

Neue chemische Strukturen durch Mikrofluidiksysteme

Tiago Rodrigues, Petra Schneider und Gisbert Schneider*

Chemische Biologie · Lab-on-a-Chip ·
Organische Synthese · Wirkstoff-Forschung

Mikrofluidiksysteme werden für viele Anwendungen im Bereich der chemischen Forschung und Entwicklung eingesetzt, einschließlich der Miniaturisierung von (bio)organischen Synthese- und (Bio)analysemethoden. Gegenwärtig beobachten wir den stetig wachsenden Einsatz von Mikrofluidikverfahren bei der Erforschung neuer chemischer Substanzen. Diese neuen Techniken haben bereits einen spürbaren Einfluss auf die chemische Biologie und molekulare Medizin. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir den aktuellen Stand der Forschung und stellen die jüngsten Fortschritte für die Anwendung von Mikrochip-Reaktoren sowie kleinen und mittelgroßen Coil-Reaktoren in der Synthese bioaktiver Substanzen vor und geben einen Ausblick auf mögliche künftige Anwendungen dieser vielversprechenden Technologie.

1. Einleitung

Kontinuierliche Fluss-Systeme haben ein großes Potenzial für verschiedenste Forschungsbereiche, besonders in der chemischen Synthese und Analytik sowie der biologisch-pharmazeutischen Forschung und Entwicklung.^[1] Im Laufe des vergangenen Jahrzehnts sind miniaturisierte Mikrofluidik-Technologien zu vergleichsweise kostengünstigen Geräten herangereift und ermöglichen heute vielfältige Analysen bei gleichzeitig hoher Auflösung und kurzen Prozesszeiten.^[1,2] Mikroflussverfahren arbeiten mit kleinen Flüssigkeitsvolumina in geometrisch definierten Umgebungen, die in unterschiedliche Funktionseinheiten unterteilt werden können, z. B. Mischer, Reaktoren und Detektoren. Üblicherweise sind die Flüsse in Mikroreaktoren turbulenzfrei (laminar) und durch eine niedrige Reynolds-Zahl (Re) gekennzeichnet.^[3] Diese besondere Eigenschaft führt zum diffusionskontrollierten Vermischen chemischer Verbindungen im Bereich der Grenzflächen von konvergierenden Flüssigkeitsströmen.^[4] Die geringen Abmessungen und entsprechend kurzen Entfernungen in den Mikrokanälen ermöglichen zudem einen wohlkontrollierten Wärme- und Massentransport. Zudem kann die Mischeffizienz in Mikroreaktoren mithilfe einer komplexen Kanalgeometrie und gepulsten Flüssen weiter

gesteigert werden. Das hohe Verhältnis der Mikrokanaloberfläche zum Kanalvolumen ist oftmals ausschlaggebend für die vielfach beobachteten, deutlich erhöhten Durchsätze und Ausbeuten in Mikroreaktoren.^[3b,5] Konsequenterweise haben solche Flussverfahren eine breite Anwendung gefunden, speziell in der Analytik, beispielsweise der Massenspektrometrie,^[6] aber auch in der Proteinkristallisation,^[7] dem Hochdurchsatzscreening,^[8] der Einzelzellanalyse^[9] und der kontrollierten Wirkstoff-Abgabe,^[10] um nur einige wichtige Bereiche zu nennen.^[11] Je nach gewünschtem Einsatzgebiet, den erwarteten Temperatur- und Druckbereichen und der Korrosivität der verwendeten Flüssigkeiten werden Mikroreaktoren aus verschiedenen Materialien hergestellt, z. B. aus Metall, Polymeren, Glas, Siliciumkeramik und vielen weiteren Werkstoffen. Der Herstellungsprozess selbst soll hier jedoch nicht weiter beschrieben werden und wurde bereits an anderer Stelle ausführlich dargelegt.^[12]

Trotz des nachweislichen Potenzials für die organische Synthese werden solche miniaturisierten Flussreaktorsysteme erst seit relativ kurzer Zeit breit in der Chemie eingesetzt.^[13] So verwendeten beispielsweise deMello und Mitarbeiter einen integrierten Synthese-Analytik-Aufbau zur Durchführung von Ugi-Mehrkomponentenreaktionen,^[14] während Kreis et al. mithilfe eines photochemischen Mikroreaktors Allyl-Trifluormethan-Verbindungen herstellten.^[15] In einer anderen Anwendungsstudie wurden aromatische nukleophile Substitutionsreaktionen auf einem Chip durchgeführt und mit der „simulated moving bed“(SMB)-Chromatographie zur kontinuierlichen Aufreinigung der Produkte gekoppelt.^[16]

[*] Dr. T. Rodrigues, Dr. P. Schneider, Prof. Dr. G. Schneider
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich
Departement für Chemie und Angewandte Biowissenschaften
Vladimir-Prelog-Weg 4, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: gisbert.schneider@pharma.ethz.ch

Mikroflussverfahren sind besonders wertvoll für die Durchführung von Reaktionen, die normalerweise unter harschen Bedingungen (z.B. überhitzte Lösungsmittel) erfolgen,^[17] sowie für wenig beachtete chemische Reaktionen, da man diese im Fluss oftmals besser steuern und sicherer durchführen kann als mit konventionellen Verfahren.^[18] Die Verbreitung und Ansammlung großer Mengen von gefährlichen und toxischen Ausgangsmaterialien oder Nebenprodukten wird minimiert, und diese können leicht aufgefangen und kontinuierlich entsorgt werden. Mikrofluss-Systeme werden in diesem Zusammenhang auch effizient für die Radionuklidmarkierung von Tracer-Molekülen für die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) eingesetzt.^[19] Auch die Kohlenhydratchemie,^[20] mehrstufige Synthesen^[21] und C-C-Kupplungsmethoden^[22] haben bereits nachweislich von solchen Ansätzen profitiert. So gelangen Buchwald et al. die schnelle aromatische Trifluormethylierung^[23] und die Synthese chiraler β -Arylketone in einem Stahlreaktor, der mit Spritzenpumpen bedient wurde.^[24] Verschiedenste kontinuierliche Flussverfahren sind bereits entwickelt und in vielen Bereichen der Chemie eingesetzt worden, um einen schnellen und effizienten Zugang zu innovativen chemischen Strukturen mit den gewünschten Eigenschaften zu erhalten.^[2] In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir nun jüngste Fortschritte auf dem Gebiet der Mikrofluidik-basierten organischen Synthese als eine Schlüsseltechnologie für die künftige Wirkstoff-Forschung. Wir beschreiben ausgewählte Chip- und Coil-Reaktor Anwendungen zur Findung wirkstoffartiger Substanzen mit gewünschten biochemischen und biologischen Eigenschaften.

