liegt die Derivatisierung mit chiralen, massenmarkierten Acylierungsreagentien zugrunde. Die Methode setzt ein messbares Maß an kinetischer Racematspaltung im Derivatisierungsschritt voraus.^[91] Es wird ein äquimolares Gemisch pseudoenantiomerer, massenmarkierter chiraler Acylierungsreagentien eingesetzt, die sich in einem Substituenten (z.B. Methyl statt Wasserstoff) weit entfernt vom stereogenen Zentrum so unterscheiden, dass die Masse des jeweiligen Moleküls eindeutig mit dessen absoluter Konfiguration verknüpft ist. Im Prinzip können die Reaktionen der Enantiomere mit den chiralen Reagentien mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten ablaufen ($k_f > k_s$; f = schnell, s = langsam). Für chirale Alkohole (*R*)-ROH und (*S*)-ROH und massenmarkierte enantiomerenreine Acylierungsreagentien ist dies in Schema 29 veranschaulicht.^[91] Die enantiomeren Alkohole (*R*)-ROH und (*S*)-ROH werden zunächst mit den massenmarkierten chiralen Säuren A-CO₂H und B-CO₂H in Gegenwart von 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgesetzt. Aus den mittels MS gemessenen relativen Mengen der Produktester können dann (nach Durchführung von zwei Kalibrierungen) die Enantiomerenzusammensetzung der Ausgangsmischung (*R*)-ROH/(*S*)-ROH und so deren *ee*-Wert bestimmt werden.

Finn et al. verwendeten die von Prolin abgeleiteten massenmarkierten Acylierungsreagentien **85** und **86**.^[91] Die Reagentien müssen in großem Überschuss eingesetzt werden, und es ist erforderlich, dass ein kleiner, aber messbarer Grad an kinetischer Racematspaltung auftritt. Die Empfindlichkeit der Methode beträgt $\pm 10\%$ *ee*. Man kann das Verfahren auch umkehren, indem massenmarkierte chirale Nucleophile verwendet werden, um den *ee*-Wert bei Verwendung von nicht-markierten Acylierungsmitteln zu bestimmen. Wie unser MS-gestütztes System^[89] beinhaltet auch diese Methode keine chromatographische Trennung. Die Autoren betonen, dass sich diese Methode zu einem automatischen Hochdurchsatz-

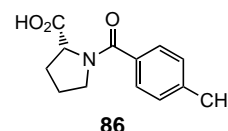
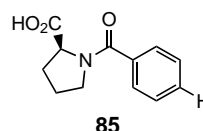


$$\frac{I_{\text{Masse 1}}}{I_{\text{Masse 2}}} = y \cdot q$$

$$ee [\%] = \left[\frac{(y-1)(s+1)}{(y+1)(s-1)} \right] \cdot 100$$

$$s = \frac{k_f}{k_s}$$

y = korrigiertes Intensitätsverhältnis



Schema 29. Massenspektrometrische *ee*-Wert-Bestimmung in der kinetischen Racematspaltung des Alkohols (*R*)-ROH/(*S*)-ROH.^[91] I = Peakintensität; q = Korrekturfaktor für die Ionisation; DCC = 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid.

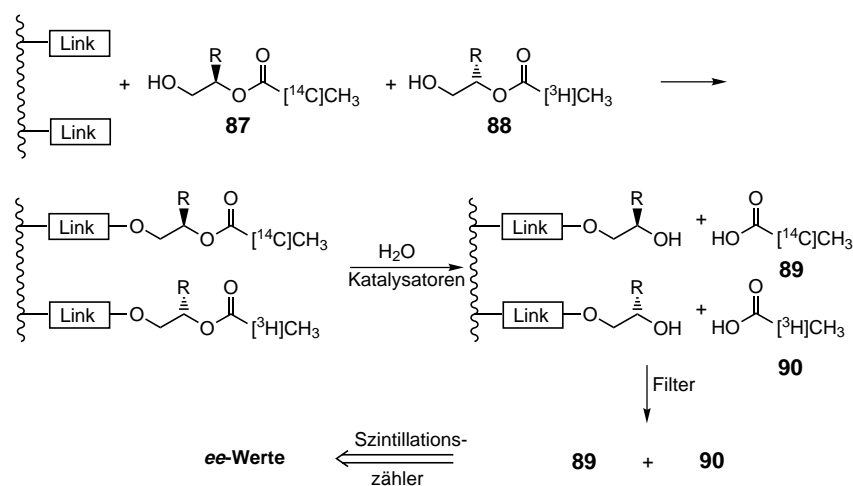
Screeningsystem mit Mikrotiterplatten ausarbeiten lassen sollte.^[91] Schließlich sollten derartige Analysen auch mit einer Deuterium- statt einer Methylgruppenmarkierung durchgeführt werden können.^[63]

