



Katalysator-Substrat-Coimmobilisierung – eine Strategie zur Identifizierung von Katalysatoren in „Split-und-mix“-Bibliotheken**

Philipp Krattiger, Catherine McCarthy, Andreas Pfaltz und Helma Wennemers*

Die Entwicklung von hochaktiven und spezifischen Katalysatoren ist ein grundlegendes Ziel der Chemie. Da ein rationales Katalysatordesign häufig sehr schwierig ist, umfasst der Entwicklungsprozess oft die separate Synthese vieler potenzieller Katalysatoren und deren Untersuchung auf katalytische Eigenschaften in individuellen Reaktionsgefäßchen.^[1] Weitaus effizienter ist die gleichzeitige Untersuchung der Komponenten von „One-Bead-one-Compound“-Bibliotheken.^[1-5] Da es allerdings schwierig ist, die durch einen Katalysator auf einem einzelnen Harzkügelchen vermittelte Reaktion zu verfolgen, gibt es hierfür bisher nur wenige Screeningmethoden. Erfolgreiche Konzepte beruhen auf IR-Thermographie,^[2] der Generierung von unlöslichen, farbigen Reaktionsprodukten,^[3] fluoreszierenden pH-Indikatoren^[4] oder dem Einsatz von Gelen, die die freie Diffusion der Reaktionsprodukte verhindern.^[5] Mit Ausnahme der IR-Thermographie wurden die meisten Methoden für spezifische Reaktionen entwickelt, bei denen entweder eine pH-Änderung auftritt oder die Produkte farbig oder fluoreszierend sind. Hier stellen wir eine Methode vor, mit der für die meisten bimolekularen Reaktionen nach Katalysatoren in Split-und-mix-Bibliotheken gesucht werden kann.

Unser Konzept für die Identifizierung von Katalysatoren in One-Bead-one-Compound-Bibliotheken beruht auf der Immobilisierung eines Reaktionspartners zusammen mit der Bibliothekskomponente, dem potenziellen Katalysator, auf demselben Harzkügelchen. Dies kann auf einfache Weise durch einen bifunktionellen Linker erreicht werden, der an einem Ende den Reaktionspartner **A** und am anderen Ende die Bibliothekskomponente trägt (Abbildung 1). Wenn der Reaktionspartner **B** mit einem Farbstoff, mit einem Fluoro-

phor oder radioaktiv markiert ist, kommt es bei der Reaktion zwischen **A** und **B** zur kovalenten Verknüpfung des Marker-moleküls mit den Harzkügelchen, die aktive Katalysatoren tragen. Diese können dann leicht mithilfe eines Mikroskops detektiert werden.

Das Konzept beruht auf der Annahme, dass Reaktionen zwischen dem festphasengebundenen Reaktionspartner **A** und dem markierten Reaktionspartner **B** nur auf den Harzkügelchen ablaufen, die aktive Katalysatoren tragen. Kreuzkatalyse zwischen verschiedenen Harzkügelchen darf nicht auftreten. Hier demonstrieren wir die Durchführbarkeit der Methode anhand einer einfachen Testreaktion, der Acylierung eines Alkohols (Reaktionspartner **A**) mit einem farbstoffmarkierten Pentafluorphenyl(Pfp)-Ester (Reaktionspartner **B**).

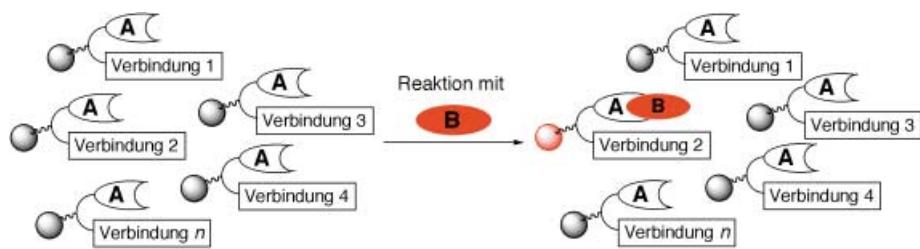


Abbildung 1. Konzept für die Suche nach Katalysatoren in One-Bead-one-Compound-Bibliotheken. In diesem Beispiel ist nur Verbindung **2** ein aktiver Katalysator.