2. Anwendungen in der Wirkstoff-Forschung

2.1. Mikrochip-Reaktoren

Seit der Einführung dieser neuen Technologie hat die pharmazeutische Industrie mit großem Interesse die Mikrofluidik-basierte organische Synthese zur Durchsatzsteigerung bei der Leitstrukturfindung eingesetzt.^[25] Kurze Reaktionszeiten, die Möglichkeit, mit geringsten Mengen an Reaktanten und Lösungsmitteln zu arbeiten, niedrige Kosten und die Vermeidung der Lagerung von Materialien gelten als entscheidende Vorteile in einem Sektor, der mit großem finanziellem Aufwand neue Wirkstoffe entwickelt.^[26] Daher ist man bestrebt, wirtschaftliche und nachhaltige Lösungen zur Wirkstoff-Findung zu etablieren, die sich auf die Verkürzung des Synthese- und Testzyklus konzentrieren, mit einem molekularen Designschritt als Teil des Kreislaufs.^[27]

So haben Warrington et al. von GlaxoSmithKline (GSK) bereits 2003 eine Studie über die Verwendung eines Mikrochip-Reaktors zur Synthese einer kleinen Sammlung von 1,3-Dicarbonylverbindungen und Hydrazinen durchgeführt. Die halbautomatische Synthese einer kombinatorischen Pyrazol-Bibliothek mithilfe von Knorr-Chemie war so abgestimmt, dass die Verweilzeit im Reaktor von 210 s zu einer nahezu vollständigen Umsetzung der Reaktanten führte.^[28] Die Integration von Synthese, Aufreinigung und biologischem Testen sollte nicht nur die Dauer eines einzelnen Synthese-Test-



Tiago Rodrigues studierte pharmazeutische Wissenschaften (M. Sc. 2006) an der Universität Lissabon (Portugal) und promovierte 2010 (Ph.D.) in medizinischer Chemie unter Anleitung von Dr. Francisca Lopes. Seit 2011 forscht er als Postdoktorand in der Gruppe von Prof. Gisbert Schneider an der ETH Zürich. Seine Forschungsschwerpunkte liegen im automatisierten De-novo-Design und der Mikrofluidik-gestützten Synthese neuer bioaktiver Substanzen.



Petra Schneider promovierte in technischer Chemie in der Gruppe von Prof. Karl-Heinz Richert an der TU Berlin (1996). Sie arbeitete anschließend als Postdoktorandin bei F. Hoffmann-La Roche Diagnostics in Kaiseraugst (Schweiz) und wechselte 1999 zum Global Chemistry Team bei Roche Pharmaceuticals in Basel. Bevor sie 2010 an die ETH Zürich ging, arbeitete sie als Beraterin in der pharmazeutischen Industrie. Sie ist Mitgründerin und amtierende Geschäftsführerin der inSili.com GmbH (Zürich), einer Ausgründung der ETH Zürich.



Gisbert Schneider promovierte in Biochemie in der Gruppe von Prof. Georg Büldt an der FU Berlin (1994). Nach mehreren internationalen Forschungsaufenthalten trat er in die Pharmaforschung bei F. Hoffmann-La Roche in Basel ein, wo er die Chemieinformatik-Gruppe leitete. Er habilitierte sich für Biochemie und Bioinformatik an der Universität Freiburg i. Br. 2002–2009 war er Inhaber des Beilstein-Lehrstuhls für Chemie- und Bioinformatik an der Goethe-Universität in Frankfurt a.M. Seit 2010 ist er an der ETH Zürich als Professor für computergestütztes Wirkstoffdesign tätig.

Zyklus drastisch verringern, sondern auch das „Echtzeit“-Design und/oder die Optimierung der nächsten Generation chemischer Kandidaten ermöglichen.^[29] Die Gruppe bei GSK hat einen solchen Versuchsaufbau beschrieben, der die Synthese von Sulfonamiden wie auch von Methylestern ermöglicht und eine direkte Kopplung mit dem entsprechenden Bioassay gegen T-Zell-Tyrosinphosphatase vorsieht (Abbildung 1A–C). Der verwendete NS110-Caliper-Chip enthält zwölf verschiedene Kanäle mit Weiten von 29 bis 74 μm und Längen bis zu 40 mm. Die Konzentrationen der Reaktanten, die Art des Lösungsmittels und die Flussgeschwindigkeit wurden variiert, um die Ausbeute der Produkte zu optimieren. Das Methylesterderivat **1** wurde in einer Eintopfreaktion, gefolgt von einer $\text{S}_{\text{N}}2$ - und *trans*-Veresterung, in Methanol hergestellt. Methylester **1** und die Sulfonamide **2–4** zeigten eine Inhibierung des Zielenzym von ca. 50 % bei einer Konzentration von 60 μM (Abbildung 1B).^[26a] Aufbauend auf einer Serie von grundlegenden Arbeiten zur Verwendung von Mikrofluss-Systemen in der Leitstruktursynthese und -optimierung wurde das Konzept der „Automated Lead Optimization Platform“ (ALOE) als eine konsequente Weiterentwicklung veröffentlicht. Mit ALOE konnte die Zeit für die

