

Neue Methoden für das Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Katalysatoren und Biokatalysatoren

Manfred T. Reetz*

Die Bedeutung der asymmetrischen Katalyse ist unumstritten, nicht zuletzt belegt durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2001 an K. Barry Sharpless, Ryoji Noyori und William S. Knowles. Grundsätzlich stehen den Chemikern dabei zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die Nutzung von Übergangsmetallkatalysatoren in homogener Lösung^[1] und Biokatalysatoren.^[2] Im ersteren Fall ist der Schlüssel zum Erfolg das auf Intuition basierende „Liganden-Tuning“, Molecular Modeling und bis zu einem gewissen Grad Versuch und Irrtum.

In den 1990er Jahren wurde eine neue Technik entwickelt, die, etwas salopp, kombinatorische asymmetrische Katalyse genannt wurde.^[3] Diese umfasst die zeitsparende parallele Synthese und das Testen einer hohen Anzahl von chiralen Katalysatoren. Die Herausforderungen in diesem interessanten neuen Feld der asymmetrischen Katalyse erstrecken sich auf zwei Gebiete: zum einen auf Strategien zur modularen Synthese von chiralen Liganden, zum anderen auf die Entwicklung von Hochdurchsatz-Assays zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*ee*).^[4] Bislang war die Größe der Katalysatorbibliotheken normalerweise auf weniger als 100 Katalysatoren beschränkt, die fast immer auf konventionelle Weise analysiert wurden.

Das Potential der kombinatorischen asymmetrischen Katalyse wurde also nur unvollständig genutzt. Eine Erhöhung des Erfolges bei der Identifizierung von Treffern (Hits) ist durch Vergrößerung der Bibliotheken wahrscheinlich. Im Falle der Enzymkatalyse wurde die Idee der Anwendung molekularbiologischer Methoden der gerichteten Evolution zur Erzeugung enantioselektiver Enzymmutanten (Varianten) kürzlich in die Praxis umgesetzt.^[5, 6] Das zugrunde liegende Konzept geht weit über das der kombinatorischen Katalyse hinaus, da es auf wiederholten Zyklen von Mutagenese und Screening beruht, durch die ein evolutionärer Druck erzeugt wird. Die Kenntnis der Struktur oder des Mechanismus des Enzyms ist dabei nicht erforderlich. Die Größe jeder durch Anwendung von fehlerhafter PCR oder DNA-Shuffling erzeugten Bibliothek von Enzymmutanten

beläuft sich auf mehrere tausend Komponenten. Dies wirft ein schwieriges analytisches Problem auf, wenn von jeder Komponente der Bibliotheken die Enantioselektivität in einer bestimmten Reaktion ermittelt werden soll.

Es ist offensichtlich, dass beide Zugänge zu asymmetrischen Katalysatoren Hochdurchsatz-*ee*-Screeningsysteme erfordern. Der erste für die Handhabung von akzeptabel großen Enzymbibliotheken entwickelte *ee*-Assay war ein relativ grobes, auf UV/Vis-Spektroskopie basierendes Screeningssystem zur Erfassung einer Lipase-katalysierten kinetischen Racematspaltung eines chiralen *p*-Nitrophenolesters. Die (*R*)- und (*S*)-Ester werden getrennt voneinander paarweise in einer 96er-Mikrotiterplatte unter Verwendung eines einfachen UV/Vis-Lesegeräts getestet.^[5a]

Das Konzept, die (*R*)- und (*S*)-Enantiomere bei einer kinetischen Racematspaltung getrennt zu vermessen, hat einige Nachteile.^[4] Dennoch basieren andere Tests ebenfalls auf diesem Konzept,^[4] darunter eine erst vor kurzem entwickelte Methode, die gekoppelte enzymatische Umsetzungen nutzt.^[7] Mehrere allgemeinere Screeningsysteme sind ersonnen worden. Dazu zählen Methoden, die auf der massenspektrometrischen Analyse von Deuterium-markierten Substraten basieren und 1000 *ee*-Bestimmungen pro Tag erlauben (dies ist mittlerweile durch den Gebrauch eines Acht-Kanal-Multiplex-Einspritzsystems auf 10000 Bestimmungen erweitert worden),^[8] sowie die Verwendung von Kapillarelektrophorese (bis zu 30000 *ee*-Bestimmungen pro Tag)^[9] und HPLC/Circulardichroismus(CD)-Spektroskopie (typischerweise 1000 Proben pro Tag).^[10]