Als erstes untersuchten wir, ob tatsächlich Reaktionen nur durch katalytisch aktive Verbindungen hervorgerufen werden, die sich auf demselben Harzkügelchen wie der Reaktionspartner **A** befinden. Aus diesem Grund wurde Poly(ethylenglycol)polystyrol (TentaGel)^[6] mit einem auf Lysin basierenden bifunktionellen Linker funktionalisiert, der an einem Ende einen primären Alkohol (Serin) trägt, am anderen Ende ein Derivat des Acylierungskatalysators 4-Dimethylaminopyridin (DMAP).^[7,8] Als Negativkontrolle für dieses Harz **1** diente das Harz **2**, das anstelle des DMAP-Derivates eine Acetylgruppe enthält. Beide Harze wurden codiert, um die Identifizierung von einzelnen Harzkügelchen zu ermöglichen (Schema 1).^[9]

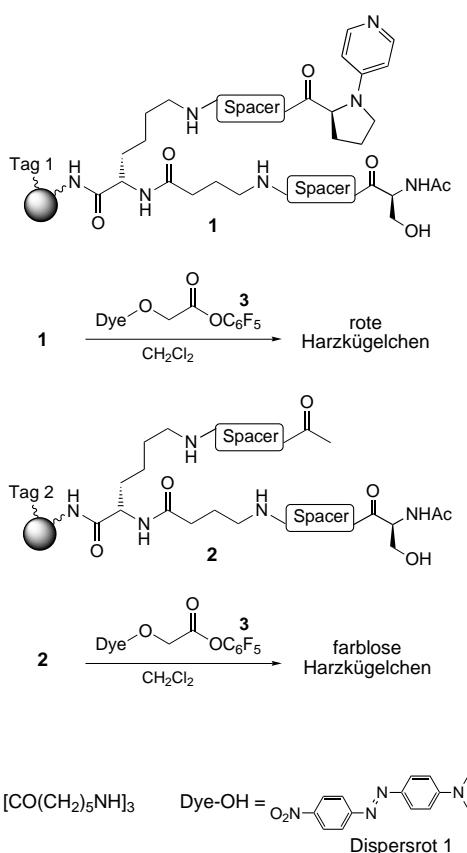
Nach Zugabe des roten Pfp-Esters **3**^[10] zum DMAP-funktionalisierten Harz **1** in CH_2Cl_2 in Konzentrationen von $\geq 2 \text{ mM}$ wurden die Harzkügelchen innerhalb von 30 Sekunden dunkelrot.^[11] Die Farbe verblasste auch durch intensives Waschen^[12] nicht, was zeigt, dass der Farbstoff kovalent mit den Harzkügelchen verbunden ist.^[13] Dagegen blieben die acetylierten Harzkügelchen (Harz **2**) unter identischen Bedingungen farblos. Ließ man eine Mischung der beiden Harze **1** und **2** mit dem Pfp-Ester **3** reagieren, wurde nur die Hälfte der Harzkügelchen rot, die andere Hälfte blieb farblos. Isolierung und Analyse von etwa 20 roten Harzkügelchen ergab, dass alle das DMAP-Derivat trugen, keines der acetylierten Harzkügelchen hatte die Farbe angenommen. Dies zeigt, dass die Reaktion nur auf demselben Harzkügelchen stattfindet, Kreuzreaktionen zwischen zwei Harzkügelchen finden nicht statt.

Nach diesen ersten Kontrollexperimenten erweiterten wir die Methode auf eine kombinatorische Bibliothek von

[*] Dr. H. Wennemers, Dipl.-Chem. P. Krattiger, Dr. C. McCarthy, Prof. Dr. A. Pfaltz
Departement Chemie, Universität Basel
St. Johanns-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-1105
E-mail: Helma.Wennemers@unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde durch die BACHEM AG und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. H.W. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Liebig-Stipendium und der BACHEM AG für eine Assistenzprofessur.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Reaktion der Harze **1** und **2** mit dem farbstoffmarkierten Pfp-Ester **3**.