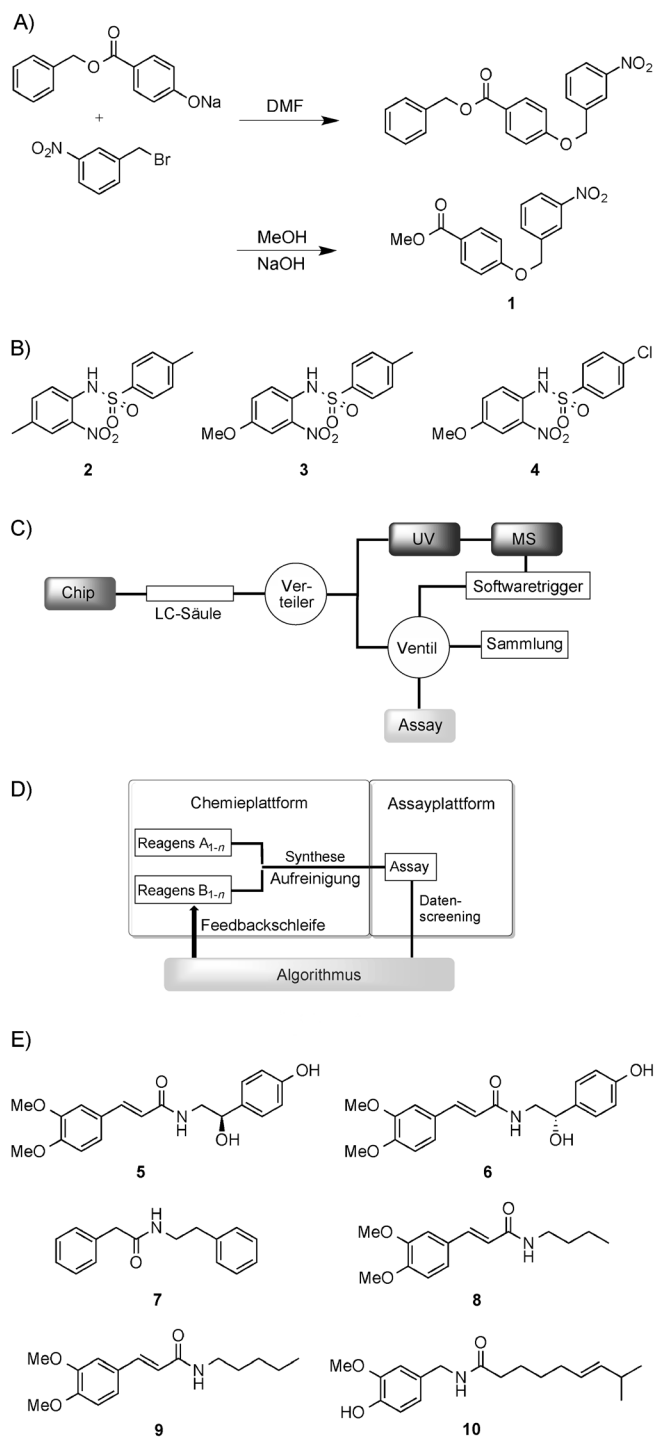


Abbildung 1. A) Beispiel einer niedermolekularen Verbindung, die mit einem Mikrochip-Reaktor synthetisiert wurde. B) Sulfonamide mit IC_{50} -Werten von etwa $60 \mu M$ gegen T-Zell-Tyrosinphosphatase. C) Integrierter Aufbau eines Mikrochip-basierten Aufreinigungs-Detektions-Testsystems.^[28] D) ALOE-Aufbau. E) Bioaktive Amidverbindungen, die mithilfe von Mikrofluss-Synthese gewonnen wurden.

Synthese-Assay-Design-Zyklen nochmals deutlich verringert werden (Abbildung 1D). Ein wichtiger Aspekt war dabei die Steuerungssoftware, die über einen speziellen Algorithmus die Auswahl von Synthesebausteinen mithilfe eines Bioaktivitätsvorhersagemodells vornimmt.^[30] Verschiedene Reak-

tionen wurden ausprobiert und für einen T-förmigen oder Caliper-Chip optimiert.^[31] Beide Reaktoren sind geeignet zur Durchführung von nukleophilen aromatischen Substitutionsreaktionen, Nitrostyrol-Reduktionen sowie Sulfonamid- und Amidbildungen. Die Reaktionen wurden unbeaufsichtigt durchgeführt und die Reaktanten mittels Elektroosmosefluss bei Flussgeschwindigkeiten von unter $3 \mu L \min^{-1}$ gefördert. Diese Versuchsanordnung resultierte in höheren Ausbeuten und bedeutend kürzeren Reaktionszeiten als die Vergleichsreaktionen im klassischen Ansatz. So wurden die Verbindungen **5–10** mit unterschiedlichen Bioaktivitäten (z.B. Antiapoptoseeffekten und Matrix-Metalloprotease-12-Inhibierung) erhalten.^[30] Von Cresset Pharmaceuticals wurde 2007 eine auf einem ähnlichen Prinzip aufbauende De-novo-Syntheseplattform vorgestellt.^[32]

Etwa zur gleichen Zeit veröffentlichten Schwalbe et al. einen kurzen und skalierbaren Prozess für die Synthese von Ciprofloxazin. Dieses Mikrofluss-System ermöglichte die Synthese einer kombinatorischen Fluorchinolon-Bibliothek mit mehreren Substitutionsstellen. Die Acylierung von β -Dimethylaminoacrylat mit Trifluorbenzoesäurechlorid lieferte das Schlüsselzwischenprodukt für die nachfolgende Diversifizierung durch Michael-Reaktion und nukleophile aromatische Substitution.^[33]

Kosteneffiziente On-Chip-Synthesen bioaktiver Substanzen werden auch verstärkt im akademischen Umfeld verfolgt. Reutlinger et al. berichteten kürzlich über die schnelle Optimierung einer On-Chip-Reaktion zum Aufbau einer Target-Familien-orientierten kombinatorischen Imidazopyridin-Bibliothek.^[34] Eine fokussierte Substanzsammlung wurde durch Ugi-Chemie erhalten, wobei die Reaktion lediglich 0.3 s pro Verbindung dauerte, durchgeführt auf einem Mikrochip-Reaktor mit einem Gesamtvolumen von $5 \mu L$ (Abbildung 2).

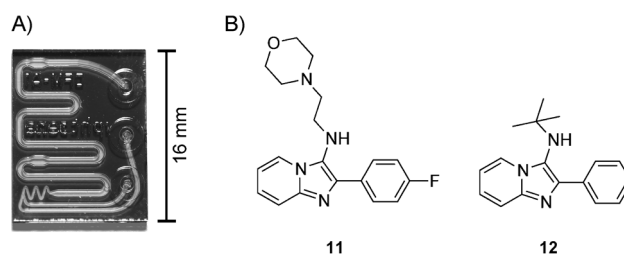


Abbildung 2. Mikrochip-Reaktor (A) für die Synthese der GPCR-Antagonisten **11** und **12** (B).

Off-Line-Kopplung mit einer Computersoftware zur Vorhersage von Liganden-Zielprotein-Assoziationen ermöglichte so die Identifizierung von Grundgerüsten, die G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) modulieren, darunter hoch ligandeneffiziente (LE -)Antagonisten von Adenosin $A_{1/2B}$ und adrenergen $\alpha_{1A/B}$ -Rezeptoren. Beispiele sind die Verbindungen **11** und **12** mit $LE > 0.3$ für den Adenosin- A_{2B} - bzw. adrenergen α_{1B} -Rezeptor.^[34]

Auch Klick-Reaktionen sind ein wichtiges Forschungsgebiet für die chemische Biologie.^[35] Speziell die Huisgen-Cycloaddition eines Alkins mit einem Azid hat eine hohe Aufmerksamkeit erhalten und essenzielle Fortschritte er-

möglichst.^[36] 2006 übertrugen Kolb, Tseng und Mitarbeiter die Vorteile der In-situ-Klick-Chemie auf eine automatisierte parallele Mikrofluidik-Testplattform. Ausgehend von einer kleinen Sammlung unterschiedlichster Synthesebausteine wurden insgesamt 32 Reaktionsprodukte auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung von Carboanhydrase II (bovin) getestet. Die Generierung dieser fokussierten Substanzsammlung dauerte nur eine halbe Stunde bei gleichzeitig minimalem Verbrauch an gelösten Substanzmengen.^[37] Mit einer neuen Generation dieses Mikrochips gelang Wang et al. die Hochskalierung des gesamten Prozesses und die Synthese und Testung von 1024 Reaktionsprodukten (Abbildung 3). Dieses Mikrofluidiksystem umfasst einen Festphasen-Extraktionsprozess zur Aufreinigung und integriert ein Elektrospray-Massenspektrometer sowie ein Steuerungsmodul für mehrere Reaktionen zur Erhöhung der Empfindlichkeit und des Durchsatzes der nachgeschalteten Analytik. Diese Maßnahmen verringerten den Reagentienverbrauch weiter und führten zu Prozesslaufzeiten von 17 s pro Reaktion und 15 s pro Test gegenüber 30 min auf dem Originalsystem.^[38]