Diese und andere Methoden wurden im vergangenen Jahr in mehreren Übersichtsartikeln behandelt.^[4] Da aber kein einziger dieser Assays universell anwendbar ist, sind weitere Bemühungen in diesem faszinierenden Forschungsbereich notwendig. Feringa et al. berichteten kürzlich über einen raffinierten Farbstest für Enantioselektivität, der auf der Chiralitätsabhängigen Farberzeugung in dotierten Flüssigkristallfilmen beruht.^[11] Es bleibt abzuwarten, ob dieses interessante System zu einem Hochdurchsatz-*ee*-Assay modifiziert werden kann.

Kürzlich wurden mehrere neue Möglichkeiten zum Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Katalysatoren beschrieben. So beschrieben Shair et al. eine neue Technik, die DNA-Mikroarrays nutzt.^{[12][19]} Diese neue Technik wurde früher zur relativen Bestimmung von genomweiten Genex-

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz

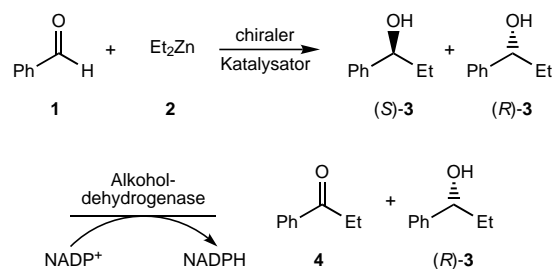
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-2985
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

pressionsraten genutzt, wobei das Verhältnis von Fluoreszenzreportern betrachtet wurde.^[13] Das Ziel in dem neuentwickelten *ee*-Assay war die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von chiralen Aminosäuren.^[12] Solche (*R*)/(*S*)-Mischungen können z.B. durch Rh-katalysierte Hydrierung der korrespondierenden *N*-Acylaminoacrylate erhalten werden, wobei eine Bibliothek von kombinatorisch hergestellten Katalysatoren verwendet wird. In einer Modellstudie wurden Mischungen von (*R*)- und (*S*)-Aminosäuren zunächst an der Aminofunktion zu den Boc-geschützten Derivaten acyliert (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). Die Proben wurden anschließend durch kovalente Verknüpfung in räumlich definierter Anordnung auf aminfunktionalisierte Glaträger aufgebracht (Abbildung 1). In einem zweiten Schritt wurden die freien Aminofunktionen der Oberfläche erschöpfend acyliert. Der dritte Schritt umfasste die Entschützung der Aminosäuren,

um die freie Aminofunktion der Aminosäure zu erhalten. Schließlich wurden in einem vierten Schritt zwei pseudoe-nantiomere Fluoreszenzsonden an die freien Aminofunktionen auf der Arrayoberfläche gebunden.

Voraussetzung für den Erfolg dieses *ee*-Assays ist eine merkliche parallele kinetische Racematspaltung beim Prozess der Amidkupplung,^[12] ähnlich wie bei einem auf Massenspektrometrie basierenden System, das kürzlich von Finn et al. entwickelt wurde.^[14] In dem hier vorliegenden Fall sind die *ee*-Werte durch Messung des Verhältnisses der relevanten Fluoreszenzintensitäten zugänglich. 8000 *ee*-Bestimmungen pro Tag sind möglich bei einer Genauigkeit von $\pm 10\%$. Es bleibt abzuwarten, ob die DNA-Mikroarraytechnik in einer analogen Weise für andere Substrattypen modifiziert werden kann.