Tripeptiden. Für den Aufbau dieser Bibliothek nach der Methode der codierten^[9] Split-und-mix-Synthese^[14] wurde das eine Ende des bifunktionellen Linkers genutzt. Das andere Ende des Linkers wurde wie zuvor mit einem von Serin abgeleiteten primären Alkohol funktionalisiert (Abbildung 2). Durch Verwendung von 15 verschiedenen Aminosäuren in jeder Position des Tripeptids entstand eine Bibliothek mit maximal $15^3 = 3375$ verschiedenen Komponenten.^[15] Die Bibliothek enthielt keine Aminosäuren, die selbst

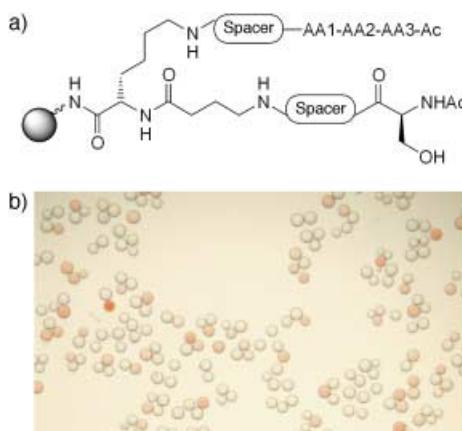


Abbildung 2. a) Tripeptid-Bibliothek. b) Blick durchs Mikroskop nach der Reaktion der Bibliothek mit **3**.

acyliert werden können, d.h., weder Ser, Thr, Cys noch Lys wurden eingesetzt. His wurde als schwacher Acylierungskatalysator verwendet. Mischen der Bibliothek mit dem farbstoffmarkierten Pfp-Ester **3** in einer Konzentration von 200 μM in CH_2Cl_2 für 75 min bei 20 °C, gefolgt von intensivem Waschen,^[12] ergab einige dunkelrote Harzkügelchen (Abbildung 2).^[16] Höhere Konzentrationen oder längere Reaktionszeiten bewirkten mehr rote Harzkügelchen und einen schlechteren Kontrast zwischen gefärbten und farblosen Harzkügelchen. Isolierung von 17 der roten Harzkügelchen und Analyse der codierenden Reportermoleküle lieferte die in Tabelle 1 aufgeführten aktiven Peptide.

Tabelle 1: Im kombinatorischen Screening gefundene Peptide.

AA3	AA2	AA1
L-Leu	L-Phe	L-His
L-Tyr	L-Val	L-His
D-Pro	L-Pro	L-His
L-Pro	D-Pro	D-His
D-Pro	D-His	D-His
D-Pro	L-His	L-His
L-Leu	D-His	L-His
L-Pro	L-His	L-Tyr
D-Pro	L-His	L-Tyr
L-His	D-His	D-Val
D-His	D-His	D-Val
D-His	L-Asn	D-Asp
D-His	L-Asn	L-Tyr
L-His	L-Asp	D-Asn
D-His	L-Phe	L-Leu
L-His	D-His	D-His
D-His	L-His	L-His

Alle aktiven Peptide enthielten mindestens ein Histidin: Zwei der 17 analysierten Tripeptide enthielten derer drei, fünf enthielten zwei und die restlichen zehn nur einen. Unerwarteterweise waren die Peptide nicht zufällige Kombinationen aller Aminosäuren mit His, sondern zeigten deutliche Präferenzen. In etwa der Hälfte der Sequenzen mit einem oder zwei His-Resten wird His auf der N-terminalen Seite durch Pro flankiert. Dies ist signifikant mehr als statistisch zu erwarten und lässt vermuten, dass Dipeptide, die eine Pro-His-Sequenz enthalten, aktiver sind als His allein.

Um sicherzustellen, dass die detektierten Peptide auch katalytisch aktiv sind, wenn sie und der Alkohol in Lösung und nicht mit dem Harz verknüpft sind, synthetisierten wir die His enthaltenden Peptide **4–9** und bestimmten ihre relativen katalytischen Aktivitäten in NMR-Kinetik-Experimenten. Das Peptid Ac-Pro-Phe-NHPr (**10**; Pr = Propyl) wurde als Negativkontrolle untersucht.