2.2. Mikro- und Meso-Coil-Reaktoren

Mikro- und Meso-Coil-Reaktoren werden bereits breiter in der Wirkstoff-Findung und -Entwicklung angewendet als der Mikrochip-Reaktor, zumeist zur Erhöhung der Produktivität im industriellen Umfeld. Tatsächlich werden Coil-Rohrreaktoren in allen Phasen der Wirkstoff-Entwicklung, einschließlich der Nominierung des klinischen Kandidaten,

verwendet. Ein Beispiel sind die bei Pfizer eingesetzten Systeme.^[39] Bei Abbott wurde eine auf Mikrofluidikchemie beruhende Synthese- und Aufreinigungsplattform für die in der pharmazeutischen Forschung am häufigsten verwendeten chemischen Umsetzungen gebaut, darunter die Bildung von Amidinen, Triazolen, Sulfonylen und Harnstoffen, reduktive Aminierungen und nukleophile Substitutionsreaktionen. Die Reaktionen laufen innerhalb von 10 min mit einer Flussgeschwindigkeit von $146 \mu\text{L min}^{-1}$ ab. So konnten bis zu 48 Substanzen innerhalb von fünf Tagen hergestellt werden.^[40] Auch die Synthese von wirkstoffähnlichen Thiazolen und Pyrazolen in Meso-Coil-Reaktoren wurde beschrieben.^[41] Coil-Reaktoren können aber auch für schwierige Reaktionen verwendet werden. Wissenschaftler bei Amgen haben kürzlich die Hydrierung im Durchfluss eines Zwischenproduktes zur Herstellung einer 120-teiligen Bibliothek von 1-Aryl-4-aminopiperidinen veröffentlicht,^[42] und auch Ley und Mitarbeiter haben die Synthese einer fokussierten Bibliothek von wirkstoffähnlichen Pyrrolidinen in einer integrierten Fluss- und Batch-Synthese beschrieben.^[43]

Aufbauend auf den Erfahrungen früherer Versuche hat die Firma Cyclofluidic Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) zur Entdeckung neuer Abl-Kinase-Inhibitoren verwendet. Auch hier wurden Mikrofluss-Synthese, automatische Aufreinigung und Analyse direkt mit dem Bioassay gekoppelt (Abbildung 4A). Die Computer-gestützte Vorhersage der Bioaktivität der Substanzen erfolgte mit einem Random-Forest-Regressionsmodell, das mit jeder Synthese-Iteration unter Berücksichtigung der Testergebnisse neu berechnet wurde. Mit diesem automatisierten Prozess konnte

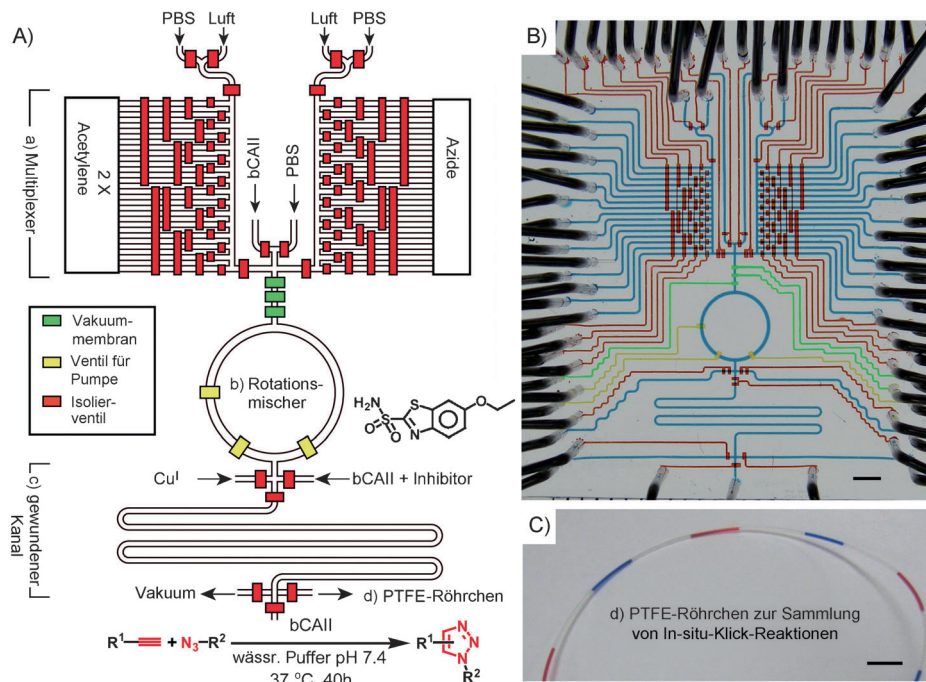


Abbildung 3. A) Eine integrierte Mikrofluidik-Plattform für die In-situ-Klick-Chemie und Suche nach neuen Carboanhydrase-II-Inhibitoren. Die Prozess-Steuerung wurde von einer Computersoftware übernommen. bCAII = bovine Carboanhydrase II, PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, PTFE = Polytetrafluorethylen. B) Bild des tatsächlichen Geräts, wobei die verschiedenen Kanäle mit Farbstoffen beladen wurden (siehe (A)). In (A) sind die Flüssigkeitskanäle blau markiert. C) Gefäß zum Auffangen der Reaktionsprodukte. Die schwarzen Skalierungsbalken haben 3 mm Länge (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [38], Copyright RSC 2009).