Seto et al. beschrieben eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen, die sie als (EMDee) („enzymatic method for determining *ee*“) bezeichneten.^[15,20] Sie basiert darauf, dass ein geeignetes Enzym dazu genutzt werden kann, ein Enantiomer des Produkts einer katalytischen Reaktion selektiv umzusetzen. Die vielfach untersuchte katalytische Addition von Diethylzink **2** an Benzaldehyd **1** wurde als Testsystem zur Demonstration der Leistungsfähigkeit von EMDee ausgewählt. Das Reaktionsprodukt, 1-Phenylpropanol **3**, kann durch Verwendung der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium sp.* zu Ethylphenylketon **4** oxidiert werden, wobei dieser Prozess vollständig (*S*)-selektiv ist (Schema 1). Die Geschwindigkeit dieser enzymatischen Oxidation konnte durch UV-spektroskopische Verfolgung der Bildung von NADPH bei 340 nm gemessen werden.



Schema 1. Die Reaktionen, auf denen EMDee beruht, im Falle von 1-Phenylpropanol als Substrat für die Alkoholdehydrogenase.^[15]

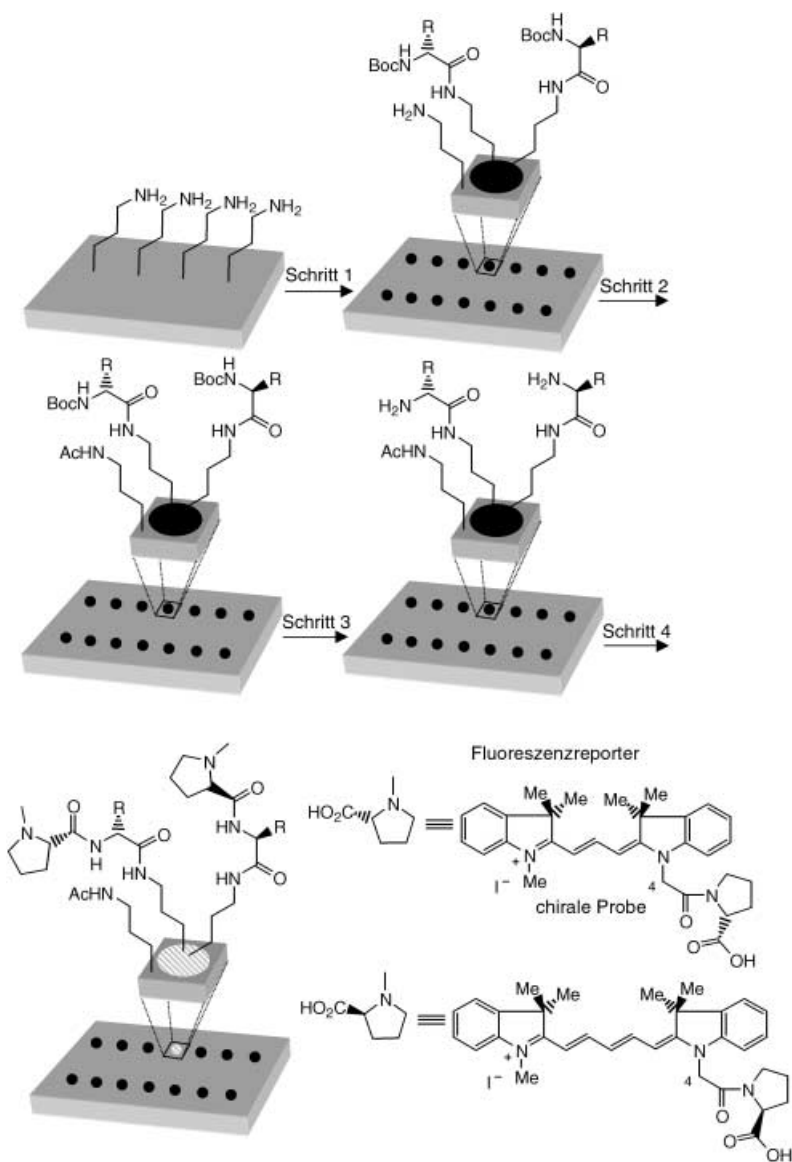


Abbildung 1. Reaktionsmikroarrays bei der Hochdurchsatz-*ee*-Bestimmung. Reagenzien und Bedingungen:^[12] Schritt 1: BocHNCHR₂CO₂H, PyAOP, *i*Pr₂NEt, DMF; Schritt 2: Ac₂O, Pyridin; Schritt 3: 10% CF₃CO₂H und 10% Et₃SiH in CH₂Cl₂, dann 3% Et₃N in CH₂Cl₂; Schritt 4: Pentafluorphenyldiphenylphosphonit, *i*Pr₂NEt, 1:1-Mischung der beiden fluoreszierenden Prolinderivate, DMF, -20°C . PyAOP = 7-Azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat.