3.8. Radioaktivitäts-Assays

Auf die Möglichkeit, *ee*-Werte unter Verwendung radioaktiv markierter Substrate an einem festen Träger durch Radioaktivitätsmessungen an der Lösung der abgespaltenen Produkte zu bestimmen, haben wir bereits 1997 hingewiesen.^[84] Im Fall der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von Estern des Typs ROCH₂CH(R)OC(O)CH₃ unter enantioselektiver Bildung der entsprechenden O-geschützten Dirole ROCH₂CH(R)OH beispielsweise ist die Anbindung geeigneter radioaktiv markierter Pseudoenantiomere **87/88** notwendig (Schema 30). Mit diesem System können Tausende von (Bio-)Katalysatoren getestet werden. Nach der katalytischen Hydrolyse in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte wird die Lösung von der Festphase abgetrennt, und die relativen Mengen der radioaktiv markierten Essigsäuren **89** und **90** werden mit einem konventionellen Szintillationszähler bestimmt. Auf diese Weise können die *ee*-Werte bei verschiedenen Umsätzen erhalten werden. In speziellen Fällen ist diese Methode sicher von Vorteil, die Automatisierung mit einem automatischen Szintillationszähler steht allerdings noch aus.

3.9. NMR- und IR-Assays

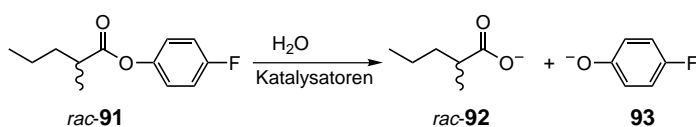
Die NMR-Spektroskopie ist ein relativ langsames analytisches Verfahren und dürfte daher als nicht geeignet für



Schema 30. Darstellung eines *ee*-Tests auf der Grundlage von Radioaktivitätsmessungen.^[84]

Hochdurchsatz-Analysen erscheinen. Tatsächlich aber wurden Fortschritte in der Verwendung von NMR-Methoden in der kombinatorischen Wirkstoffentwicklung gemacht, sowohl bei Verfahren an Festphasen als auch bei solchen in Lösung.^[93] Einer der offensichtlichen Nachteile ist die geringe Empfindlichkeit, die mit der Notwendigkeit der Verwendung hoher Konzentrationen einhergeht. Die fortschreitende Entwicklung von Durchflusszellen und Kryosonden wird sicher weitere Fortschritte in der Anwendung der NMR-Spektroskopie in der kombinatorischen Chemie nach sich ziehen.

Da ein hoher Durchsatz im Mittelpunkt der kombinatorischen Katalyse steht und idealerweise mehrere Proben parallel gemessen werden müssen, erwogen wir die Anwendung des magnetic resonance imaging (NMR-Tomographie), das in der Medizin erfolgreich zur Visualisierung von Geweben und Organen eingesetzt wird. In unserem Fall war das Ziel, Tomogramme von Mikrotiterplatten zu erhalten, in denen enantioselektive Reaktionen ablaufen.^[72] In Vorversuchen entschieden wir uns, den ¹⁹F-Kern zur Verfolgung der Hydrolyse der (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Ester **91** (Schema 31) zu verwenden.^[72, 94] In einer ersten Messung wurde



Schema 31. Modellreaktion für ein NMR-gestütztes Screeningsystem.^[72, 94]

eine 3:2-Mischung aus *rac*-**91** und *p*-Fluorphenolat **93** in DMF und Tris(hydroxymethyl)methylamin (TRIS)-Puffer (pH 7.5) in D₂O/H₂O (3/7) untersucht. Die beiden ¹⁹F-NMR-Signale von **91** und **93** ($\delta = -117$ bzw. -124) konnten leicht nebeneinander beobachtet werden.

In weiteren orientierenden Experimenten wurden NMR-Röhrchen mit Mischungen aus **91** und **93** in den Verhältnissen 1:1.4 (Probe A) und 1:9 (Probe B) beschickt. Die Proben wurden mit einem Mikro-5-Mikroimaging-Probenkopf auf einem Bruker-DMX-300-WB-Spektrometer vermessen.^[94] Mittels 3D-CSI (chemical shift imaging) gelang es, eine räumliche Auflösung in zwei Dimensionen und eine Selektion

der chemischen Verschiebung in der dritten Dimension zu erreichen (Abbildung 15).^[94] Das Signal des Esters **91** (linkes Signal) und das des *p*-Fluorphenolats **93** (rechtes Signal) sind in beiden Fällen leicht auszumachen. Die Spuren entlang der *x*- und der *y*-Achse spiegeln jeweils die Gesamtaborption bei der Resonanzfrequenz von **93** (in Probe A) und von **91** (in Probe B) wider. Im Fall der Probe B ist der Ester **91** in solch geringer Konzentration vorhanden, dass nur ein schwaches Signal auftritt.