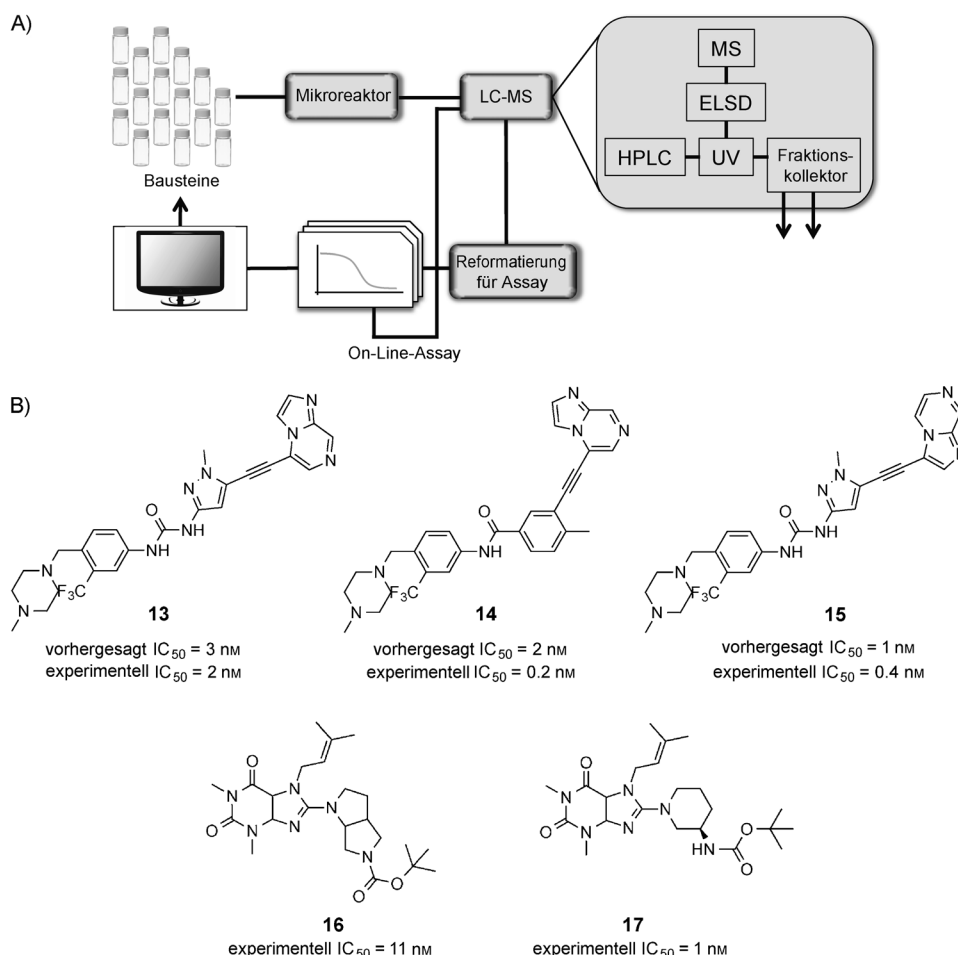


Abbildung 4. A) Integrierte, vollautomatische Cyclofluidics-Design-Synthese-Assay-Plattform zur Wirkstoff-Findung. Nach der Initiierung kann das System mehrere Zyklen ohne manuelle Intervention durchlaufen. ELSD = Evaporating Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstretedetektor). B) Beispiele für mit dem automatischen System gefundene Abl1-Kinase-Inhibitoren (**13–15**) sowie DPP4-Antagonisten (**16** und **17**; Details siehe Lit. [44]).

durch die Variation des rechten Heterocyclus (Sonogashira-Reaktion) ein neues Templat- und Hinge-Bindungs-Motiv nach 21 iterativen Synthese-Test-Schritten gefunden werden (ca. 24 h, z.B. **13–15**; Abbildung 4B), mit $pIC_{50} > 8$ sowohl gegen den Wildtyp als auch gegen klinisch relevante Mutationen der Abl1-Kinase.^[44] Mit der gleichen Versuchsanordnung wurden auch Xanthinderivate als Dipeptidylpeptidase-4(DPP4)-Antagonisten identifiziert, z.B. **16** und **17**. Die Daten der automatischen Synthese-Test-Plattform stimmten gut mit den konventionell bestimmten Bioaktivitäten überein. Dieser Befund unterstreicht die Leistungsfähigkeit einer vollintegrierten Mikrofluss-Synthese-Plattform in der frühen Wirkstoff-Findung. Czechtizky und Mitarbeiter präsentierten damit zum ersten Mal ein funktionierendes, rein durchfluss-basiertes Bioassayverfahren, das sogar IC_{50} -Werte liefert.^[45]

Kürzlich haben Wissenschaftler der F. Hoffmann-La Roche AG von einem System berichtet, das gleich mehrere Schwachstellen bisheriger Leitstrukturprogramme beseitigt (Abbildung 5), z.B. das zeitraubende Substanzmanagement und den umständlichen Materialtransfer zwischen der Synthese und der biologischen Testung. Die Amidierungsreaktionen wurden in einem Vapourtec-R4-Fluss-Synthesizer

realisiert, der gekoppelt mit einem Gilson-Pipettiersystem die automatische Aufreinigung mithilfe präparativer HPLC und einen nahtlos integrierten Bioassay zum Test von Reaktionsprodukten auf β -Sekretase-Aktivität (BACE1) durchführte.

Die benötigte Zeit für die Synthese und Aufreinigung einer Verbindung betrug nur etwa 60 min, die anschließende Testung auf Bioaktivität auf einem Glaschip nur 30 min. Ein Split-Recombine-Mixer gewährleistete die homogene Vermischung aller Assaykomponenten, die mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.8 mL min^{-1} gefördert wurden. Einige Verbindungen wurden als BACE1-Inhibitoren identifiziert, darunter auch **18** und **19** mit gemessenen IC_{50} -Werten von 1327 bzw. 12 nM. Der beschriebene Durchflussbioassay war in der Lage, sowohl inaktive als auch hochpotente Inhibitoren korrekt zu bestimmen.^[46] Bei Lundbeck wurde eine mehrstufige kontinuierliche Mikrodurchfluss-Synthese (0.15 mL min^{-1}) eingesetzt, um eine diverse Sammlung von Piperazinderivaten als Chemokinrezeptor-CCR8-like Liganden herzustellen.^[47]

Etliche Forschungsgruppen haben eine Vorreiterrolle beim Einsatz von Coil-Reaktoren zur Herstellung von He-

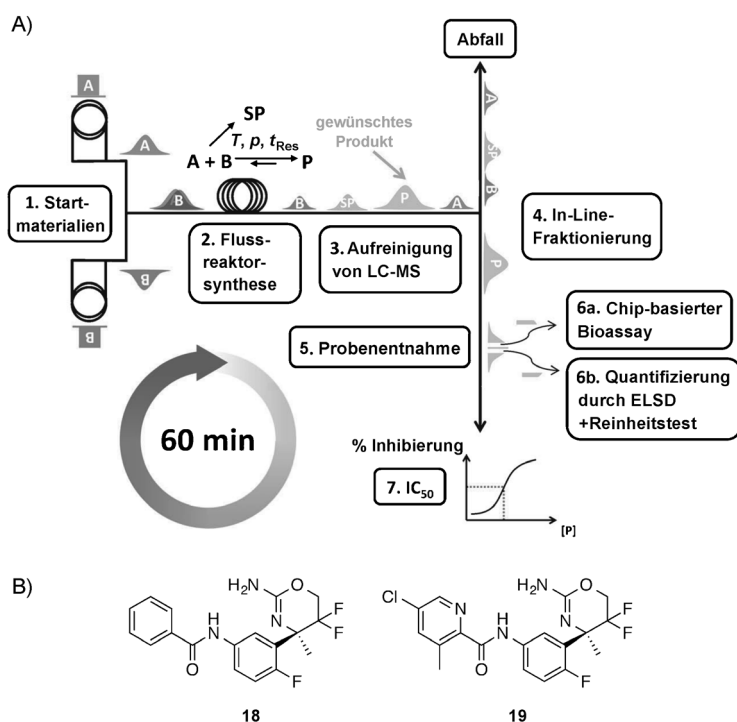


Abbildung 5. A) Vollautomatische Plattform zur Gewinnung von SAR-Daten (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [46], Copyright Wiley 2014). B) Beispiele der Verbindungen, die mit der bei F. Hoffmann-La Roche entwickelten Plattform synthetisiert wurden.