4: Ac-L-His-NHPr **5:** Ac-L-Pro-L-His-NHPr
6: Ac-L-His-L-His-NHPr **7:** Ac-D-His-L-His-NHPr
8: Ac-L-Pro-L-His-L-His-NHPr **9:** Ac-L-His-L-His-L-His-NHPr
10: Ac-L-Pro-L-Phe-NHPr

Die NMR-Untersuchungen wurden mit einer Mischung aus Benzylalkohol, Triethylamin (je 1 Äquiv.), *p*-Nitrophenyl-

acetat (2 Äquiv.) und 10 Mol-% des Peptids in $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (4:1) bei einer Peptidkonzentration von 25 mm durchgeführt. Diese Bedingungen erlauben die Durchführung der Studien in einem angemessenen Zeitraum. Allerdings läuft unter diesen Bedingungen bereits eine Hintergrundreaktion ohne Katalysator ab, deren Geschwindigkeit mit der des Negativkontroll-Peptids **10** identisch ist (Abbildung 3).

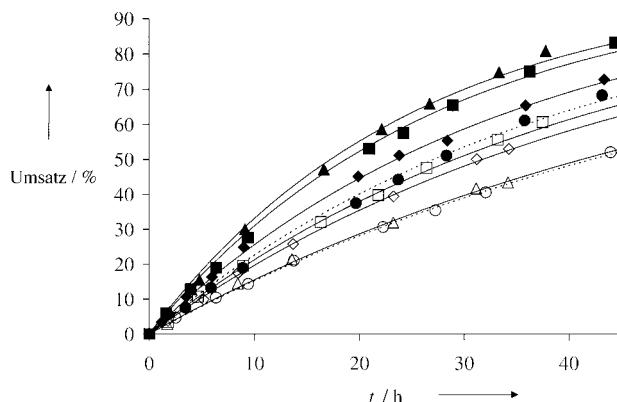


Abbildung 3. Kinetische NMR-Untersuchungen mit 10 Mol-% der Peptide **4–6, 8–10** und Imidazol ($k [10^{-3} \text{ h}^{-1}]$): **9** (\blacktriangle , $k=40$), **8** (\blacksquare , $k=37$), **6** (\blacklozenge , $k=30$), Imidazol (\bullet , gestrichelte Linie, $k=26$), **5** (\square , $k=24$), **4** (\lozenge , $k=22$), **10** (\triangle , $k=17$), Hintergrund (\circ , gestrichelte Linie, $k=17$); Fehler 5%.

Die Peptide **4–9** beschleunigen die Reaktion mit vergleichbarer Aktivität wie Imidazol. His (**4**) ist der schlechteste Katalysator, das Dipeptid Histidylhistidin (**6**) ist ungefähr doppelt so aktiv.^[17] Die diastereomeren Dipeptide **6** und **7** sind ähnlich aktiv, was zeigt, dass die relative Konfiguration kaum Einfluss auf die Aktivität hat (Daten für **7** in Abbildung 3 nicht gezeigt). Ein Pro am N-Terminus von His bringt eine signifikante Steigerung der Aktivität, was besonders beim Vergleich des Tripeptids **8** mit dem Dipeptid **6** und dem Tripeptid **9** deutlich wird. Obwohl **8** nur zwei His-Reste und **9** drei enthält, sind beide ungefähr gleich aktiv. Dieses Resultat korreliert gut mit dem kombinatorischen Experiment, in dem beide Sequenzen gleich häufig auftraten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Immobilisierung einer Bibliothek von potenziellen Katalysatoren zusammen mit einem Reaktionspartner **A** an den Enden eines bifunktionellen Linkers und die Reaktion dieser Harzkügelchen mit einem markierten Reaktionspartner **B** eine gute Methode für die Identifizierung katalytisch aktiver Komponenten in Split- und mix-Bibliotheken ist. Obwohl diese Arbeit als Konzeptstudie gedacht war und nicht auf die Entwicklung von hochaktiven Acylierungskatalysatoren wie DMAP^[7] oder die kurzen Peptide von Miller et al.^[4,5b,18] ausgelegt war, resultierte daraus das Dipeptid-Motiv Pro-His als vielversprechender Startpunkt für eine zweite Bibliotheksgeneration.

Wir haben hiermit eine generelle Methode für den Test der Komponenten kombinatorischer Split-und-mix-Bibliotheken auf ihre katalytischen Aktivitäten in bimolekularen Reaktionen entwickelt. Kürzlich erschienene Arbeiten zeigen

nicht nur den Wert von kurzen Peptiden als Katalysatoren, sondern auch die Schwierigkeiten des rationalen Designs katalytisch aktiver Peptide.^[18] Unsere kombinatorische Methode ist ideal für das Testen von Peptid-Bibliotheken – aber auch von Bibliotheken anderer kleiner Moleküle – und sollte daher die Entdeckung von Peptidkatalysatoren für präparativ wichtige Reaktionen vorantreiben.