Die Daten derartiger 3D-CSI-Messungen können auf verschiedene Weise visualisiert werden. Außer der Darstellung in Form der Spuren in Abbildung 15 ist eine räumliche Darstellung der ¹⁹F-NMR-Signale möglich (Abbildung 16).^[72, 94] Die beiden

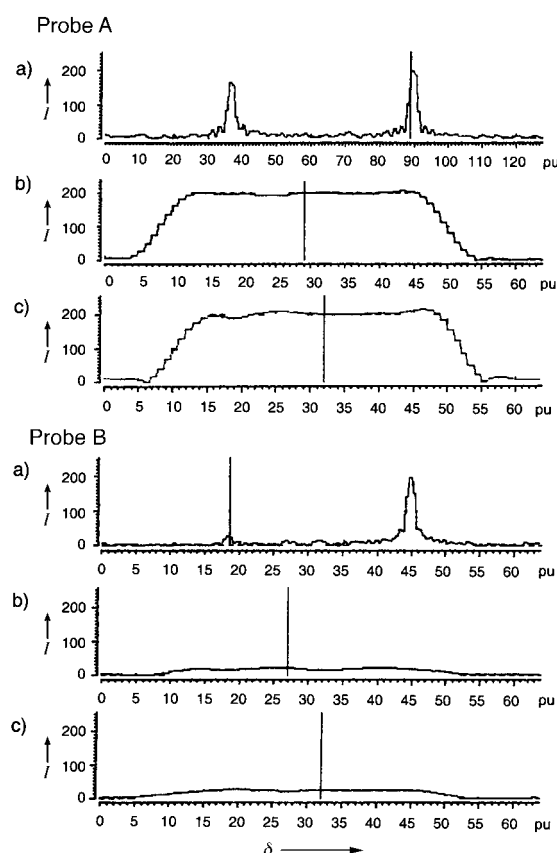


Abbildung 15. Mittels 3D-CSI bestimmte chemische Verschiebung in zweidimensionaler Auflösung.^[72, 94] Probe A: **91**:**93** = 1:1.4; Probe B: **91**:**93** = 1:9. Angegeben ist jeweils die chemische Verschiebung (a) sowie das Signal entlang der *x*- (b) und entlang der *y*-Achse (c). *I* = Intensität, pu = Pixel-Einheiten.

Scheiben repräsentieren die zweidimensional aufgelöste Verteilung der NMR-Resonanzlinien von Probe A und können wie bei einem NMR-Tomogramm im Raum in alle Richtungen gedreht werden. Die Helligkeit der Scheiben korreliert mit der Konzentration der Verbindungen in den Proben (helle Scheibe: **93**, dunkle Scheibe: **91**, entsprechend einem Ver-

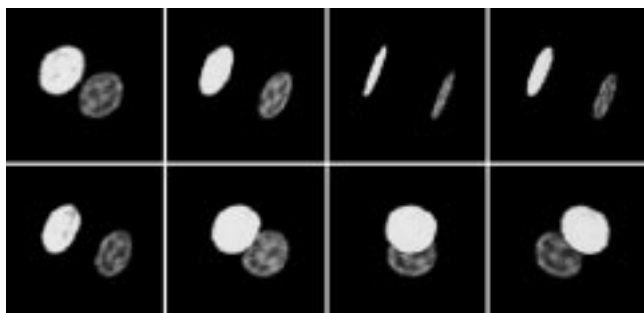


Abbildung 16. Verschiedene räumliche Darstellungen der Ergebnisse der 3D-CSI-Messungen an Probe A ($93:91 = 1.4:1$).^[72, 94]

hältnis von 1.4:1). In einem möglichen *ee*-Assay würde man (*R*)- und (*S*)-**91** getrennt paarweise mit jedem Katalysator auf einer Mikrotiterplatte reagieren lassen.

Auf der Grundlage dieser Experimente sollte es tatsächlich möglich sein, die Enantiomerenreinheit von Produkten in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mittels NMR-Tomographie zu visualisieren.^[72] Beim gegenwärtigen technologischen Stand ist die Empfindlichkeit der Instrumentierung noch zu niedrig für praktische Anwendungen. Dennoch weist diese Methode ein gewisses Potential für *ee*-Wert-Bestimmungen (und das Screening auf andere Parameter) auf. Schließlich hat van Leeuwen zeigen können, dass in manchen Fällen die IR-Spektroskopie bei der Bewertung von asymmetrischen Reaktionen nützlich ist.^[95]

4. Schlussfolgerungen

In den letzten fünf Jahren wurden beträchtliche Fortschritte in der Parallelsynthese chiraler Liganden für den Einsatz in katalytischen enantioselektiven Reaktionen gemacht. Gleichzeitig wurden Strategien vorgestellt, um die Prinzipien der kombinatorischen Chemie bei der Suche nach enantioselektiven Katalysatoren anzuwenden. Zurzeit scheint die größte Aussicht für erfolgreiche Anwendungen im Studium modular aufgebauter chiraler Liganden zu liegen, weil diese den maximalen Grad struktureller Diversität bieten und deswegen hier die größte Wahrscheinlichkeit besteht, enantioselektive Katalysatoren zu finden. Dieser Ansatz wird vermutlich einen der Wege bahnen, neue Klassen chiraler Liganden für den Einsatz in der asymmetrischen Katalyse zu entdecken, vorausgesetzt, dass die Suchexperimente intelligent aufgebaut sind. Wie einer der Gutachter dieses Aufsatzes richtig festgestellt hat, besteht die vielleicht wichtigste Botschaft, die aus dieser Forschung hervorgeht, in der Frage: „Wie viel haben wir über die Jahre übersehen, weil wir diversitätsgestützte Ansätze zur Katalysatorentdeckung und -optimierung *nicht* angewandt haben?“