terocyclen in der Synthese von Naturstoffen und medizinisch-chemischen Verbindungen gespielt. Ein ausführlicher Übersichtsartikel behandelt die wegweisenden Arbeiten von Ley und Mitarbeitern.^[48] Venturoni et al. haben die Entwicklung eines skalierbaren, mehrstufigen Verfahrens beschrieben, das reine Produkte mittels Aufreinigung im Durchfluss liefert. Es wurde eine Reihe von Imidazo[1,2-*b*]pyridinen in einer vierstufigen Synthese als Caseinkinase-I-Inhibitoren synthetisiert; eine Stufe ermöglichte dabei die Kombination mit verschiedenen Bausteinen. Auch wenn die Methode nicht gänzlich als Durchfluss-Synthese implementiert wurde, demonstriert sie dennoch die gute Anwendbarkeit von Fluss-Synthesen besonders in Coil-Reaktoren zur Herstellung kleiner Moleküle mit medizinischer Relevanz auch über mehrstufige Reaktionen.^[49] Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes führte zu einem vollautomatisierten Verfahren zur Synthese von Adamantanderivaten mit pharmakologisch interessanten Eigenschaften (Abbildung 6A). Der Ozonierung des Ausgangsmaterials folgte eine Reaktion mit verschiedenen Stickstoff-haltigen Nukleophilen. Die Produkte konnten in guter Ausbeute ohne weitere Aufreinigung gewonnen werden.^[50]

In einer weiteren Fallstudie wurden Imidazo[1,2-*a*]pyridine in einem halbautomatischen Versuchsaufbau synthetisiert. Diese Heterocyclen sind „privilegierte Substrukturen“^[51] und ihre Herstellung durch Mikrodurchfluss-Synthese kann ihre Zugänglichkeit in medizinisch-chemischen Programmen verbessern.^[34] Im ersten Schritt wird die Kondensation von Ethylglyoxylat- und Acetophenonbausteinen durch auf Harz immobilisierte Sulfonsäure (QP-SA) katalysiert. Überschüssiges Glyoxylat wird mit einer weiteren Säule

mit einem Benzylaminharz (QP-BSA) abgefangen. Das Zwischenprodukt des ungesättigten Ketons wird anschließend mit einem Aminopyridinderivat zur Reaktion gebracht. Das dabei entstehende Ketimin führt durch eine nachfolgende Ringbildung zum Imidazo[1,2-*a*]pyridin. Die Umsetzung des Ethylesters zu den entsprechenden Amiden führt zu den gewünschten Zielmolekülen, z.B. **20** und **21**, die direkt mithilfe der „frontal affinity chromatography“-Methode auf die Stärke ihrer Bindung zu humanem Serumalbumin getestet wurden (Abbildung 6B).^[52] In einem dritten Beispiel wurde über die Mikrofluss-Synthese eines Neurotensinrezeptor-1-Liganden berichtet, die verdeutlicht, wie diese neue Technologie auch komplexe Syntheseprobleme lösen und die Wirkstoff-Entwicklung voranbringen kann.^[53] Am Scripps Institute wurde eine 5 × 5-Bibliothek von wirkstoffähnlichen 3-Aminoindolizinen über Tandem-Sonogashira-Kupplung und -Cycloisomerisierung im Durchfluss hergestellt, ohne die Notwendigkeit, Zwischenprodukte abzutrennen und aufzureinigen.^[54]

Fluss-Synthesen haben ihre wichtige Stellung als eine kontinuierliche und kosteneffiziente Möglichkeit zur Produktion aktiver pharmazeutischer Ingredienzien (API) mit einer hohen wirtschaftlichen Relevanz bereits bewiesen. Artemisinin (Abbildung 7), ein Naturstoff, der Anwendung zur Behandlung von Malariaerkrankungen findet, konnte kürzlich auch in der Fluss-Synthese hergestellt werden,^[55] wie auch verschiedene Kinase-Inhibitoren, z.B. Imatinib und verwandte Verbindungen.^[56] Das Chinolon **22** ist ein potenter 5-HT_{1B}-Antagonist, der von AstraZeneca entwickelt wurde, und kann über eine sechsstufige Fluss-Sequenz in einer Gesamtausbeute von 18 % erhalten werden.^[57] **23** ist ein selek-