Entscheidend für den Erfolg dieses Assays ist, dass die Geschwindigkeit der Oxidation ein direktes Maß für den *ee*-Wert ist (Abbildung 2).^[15] Der Hochdurchsatz wurde durch die Analyse von 100 Proben im 384er-Format mittels eines UV/Fluoreszenz-Plattenlesegeräts gezeigt. Jede Probe enthielt 1 μmol 1-Phenylpropanol **3** in einem Gesamtvolumen von 100 μL . Die Genauigkeit des *ee*-Werts beläuft sich auf $\pm 10\%$, wie in unabhängigen GC-Untersuchungen ermittelt wurde. Ungefähr 100 Proben können in 30 min ver-

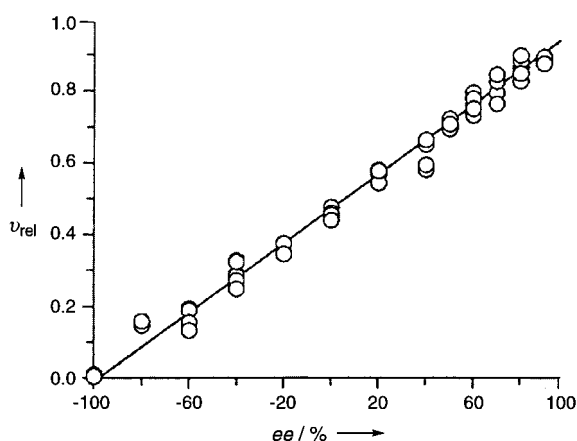


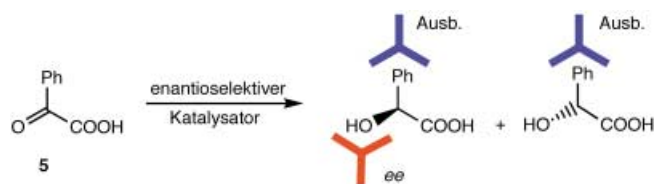
Abbildung 2. Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Oxidation von 1-Phenylpropanol gegen den *ee*-Wert (Ausgleichsgerade auf Basis der Michaelis-Menten-Formalismen für kompetitive Inhibitoren mit $[S] = [(S)\text{-}3]$ und $[I] = [(R)\text{-}3]$).^[15] Die Gesamtkonzentration an Alkohol ist konstant gehalten bei 10 mM.

arbeitet werden, entsprechend 4800 *ee*-Bestimmungen pro Tag.

Wie von den Autoren ausgeführt, kann das EMDee-Verfahren nicht zwischen Prozessen unterscheiden, die mit niedriger Enantioselektivität und hohem Umsatz ablaufen, und solchen, die mit hoher Enantioselektivität und niedrigem Umsatz ablaufen. Aus diesem Grund wurde EMDee dahingehend weiterentwickelt, dass es Informationen sowohl über *ee*-Werte als auch den Umsatz liefert.^[15] Dafür wurde in einem zweiten Satz an Assays die (*R*)-selektive Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* genutzt, um die Menge an (*R*)-**3** in der Mischung zu ermitteln. Wenn die Mengen an (*R*)-**3** und (*S*)-**3** bekannt sind, kann der Umsatz berechnet werden.