Das systematische Testen geeigneter achiraler Zusätze, die nicht nur zu einer Geschwindigkeitssteigerung führen,^[96] sondern auch die Enantioselektivität beeinflussen, sind ebenso bemerkenswert. Die Zahl solcher Zusätze ist fast unbegrenzt. Von besonderem akademischen und praktischen Interesse sind solche Zusätze, die nicht nur formal achiral sind, z. B. *meso*-Verbindungen, sondern die eigentlich zwei

sich schnell ineinander umwandelnde Enantiomere sind. Diese bilden durch Wechselwirkung mit dem chiralen Liganden, der in der katalytischen Umsetzung verwendet wird, Diastereomere.^[97] Eine Variation dieses Themas ist die kovalente Anbindung solcher Struktureinheiten an den chiralen Liganden,^[98] wodurch ebenfalls die kombinatorische Diversität erhöht werden kann.

Trotz des beträchtlichen konzeptionellen Fortschritts wurde das tatsächliche Ziel, wirklich große Bibliotheken chiraler Liganden oder Katalysatoren zu synthetisieren, bis dato nicht in die Praxis umgesetzt – teilweise aufgrund des Fehlens von Hochdurchsatz-Screeningsystemen. Eine Ausnahme bildet die Anwendung der gerichteten Evolution als Methode zur Herstellung enantioselektiver Enzyme für den Einsatz in der Organischen Chemie.^[17, 19] Genau dieses Gebiet führte zur Entwicklung des ersten Hochdurchsatz-Tests auf Enantioselektivität. Die meisten der neueren von uns entwickelten Screeningsysteme können auch in der kombinatorischen Suche nach asymmetrischen Übergangsmetallkatalysatoren angewandt werden. Dies eröffnet gänzlich neue Perspektiven für die Zukunft, einfach weil jetzt extrem große Bibliotheken wirklich schnell durchsucht werden können. Das bedeutet, dass der kreative Chemiker pro Zeiteinheit mehr seiner Ideen in die Tat umsetzen kann. Es ist zu hoffen, dass die Anwendung genetischer Algorithmen^[99] und/oder neuronaler Netzwerke^[100] in der kombinatorischen Suche nach enantioselektiven Katalysatoren hilfreich sein wird.

Unter den verschiedenen beschriebenen Ansätzen für Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsysteme erscheinen die auf der Grundlage von Massenspektrometrie^[89–91] und Kapillarelektrophorese^[86] derzeit am vielversprechendsten. Wahrscheinlich ist aber kein System allein universell einsetzbar, sodass die Verwendung und/oder Entwicklung von Alternativen weiterhin wichtig bleibt. Im Fall der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme besteht eine solche Möglichkeit in der Anwendung eines Phage-display-Systems^[101] zur Selektion. Solche Systeme würden die Bewertung von Millionen von Enzymmutanten hinsichtlich ihrer Enantioselektivität in einer gegebenen Reaktion ermöglichen.

Welches Screeningsystem in der Zukunft auch immer zur Bewertung enantioselektiver Katalysatoren Verwendung finden wird, mit der Anwendung von Super-Hochdurchsatzsystemen muss auch das Datenmanagement berücksichtigt werden.^[86] Die Forschung in Hinblick auf diesen Aspekt der kombinatorischen Katalyse wird sehr wahrscheinlich an Bedeutung gewinnen. Schließlich sollte es mit dem idealen Screeningsystem möglich werden, für ein beliebiges kombinatorisches Katalysatorsystem gänzlich unerwartete Ergebnisse zu identifizieren, was dem Chemiker eine Methode an die Hand geben würde, das so wichtige Phänomen des Zufalls in der Wissenschaft zu kanalisieren.^[102]

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Mitarbeitern sowie den Wissenschaftlern, Ingenieuren und Technikern der Abteilungen für Massenspektrometrie und Chromatographie des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung für ihre kreativen Beiträge. Ihre Namen sind im Literaturverzeichnis aufgeführt. Ich danke auch Herrn Dr. K.-E. Jäger, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum, und Herrn Pro-

fessor Dr. B. W. Dijkstra, Universiteit Groningen, für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der gerichteten Evolution. Für finanzielle Unterstützungen danke ich besonders der Max-Planck-Gesellschaft, der Europäischen Union (Projekt-Nr. BIO4-CT98-0249) und der Bayer AG.