Eingegangen am 23. Oktober 2002,
veränderte Fassung am 3. Februar 2003 [Z50422]

Stichwörter: Acylierungen · Immobilisierung · Kombinatorische Chemie · Peptide

- [1] Übersichtsartikel: a) H. Wennemers, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2001**, *4*, 273–285; b) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 312–329; c) S. Dahmen, S. Bräse, *Synthesis* **2001**, 1431–1449; d) 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; e) R. H. Crabtree, *Chem. Commun.* **1999**, 1611–1616; f) K. D. Shimizu, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1885–1889.
- [2] S. J. Taylor, J. P. Morken, *Science* **1998**, *280*, 267–270.
- [3] A. Berkessel, D. A. Héault, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 99–102; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 102–105.
- [4] a) G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6496–6502; b) G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4306–4307.
- [5] a) M. Müller, T. W. Mathers, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3929–3931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3813–3815; b) R. F. Harris, A. J. Nation, G. T. Copeland, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11270–11271.
- [6] TentaGel S NH₂ von Rapp Polymere. E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113–129.
- [7] a) E. J. Delaney, L. E. Woods, I. M. Klotz, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 799–807; b) G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 602–615; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569–583.
- [8] a) Anstelle von Serin wurde Glycolsäure mit dem gleichen Ergebnis eingesetzt. b) Lange Spacer (27 Atome pro Arm) wurden verwendet, um höchstmögliche konformativie Freiheit zwischen dem Katalysator und dem Alkohol zu gewährleisten. Allerdings führten auch kürzere oder längere Spacers an jedem Arm zu dem gleichen Ergebnis (siehe Hintergrundinformationen).
- [9] a) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. H. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926; b) H. P. Nestler, P. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723–4724.
- [10] H. De Muynck, A. Madder, N. Farcy, P. J. De Clercq, M. N. Pérez-Payán, L. M. Öhberg, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 149–152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 145–148.
- [11] Eine kleine Zahl ($\leq 0.1\%$) von Harzkügelchen blieb farblos, was zeigt, dass das Harz nicht vollkommen homogen ist. Katalysatoren auf diesen Harzkügelchen können nicht detektiert werden.
- [12] Typisches Schema für das Waschen: CH_2Cl_2 (6 ×), DMF (3 ×), CH_2Cl_2 (3 ×), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (3:1) (3 ×), CH_2Cl_2 (3 ×), $i\text{PrOH}/\text{NET}_3$ (3:1) (3 ×), $i\text{PrOH}$ (3 ×); 3 mL jeweils 1–2 min.
- [13] Mit DMAP funktionalisierte Harzkügelchen ohne Hydroxygruppe blieben farblos.
- [14] a) Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487–493; b) K. S. Lam, S. E. Salmon,

E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82–84.

[15] AA1 und AA3 = Gly, D-Val, L-Ala, L-Leu, D-Pro, L-Pro, D-Phe, L-Tyr, D-His, L-His, D-Arg, D-Asp, L-Glu, D-Asn, L-Gln; AA2 = Gly, L-Val, D-Ala, D-Leu, D-Pro, L-Pro, L-Phe, D-Tyr, D-His, L-His, L-Arg, L-Asp, D-Glu, L-Asn, D-Gln.

[16] Mindestens drei theoretische Kopien der Bibliothek wurden pro Screening eingesetzt, um die Anwesenheit jeder Bibliotheks-komponente zu gewährleisten. a) K. Burgess, A. I. Liaw, N. Y. Wang, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2985–2987; b) P.-L. Zhao, R. Zambias, J. A. Bolognese, D. Boulton, K. T. Chapman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10212–10216.

[17] Dieses Resultat kann nicht mit der Aktivität von 20 Mol-% von **4** verglichen werden, da die Löslichkeit von **4** das Experiment nicht zulässt.

[18] Übersichtsartikel: a) E. J. Jarvo, S. J. Miller, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2481–2495; b) H. Gröger, J. Wilken, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 545–548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 529–532.