Es stellt sich nun die Frage der Verallgemeinerbarkeit des EMDee-Assays im Falle anderer chiraler Alkohole, bei denen die durch Alkoholdehydrogenase katalysierte Oxidation nicht mit so hoher Enantioselektivität verläuft. Theoretisch sollte der Test ebenfalls funktionieren, obgleich die Genauigkeit in solchen Fällen demonstriert werden müsste. Es dürfte leichter sein, eine andere, selektivere Alkoholdehydrogenase zu verwenden; es ist tatsächlich eine große Anzahl solcher Enzyme kommerziell erhältlich. Insgesamt bietet EMDee eine interessante Möglichkeit, den *ee*-Wert von Alkoholen im Hochdurchsatz mit Standardinstrumenten zu bestimmen. Natürlich muss dieser Assay für jeden neuen Fall eines zu untersuchenden chiralen Alkohols optimiert werden.

Über eine dritte neue Entwicklung berichteten Wagner und Mioskowski; sie betrifft das Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Katalysatoren mittels Enzymimmunoassays,^[16] einer Technik, die routinemäßig in der Biologie und Medizin angewendet wird. Bei diesem neuen Assay wurden (*R*)/(*S*)-Mischungen von Mandelsäure analysiert, die durch enantioselektive Ru-katalysierte Hydrierung von Benzoylameisensäure **5** erhalten wurden (Schema 2). Durch Nutzung eines Antikörpers, der an beide Enantiomere bindet, war es möglich, die Konzentration an Reaktionsprodukt zu bestimmen, und so den Umsatz zu berechnen. Der Gebrauch eines (*S*)-selektiven Antikörpers ermöglicht dann die Bestimmung des *ee*-Werts.



Schema 2. Darstellung des Hochdurchsatz-Screenings eines enantioselektiven Katalysators in einem kompetitiven Enzymimmunoassay.^[16] Der blau markierte Antikörper erkennt beide Enantiomere, der rot markierte Antikörper ist (*S*)-spezifisch und ermöglicht somit die Bestimmung von Ausbeute und *ee*-Wert.

Obgleich dieses Verfahren einigen Organikern kompliziert vorkommen mag und auch einige Details berücksichtigt werden müssen, können Antikörper gegen fast alle Verbindungen, die von Interesse sind, erzeugt werden. Darüber hinaus ist nur eine einfache automatische Ausrüstung, bestehend aus einem Plattenwascher und einem Plattenlesegerät (Absorption) notwendig. Es sind ungefähr 1000 *ee*-Bestimmungen pro Tag möglich, wobei die Genauigkeit $\pm 9\%$ beträgt.^[16]

Die hier beschriebenen neuen Hochdurchsatz-*ee*-Assays^[7, 12, 15, 16] haben die Liste der früher entwickelten Systeme deutlich erweitert.^[4] In den Laboratorien des Autors ist gerade ein weiterer *ee*-Assay entwickelt worden, der NMR-Detektion nutzt und mindestens 1000 *ee*-Bestimmungen pro Tag mit einer überraschend hohen Genauigkeit ermöglicht.^[17] Vielleicht ist ein Vorteil dieser Methode die Tatsache, dass Organiker mit der NMR-Spektroskopie gut vertraut sind. Die Entscheidung, welches *ee*-Screeningsystem genutzt wird, hängt stark von dem einzelnen analytischen Problem ab. Wenn für einen gegebenen Zweck ein Durchsatz von 300–700 Proben pro Tag ausreichend ist, dann reichen sogar klassische Gas- oder Flüssigchromatographie in geeignet modifizierter Form aus. Für solch ein System, bestehend aus zwei GC-Säulen in getrennten Öfen, einem Prep-and-load-Probengeber und einem PC, konnte gezeigt werden, dass es für bestimmte Substrate gut funktioniert (500–700 *ee*-Bestimmungen pro Tag).^[18] Die Präzision bei *ee*-Bestimmungen ist ein weiteres Kriterium, das beachtet werden muss, abhängig von dem speziellen analytischen Problem. Das Screening nach Treffern in der kombinatorischen asymmetrischen Übergangsmetallkatalyse oder in den frühen Phasen der gerichteten Evolution eines enantioselektiven Enzyms erfordert nicht zwangsläufig eine maximale Genauigkeit bei der *ee*-Bestimmung. Jedoch wird eine hohe analytische Präzision, z.B. bei den letzten Stufen eines Projekts der gerichteten Evolution, bei dem versucht wird, den *ee*-Wert von typischerweise 90 % schrittweise zu erhöhen, sehr wichtig.