Eingegangen am 12. Juli 2000 [A420]

- [1] a) *Chirality in Industry: The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**; b) *Chirality in Industry II: Developments in the Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1997**; c) R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Dekker, New York, **1993**; d) S. C. Stinson, *Chem. Eng. News* **1999**, 77(41), 101–120; e) S. C. Stinson, *Chem. Eng. News* **2000**, 78(43), 55–78.
- [2] a) *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl) 4th ed. 1952–*, Vol. E21/1–10, **1996**; b) R. S. Atkinson, *Stereoselective Synthesis*, Wiley, New York, **1995**.
- [3] a) *Comprehensive Asymmetric Catalysis, Vol. I–III* (Hrsg.: E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto), Springer, Berlin, **1999**; b) H. Brunner, W. Zettlmeier, *Handbook of Enantioselective Catalysis with Transition Metal Compounds, Vol. I–II*, VCH, Weinheim, **1993**; c) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley, New York, **1994**; d) *Catalytic Asymmetric Synthesis* (Hrsg.: I. Ojima), VCH, Weinheim, **1993**; e) D. J. Berrisford, C. Bolm, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1159–1171; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1059–1070.
- [4] a) H. G. Davies, R. H. Green, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis*, Academic Press, London, **1989**; b) C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry (Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 12)*, Pergamon, Oxford, **1994**; c) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Vol. I–II* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**; d) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3. Aufl., Springer, Berlin, **1997**.
- [5] W. A. König, *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig, Heidelberg, **1992**.
- [6] *Chiral Separation by HPLC* (Hrsg.: A. M. Krstulovic), Ellis Horwood, Chichester, **1989**.
- [7] a) B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester, **1997**; b) E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare, *Science* **1985**, 230, 813–814; c) L. G. Blomberg, H. Wan, *Electrophoresis* **2000**, 21, 1940–1952; d) H. Nishi, T. Fukuyama, S. Terabe, *J. Chromatogr.* **1991**, 553, 503–516; e) S. Fanali, *J. Chromatogr.* **1989**, 474, 441–446; f) A. Guttman, A. Paulus, A. S. Cohen, N. Grinberg, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1988**, 448, 51–53; g) D. Belder, G. Schomburg, *J. Chromatogr. A* **1994**, 666, 351–365; h) D. Wistuba, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* **2000**, 875, 255–276; i) G. Blaschke, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* **2000**, 875, 3–25.
- [8] a) M. M. Altamirano, J. M. Blackburn, C. Aguayo, A. R. Fersht, *Nature* **2000**, 403, 617–622; b) P. N. Bryan, *Biotechnol. Adv.* **1987**, 5, 221–234; c) J. A. Gerlt, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1079–1105; d) J. R. Knowles, *Science* **1987**, 236, 1252–1258; e) S. J. Benkovic, C. A. Fierke, A. M. Naylor, *Science* **1988**, 239, 1105–1110; f) J. A. Wells, D. A. Estell, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 291–297; g) Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kuroko, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1063–1066; h) Z. Shao, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 513–518.
- [9] a) F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2436–2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2288–2337; b) J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 19–46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 17–42; c) *Chem. Rev.* **1997**, 97(2), 347–510 (Ausgabe zur kombinatorischen Chemie); d) S. R. Wilson, A. W. Czarnick, *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application*, Wiley, New York, **1997**; e) *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening* (Hrsg.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**; f) A. Beck-Sickinger, P. Weber, *Kombinatorische Methoden in Chemie und Biologie*, Spektrum, Heidelberg, **1999**; g) neue Methode zur Kodierung durch Verwendung fluoreszierender Kolloide: B. J. Battersby, D. Bryant, W. Meutermans, D. Matthews, M. L. Smythe, M. Trau, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2138–2139; h) R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 445–451; i) R. T. Koehler, S. L. Dixon, H. O. Villar, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4695–4704.
- [10] Siehe hierzu z. B.: a) D. P. Curran, P. Wipf, *Chem. Eng. News* **1997**, 75(11), 6–7; b) A. W. Czarnick, *Chem. Eng. News* **1997**, 75(11), 7.
- [11] A. P. Combs, vorgetragen auf dem Second Annual Boston College ArQule Symposium on Combinatorial Chemistry, Boston, **2000**.
- [12] Übersicht über kombinatorische Methoden in den Materialwissenschaften und der Katalyse: B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2648–2689; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2494–2532.
- [13] Weiterführende Literatur zur kombinatorischen Katalyse:^[12] a) C. Hoffmann, A. Wolf, F. Schüth, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2971–2975; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2800–2803; b) W. F. Maier, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1294–1296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1216–1218; c) R. Schlögl, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2467–2470; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2333–2336; d) P. P. Pescarmona, J. C. van der Waal, I. E. Maxwell, T. Maschmeyer, *Catal. Lett.* **1999**, 63, 1–11; e) M. E. Davis, *AIChE J.* **1999**, 45, 2270–2272; f) T. Bein, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 335–338; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 323–326; g) R. H. Crabtree, *Chem. Commun.* **1999**, 1611–1616; h) H. Zhao, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 480–485; i) O. Lavastre, J. P. Morken, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3357–3359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3163–3165; j) S. Senkan, K. Krantz, S. Ozturk, V. Zengin, I. Onal, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2965–2971; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2794–2799; k) S. Kobayashi, S. Nagayama, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8977–8978; l) F. M. Menger, A. V. Eliseev, V. A. Migulin, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6666–6667; m) P. J. Fagan, E. Hauptman, R. Shapiro, A. Casalnuovo, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5043–5051; n) A. Berkessel, D. A. Héroult, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 99–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 102–105; o) D. Wolf, O. V. Buyevskaya, M. Baerns, *Appl. Catal. A* **2000**, 200, 63–77; p) D. G. Blackmond, T. Rosner, A. Pfaltz, *Org. Process Res. Dev.* **1999**, 3, 275–280; q) S. Kobayashi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 338–345; r) A. R. Connolly, J. D. Sutherland, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4438–4441; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4268–4271; s) M. Sotrk, A. Herrmann, T. Nennich, M. Klapper, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4544–4547; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4367–4369.
- [14] M. D. Weingarten, K. Sekanina, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9112–9113, zit. Lit.
- [15] K. Schimossek, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **1998**.
- [16] a) D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique* **1989**, 1, 11–15; b) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 125–131; c) W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, 370, 389–391; d) R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, 2, 28–33; e) J. D. Sutherland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 263–269.
- [17] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2830–2832.
- [18] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Top. Curr. Chem.* **1999**, 200, 31–57.
- [19] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 407–412.
- [20] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 269, 1835–1842.
- [21] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 709–718.
- [22] G. Liu, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7712–7713.
- [23] S. R. Gilbertson, X. Wang, *Tetrahedron* **1999**, 55, 11609–11618.
- [24] S. R. Gilbertson, S. E. Colibee, A. Agarkov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6522–6523.
- [25] a) C. Gennari, S. Ceccarelli, U. Piarulli, C. A. G. N. Montalbetti, R. F. W. Jackson, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 5312–5313; b) C. Gennari, H. P. Nestler, U. Piarulli, B. Salom, *Liebigs Ann.* **1997**, 637–647.
- [26] a) H. Takahashi, T. Kawakita, M. Yoshioka, A. Kobayashi, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 7095–7098; b) H. Takahashi, T. Kawakita, M. Ohno, M. Yoshioka, A. Kobayashi, *Tetrahedron* **1992**, 48, 5691–5700.
- [27] H. B. Kagan, *J. Organomet. Chem.* **1998**, 567, 3–6.