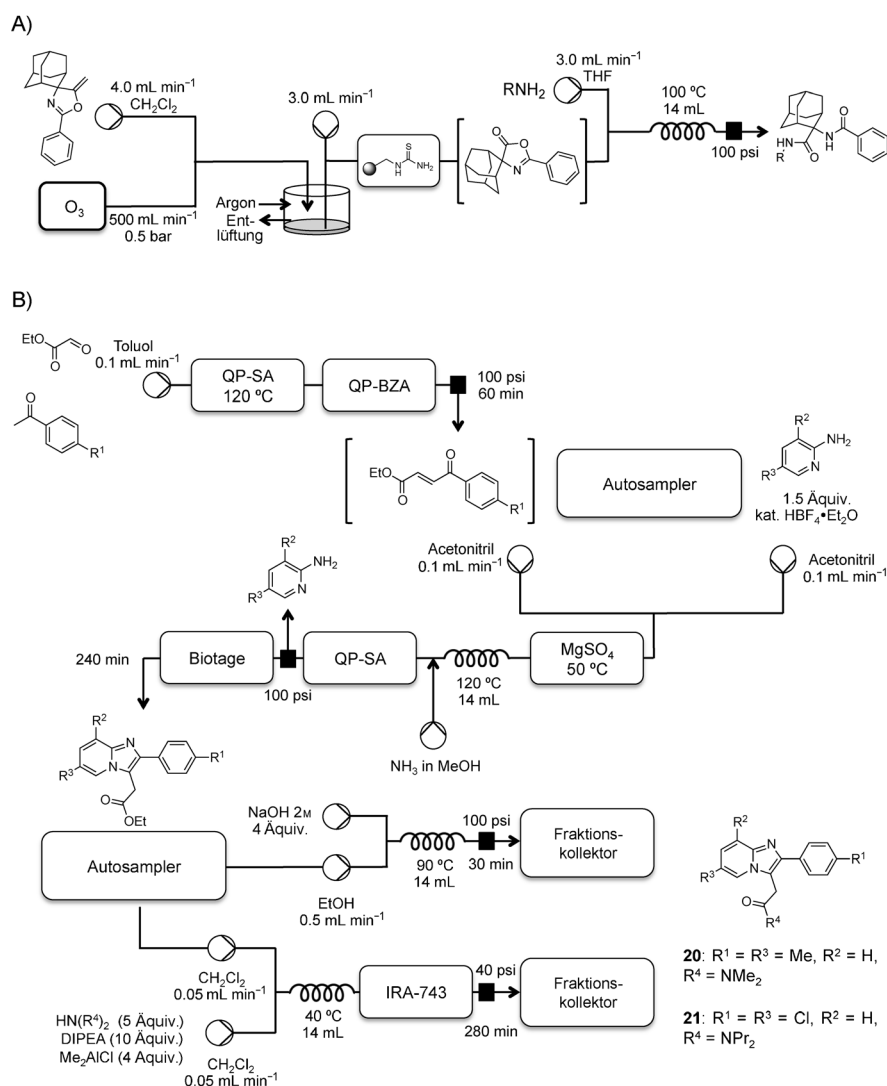


Abbildung 6. A) Fluss-Synthese von Adamantanderivaten.^[50] B) Fluss-Synthese von Imidazo[1,2-a]pyridinen.^[52] DIPEA = Diisopropylethylamin.

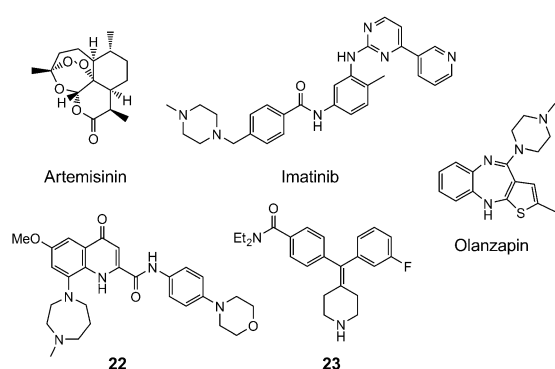


Abbildung 7. Strukturen von ausgewählten pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen, für die eine Fluss-Synthesevorschrift beschrieben wurde.

tiver Agonist des δ -Opioidrezeptors, der über vier Fluss-Synthesestufen zugänglich ist,^[58] und sogar Olanzapin konnte kürzlich im Fluss synthetisiert werden, mit einer extra ange-

fertigten Hochfrequenzinduktionsspule zum Heizen. Zunächst wird dabei die Buchwald-Hartwig-Reaktion durchgeführt, um das Nitroaren-Zwischenprodukt herzustellen, das anschließend über die Reduktion der Nitrogruppe und nachfolgende säurekatalysierte Cyclisierung zum Thieno-[1,5]benzodiazepin führt. Durch die Reaktion mit Piperazin unter Zuhilfenahme eines neuen, auf Kieselgel immobilisierten Titankatalysators kann Olanzapin in guter Ausbeute isoliert werden.^[59]

Das erste Beispiel einer vollintegrierten, kontinuierlich betriebenen Produktionsanlage für Medikamente wurde kürzlich präsentiert und zeigt den technologischen Vorteil für hohen Durchsatz und kürzere Produktionszeiten deutlich auf. In dieser speziellen Anlage haben Trout und Mitarbeiter sogar die komplette Galenik bis zur fertigen Tablette in die automatisierte kontinuierliche Produktion mit eingebunden, die sämtliche gewünschten Kriterien erfüllt, z.B. eine gleichmäßige optische Erscheinung, Größe und Dosierung innerhalb der Toleranzen sowie eine gute Löslichkeit der Tabletten.^[60]

3. Zusammenfassung und Ausblick

Die neue Fluss-Synthesetechnologie hat zurzeit großen Einfluss darauf, wie in der organischen Synthese geforscht wird. Es werden sowohl etablierte als auch neue Reaktionen aus der medizinischen Chemie im Durchfluss bearbeitet. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung von Flussreaktoren durch die präparative Erschließung neuer chemischer Räume, dem Mangel an neuen chemischen Strukturen für die chemische Biologie und molekulare Medizin entgegenzuwirken. Wir werden in der Zukunft sicherlich viele neue Fluss-Systeme sehen, die eine Schlüsselrolle bei der Diversitäts-orientierten Synthese spielen, oder auch einfach zur Durchführung ausgewählter Reaktionen, die Teil eines komplexen Pfades zum Erhalt neuer bioaktiver Moleküle sind. Flussreaktoren sind ideal geeignet, um verschiedene Schritte der Wirkstoff-Findung zu automatisieren. Integrierte Plattformen, die Synthese, Aufreinigung und Analytik mit der Testung von kleinsten Substanzmengen im Durchfluss kombinieren, können die hohen Kosten in der Wirkstoff-Findung verringern, besonders durch schnelleres Profilieren der Substanzen im Frühstadium und die Verkürzung der Zeit, die für eine erste Optimierung von einem Treffer hin zu einer Leitstruktur (Hit-to-Lead-Optimierung) benötigt wird. Der schnelle, automatisierte Zugang zu SAR-Daten wird die Zukunft des Wirkstoffdesigns verändern. Eine nahtlose Integration von Computer-gestützten Methoden zum De-novo-Design niedermolekularer Wirkstoffverbindungen in einer neuen Generation von rückgekoppelten SAR-Plattformen wird sicherlich die Entdeckung neuer APIs begünstigen. Diesbezüglich werden auch adaptive maschinelle Lernmethoden eine besondere Rolle für den automatisierten Entwurf von Wirkstoff-Kandidaten sowie die Auswahl von Reaktionsschemata und Reaktanten spielen. Gekoppelt mit einer Mikrodurchfluss-Synthese kann ein solches System ohne Überwachung mehrere Synthese-Bioassay-Zyklen mittels aktiven Lernens durchlaufen.^[27,61] Wir sind zuversichtlich, dass auf Fluss-Synthese beruhende Technologien zunehmend an der Entdeckung und Entwicklung neuer chemischer Strukturen sowohl in der akademischen als auch in der industriellen Forschung beteiligt sein werden.

Wir danken der ETH Zürich und der OPO Stiftung Zürich für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

Eingegangen am 29. Januar 2014

Online veröffentlicht am 6. Mai 2014

- [1] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, 442, 368–373.
- [2] K. S. Elvira, X. C. Solvas, R. C. R. Wootton, A. J. deMello, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 905–915.
- [3] a) T. M. Squires, S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.* **2005**, 77, 977–1026; b) R. L. Hartman, J. P. McMullen, K. F. Jensen, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7642–7661; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7502–7519; c) C. H. Legge, *J. Chem. Educ.* **2002**, 79, 173–178.
- [4] P. S. Dittrich, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 210–218.