[1] 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**.

[2] 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*, Pergamon, Oxford, **1994** (Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 12); 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**.
- [3] Siehe z. B.: a) M. B. Francis, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 987–991; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 937–941; b) S. R. Gilbertson, C.-W. T. Chang, *Chem. Commun.* **1997**, 975–976; c) C. Gennari, S. Ceccarelli, U. Piarulli, C. A. G. N. Montalbetti, R. F. W. Jackson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5312–5313; d) 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; e) 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; f) J. Long, J. Hu, X. Shen, B. Ji, K. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10–11; g) A. Berkessel, R. Riedl, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 215–219; h) S. Dahmen, S. Bräse, *Synthesis* **2001**, 1431–1449.
- [4] a) Übersicht über kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren: M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310; Übersicht über Screening von Biokatalysatoren: b) D. Wahler, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 152–158; c) F. M.-V. Varas, L. Hartman, A.-Shah, D. C. Demirjian, *ACS Symp. Ser.* **2001**, *776*, 41–54; d) Übersicht über enantioselektive „Detektoren“ im Miniaturformat: T. J. Edkins, D. R. Bobbitt, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 488A–496A.
- [5] a) 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; b) M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3701–3703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3589–3591; c) D. Zha, S. Wilensek, M. Hermes, K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2001**, 2664–2665.
- [6] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 407–412.
- [7] M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4329–4333; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4201–4204.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] a) K. Ding, A. Ishii, K. Mikami, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 519–523; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 497–501; b) M. T. Reetz, K. M. Kühling, H. Hinrichs, A. Deege, *Chirality* **2000**, *12*, 479–482; c) K. Mikami, R. Angelaud, K. Ding, A. Ishii, A. Tanaka, N. Sawada, K. Kudo, M. Senda, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 730–737; d) T. Hattori, Y. Minato, S. Yao, M. G. Finn, S. Miyano, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8015–8018.
- [11] R. A. van Delden, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3298–3300; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3198–3200.
- [12] G. A. Korbel, G. Lalic, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 361–362.
- [13] B. Phimister, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 1 (Suppl.).
- [14] J. Guo, J. Wu, G. Siuzdak, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1868–1871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1755–1758.
- [15] P. Abato, C. T. Seto, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9206–9207.
- [16] F. Taran, C. Gauchet, B. Mohar, S. Meunier, A. Valleix, P. Y. Renard, C. Créminon, J. Grassi, A. Wagner, C. Miokowski, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 132–135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 124–127.
- [17] M. T. Reetz, A. Eipper, R. Mynott, P. Tielmann, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [18] M. T. Reetz, K. M. Kühling, S. Wilensek, H. Husmann, U. W. Häusig, M. Hermes, *Catal. Today* **2001**, *67*, 389–396.
- [19] Ein Aufsatz zum Thema „DNA-Mikroarrays“ findet sich in diesem Heft: M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1276–1289.
- [20] Anmerkung in der Druckfahne: Berkowitz et al. beschrieben in einer unabhängigen Arbeit ein enzymatisches In-situ-Screeningsystem (ISES), das dem EMDee-Ansatz von Sato et al. ähnlich ist, als Hilfsmittel zur Katalysatorentdeckung. Enantioselektivität wurde hierbei allerdings (noch) nicht berücksichtigt: D. B. Berkowitz, M. Bose, S. Choi, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, Heft 9; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, issue 9.