- [28] A. J. Brouwer, H. J. van der Linden, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1750–1757.
- [29] H.-J. Lim, G. A. Sulikowski, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2326–2327.
- [30] K. Burgess, H.-J. Lim, A. M. Porte, G. A. Sulikowski, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 192–194; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 220–222.
- [31] A. Pfaltz, *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, 36, 1437–1451.
- [32] K. Burgess, A. M. Porte, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2465–2469.
- [33] B. M. Trost, A. C. Krueger, R. C. Bunt, J. Zambrano, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6520–6521.
- [34] B. M. Cole, K. D. Shimizu, C. A. Krueger, J. P. A. Harrity, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1776–1779; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1668–1671.
- [35] a) K. D. Shimizu, B. M. Cole, C. A. Krueger, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1782–1785; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1704–1707; b) K. D. Shimizu, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1885–1889; c) A. H. Hoveyda, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R187–R191; d) C. A. Krueger, K. W. Kuntz, C. D. Dzierba, W. G. Wirschun, J. D. Gleason, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4284–4285.
- [36] a) S. Bromidge, P. C. Wilson, A. Whiting, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8905–8908; b) A. Whiting, *Chem. Br.* **1999**, 31–34.
- [37] M. S. Sigman, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4901–4902.
- [38] M. B. Francis, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 987–991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 937–941.
- [39] M. B. Francis, N. S. Finney, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8983–8984.
- [40] a) R. T. Buck, D. M. Coe, M. J. Drysdale, C. J. Moody, N. D. Pearson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7181–7184; b) M. B. Francis, T. F. Jamison, E. N. Jacobsen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 422–428; c) S. Peukert, E. N. Jacobsen, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1245–1248; d) S. Kobayashi, K. Kusakabe, H. Ishitani, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1225–1227; e) I. Chataigner, C. Gennari, U. Piarulli, S. Ceccarelli, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 953–956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 916–918; f) J. R. Porter, W. G. Wirschun, K. W. Kuntz, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2657–2658; g) Y. Hoshino, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10452–10453.
- [41] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 93, 3–14.
- [42] M. T. Reetz, M. Hermes, S. Wilensek, D. Zha, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [43] L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4560–4561.
- [44] L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2324–2331.
- [45] R. Kazlauskas, vorgetragen auf der Enzyme Technologies 2000 Pre-Conference, Workshop on High-Throughput Screening, International Business Communications, Las Vegas, NV, **2000**.
- [46] a) F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 391, 345–351; b) E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, 380, 1029–1033.
- [47] a) *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition (ACS Symp. Ser. 538)* (Hrsg.: A. W. Czarnik), American Chemical Society, Washington, **1993**; b) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515–1566; c) G. Zandonella, L. Haalck, F. Spener, K. Faber, F. Paltauf, A. Hermetter, *Chirality* **1996**, 8, 481–489; d) G. Gauglitz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 351–355; e) M. Olsen, B. Iverson, G. Georgiou, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 331–337; f) R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 445–451.
- [48] G. Klein, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 400–406.
- [49] a) G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4306–4397; b) kurze Übersicht über die Detektion mittels fluoreszierender Trägerkügelchen in der kombinatorischen Katalyse: A. H. Hoveyda, *Chem. Biol.* **1999**, 6, R305–R308.
- [50] P. Geymayer, N. Bahr, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1006–1012.
- [51] D. S. Tawfik, B. S. Green, R. Chap, M. Sela, Z. Eshhar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 373–377; zit. Lit.
- [52] G. MacBeath, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6101–6106.
- [53] a) W. Iwanek, J. Mattay, *J. Photochem. Photobiol. A* **1992**, 67, 209–226; b) Y. Kubo, *Synlett* **1999**, 161–174; c) D. H. Metcalf, S. W. Snyder, J. N. Demas, F. S. Richardson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5681–5695; d) T. Grady, T. Joyce, M. R. Smyth, D. Diamond, S. J. Harris, *Anal. Commun.* **1998**, 35, 123–125; e) Y. Yan, M. L. Myrick, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1958–1962.
- [54] M. T. Reetz, S. Sostmann, *Tetrahedron*, im Druck.
- [55] U. Glückert, *Erfassung und Messung von Wärmestrahlung: Eine praktische Einführung in die Pyrometrie und Thermographie*, Franzis, München, **1992**.
- [56] P. C. Pawlicki, R. A. Schmitz, *Chem. Eng. Prog.* **1987**, 83(2), 40–45.
- [57] G. Georgiades, V. A. Self, P. A. Sermon, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 1050–1052; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 1042–1043.
- [58] F. C. Moates, M. Somani, J. Annamalai, J. T. Richardson, D. Luss, R. C. Willson, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, 35, 4801–4803.
- [59] a) S. J. Taylor, J. P. Morken, *Science* **1998**, 280, 267–270; b) siehe auch: D. E. Bergbreiter, *Chemtracts* **1997**, 10, 683–686.
- [60] A. Holzwarth, H.-W. Schmidt, W. F. Maier, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2788–2792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2644–2647.
- [61] a) M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühling, A. Holzwarth, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2792–2795; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2647–2650; b) M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, im Druck.
- [62] M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, E. N. Jacobsen, *Science* **1997**, 277, 936–938.
- [63] M. H. Becker, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2000**.
- [64] a) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1256–1258; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1211–1212; b) M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 373–376; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 301–303.
- [65] M. T. Reetz, M. Hermes, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [66] M. T. Reetz, M. H. Becker, M. Liebl, A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1294–1298; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1236–1239.
- [67] A. F. Drake, J. M. Gould, S. F. Mason, *J. Chromatogr.* **1980**, 202, 239–245.
- [68] P. Salvadori, C. Bertucci, C. Rosini, *Chirality* **1991**, 3, 376–385.
- [69] A. Mannschreck, *Trends Anal. Chem.* **1993**, 12, 220–225.
- [70] a) K. Ding, A. Ishii, K. Mikami, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 519–523; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 497–501; b) R. Angelaud, Y. Matsumoto, T. Korenaga, K. Kudo, M. Senda, K. Mikami, *Chirality* **2000**, 12, 544–547.
- [71] M. T. Reetz, K. M. Kühling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* **2000**, 12, 479–482.
- [72] K. M. Kühling, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **1999**.
- [73] M. T. Reetz, A. Eipper, K. M. Kühling, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [74] M. T. Reetz, K. M. Kühling, S. Wilensek, H. Husmann, U. W. Häusig, M. Hermes, *Catal. Today*, im Druck.
- [75] Die GC-Geräte und der Datenbus (HP-IB) sind kommerziell erhältlich von Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland).
- [76] Der Probengeber PAL ist kommerziell erhältlich von CTC (Schlieren, Schweiz).
- [77] Das Programm Chemstation ist kommerziell erhältlich von Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland).
- [78] Das Programm Microsoft-Excel ist kommerziell erhältlich von Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland).
- [79] a) S. Ebel, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1988**, 36, 107–114; b) K. Günther, *J. Chromatogr.* **1988**, 448, 11–30.
- [80] Das Programm MORFO/IMAGIC-5 ist kommerziell erhältlich von Image Science Software GmbH (Berlin, Deutschland).
- [81] Das Programm MORFO/IMAGIC-5 wurde erfolgreich zur Computerbildverarbeitung von transmissionselektronenmikroskopischen Bildern von Metallnanopartikeln auf Gittern verwendet: M. T. Reetz, M. Maase, T. Schilling, B. Tesche, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 8779–8781.
- [82] a) X. C. Huang, M. A. Quesada, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2149–2154; b) H. Kambara, S. Takahashi, *Nature* **1993**, 361, 565–566; c) N. J. Dovichi, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2393–2399; d) G. Xue, H. Pang, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2642–2649; e) S. Behr, M. Mätzig, A. Levin, H. Eickhoff, C. Heller, *Electrophoresis* **1999**, 20, 1492–1507.
- [83] a) D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz, *Science* **1993**, 261, 895–897; b) S. C. Jacobson, R. Hergen-

- roder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1107–1113; c) L. D. Hutt, D. P. Glavin, J. L. Bada, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4000–4006; d) D. Schmalzing, L. Koutny, A. Adourian, P. Belgrader, P. Matsudaira, D. Ehrlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10273–10278; e) S. C. Jacobson, C. T. Culbertson, J. E. Daler, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3476–3480; f) S. Liu, H. Ren, Q. Gao, D. J. Roach, R. T. Loder, Jr., T. M. Armstrong, Q. Mao, I. Blaga, D. L. Barker, S. B. Jovanovich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5369–5374; g) S. R. Wallenborg, C. G. Bailey, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1872–1878; h) I. Rodriguez, L. J. Jin, S. F. Y. Li, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 211–219.
- [84] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger (Studiengesellschaft Kohle mbH), DE-A 19731990.4, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 149528].
- [85] MegaBACE ist kommerziell erhältlich von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland).
- [86] a) M. T. Reetz, K. M. Kühling, A. Deege, H. Hinrichs, D. Belder, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4049–4052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3891–3893; b) M. T. Reetz, K. M. Kühling, A. Deege, H. Hinrichs, D. Belder (Studiengesellschaft Kohle mbH), Patentanmeldung, **2000**.
- [87] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381–384.
- [88] Diese Autoren^[83c,h] haben keinen hohen Durchsatz demonstriert, aber durch Anwendung eines geeigneten Robotersystems sollte dieser möglich sein.
- [89] M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1872–1875; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758–1761.
- [90] M. T. Reetz, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1615–1622.
- [91] J. Guo, J. Wu, G. Siuzdak, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1868–1871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1755–1758.
- [92] A. Horeau, A. Nouaille, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2707–2710.
- [93] a) M. J. Shapiro, J. S. Gounarides, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 153–200; b) H. Schröder, P. Neidig, G. Rossé, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3974–3977; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3816–3819.
- [94] Wir danken Dr. D. Cross (Bruker Analytik GmbH) für die Durchführung dieser Experimente und Dr. R. Mynott (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung) für Diskussionen.^[72]
- [95] D. G. I. Petra, J. N. H. Reek, P. C. J. Kamer, H. E. Schoemaker, P. W. N. M. van Leeuwen, *Chem. Commun.* **2000**, 683–684.
- [96] Sharpless hat sich hauptsächlich auf die Geschwindigkeitssteigerung durch chirale Liganden konzentriert.^[3e]
- [97] a) J. Balsells, P. J. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1802–1803; b) siehe auch: S. Matsukawa, K. Mikami, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 815–816.
- [98] a) M. T. Reetz, T. Neugebauer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 134–137; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 179–181; b) D. G. Blackmond, T. Rosner, T. Neugebauer, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2333–2335; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2196–2199.
- [99] Siehe z.B.: a) D. E. Goldberg, *Genetic Algorithms in Search Optimization and Machine Learning*, Addison Wesley, Reading, **1989**; b) L. Weber, S. Wallbaum, C. Broger, K. Gubernator, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2452–2454; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2280–2282; c) D. Weuster-Botz, C. Wandrey, *Process Biochem.* **1995**, *30*, 563–571; d) M. Bradley, L. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 255–256; e) *Evolutionary Algorithms in Molecular Design* (Hrsg.: D. E. Clark), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [100] a) J. Sadowski, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 280–282; b) S. Anzali, J. Gasteiger, U. Holzgrabe, J. Polanski, J. Sadowski, A. Teckentrup, M. Wagener, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1998**, *9/10/11*, 273–299.
- [101] a) P. Forrer, S. Jung, A. Plückthun, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 514–520; b) J. Fastrez, *Mol. Biotechnol.* **1997**, *7*, 37–55; c) M. Olsen, B. Iversen, G. Georgiou, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 331–337.
- [102] R. M. Roberts, *Serendipity: Accidental Discoveries in Science*, Wiley, New York, **1989**.