- [5] a) D. R. Reyes, D. Iossifidis, P. A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2623–2636; b) T. Schwalbe, V. Autze, G. Wille, *Chimia* **2002**, 56, 636–646.
- [6] R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2617.
- [7] C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16531–16536.
- [8] M. Johnson, C. Li, B. Rasnow, P. Grandsard, H. Xing, A. Fields, *J. Lab. Autom.* **2002**, 7, 62–68.
- [9] a) H. Yin, D. Marshall, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, 23, 110–119; b) H. N. Joensson, H. A. Svahn, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 12342–12359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 12176–12192.
- [10] S. Seiffert, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 11674–11680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11462–11468.
- [11] a) L. Kang, B. G. Chung, R. Langer, A. Khademhosseini, *Drug Discovery Today* **2008**, 13, 1–13; b) P. Neuzil, S. Giselbrecht, K. Lange, T. J. Huang, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 620–632; c) D. Lombardi, P. S. Dittrich, *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, 5, 1081–1094; d) R. Stalder, G. P. Roth, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 1119–1123.
- [12] *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis* (Hrsg.: T. Wirth), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 1–41.
- [13] a) C. Wiles, P. Watts, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6512–6535; b) P. Watts, C. Wiles, *Chem. Commun.* **2007**, 443–467.
- [14] M. C. Mitchell, V. Spikmans, A. J. de Mello, *Analyst* **2001**, 126, 24–27.
- [15] L. M. Kreis, S. Krautwald, N. Pfeiffer, R. E. Martin, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2013**, 15, 1634–1637.
- [16] A. G. O'Brien, Z. Horvath, F. Levesque, J. W. Lee, A. Seidel-Morgenstern, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 7134–7137; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7028–7030.
- [17] R. E. Martin, F. Morawitz, C. Kuratli, A. M. Alker, A. I. Alanine, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 47–52.
- [18] S. Sharma, R. A. Maurya, K. I. Min, G. Y. Jeong, D. P. Kim, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 7712–7716; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 7564–7568.
- [19] a) P. W. Miller, N. J. Long, A. J. de Mello, R. Vilar, H. Audrain, D. Bender, J. Passchier, A. Gee, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2933–2936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2875–2878; b) C. C. Lee, G. Sui, A. Elizarov, C. J. Shu, Y. S. Shin, A. N. Dooley, J. Huang, A. Daridon, P. Wyatt, D. Stout, H. C. Kolb, O. N. Witte, N. Sathyamurthy, J. R. Heath, M. E. Phelps, S. R. Quake, H. R. Tseng, *Science* **2005**, 310, 1793–1796.
- [20] a) S. Eller, M. Collot, J. Yin, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5970–5973; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5858–5861; b) O. Calin, S. Eller, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5974–5977; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5862–5865.
- [21] a) M. Chen, S. L. Buchwald, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 4341–4344; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 4247–4250; b) B. Pieber, S. T. Martinez, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 10431–10434; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10241–10244; c) D. Webb, T. F. Jamison, *Chem. Sci.* **2010**, 1, 675–680.
- [22] T. Tsubogo, T. Ishiwata, S. Kobayashi, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 6722–6737; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6590–6604.
- [23] M. Chen, S. L. Buchwald, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 11842–11845; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11628–11631.
- [24] W. Shu, S. L. Buchwald, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 5451–5454; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5355–5358.
- [25] E. Garcia-Egido, S. Y. Wong, B. H. Warrington, *Lab Chip* **2002**, 2, 31–33.
- [26] a) S. Y. F. W. Hawkes, M. J. V. Chapela, M. Montebault, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24, 712–721; b) J. W. Scannell, A. Blanckley, H. Boldon, B. Warrington, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 191–200.
- [27] *De Novo Molecular Design* (Hrsg.: G. Schneider), Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.

- [28] E. Garcia-Egido, V. Spikmans, S. Y. Wong, B. H. Warrington, *Lab Chip* **2003**, 3, 73–76.
- [29] V. Hessel, H. Lowe, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, 28, 267–284.
- [30] a) M. Fernandez Suarez, E. Garcia-Egido, M. Montebault, M. J. Chapela, S. Y. F. Wong-Hawkes, *Proc. ICNMM* **2006**, 997–1002; b) S. D. Pickett, D. V. S. Green, D. L. Hunt, D. A. Pardoe, I. Hughes, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 28–33.
- [31] a) D. M. Hartmann, J. T. Nevill, P.-j. C. Kung, K. I. Peetigrew, B. H. Warrington, H. C. Crenshaw, WO 2007/021815, **2007**; b) I. Hughes, B. H. Warrington, Y. F. Wong, WO 2006/038014, **2006**; c) B. H. Warrington, K. H. Christopher, T. J. Pell, D. A. Pardoe, WO 2007/021813, **2007**; d) I. Hughes, B. H. Warrington, Y. F. Wong, WO 2004/089533, **2004**.
- [32] B. Warrington, J. Vinter, M. Mackay, WO 2007/148130, **2007**.
- [33] T. Schwalbe, D. Kadzimirsz, G. Jas, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24, 758–768.
- [34] M. Reutlinger, T. Rodrigues, P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 593–596; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 582–585.
- [35] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021; b) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 1128–1137.
- [36] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599.
- [37] J. Wang, G. Sui, V. P. Mocharla, R. J. Lin, M. E. Phelps, H. C. Kolb, H. R. Tseng, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5402–5407; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5276–5281.
- [38] Y. Wang, W. Y. Lin, K. Liu, R. J. Lin, M. Selke, H. C. Kolb, N. Zhang, X. Z. Zhao, M. E. Phelps, C. K. Shen, K. F. Faull, H. R. Tseng, *Lab Chip* **2009**, 9, 2281–2285.
- [39] L. Malet-Sanz, F. Susanne, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4062–4098.
- [40] J. E. Hochlowski, P. A. Searle, N. P. Tu, J. Y. Pan, S. G. Spanton, S. W. Djuric, *J. Flow Chem.* **2011**, 2, 56–61.
- [41] C. M. Thompson, J. L. Poole, J. L. Cross, I. Akritopoulou-Zanze, S. W. Djuric, *Molecules* **2011**, 16, 9161–9177.
- [42] M. C. Bryan, C. D. Hein, H. Gao, X. Xia, H. Eastwood, B. A. Bruenner, S. W. Louie, E. M. Doherty, *ACS Comb. Sci.* **2013**, 15, 503–511.
- [43] M. Baumann, I. R. Baxendale, C. Kuratli, S. V. Ley, R. E. Martin, J. Schneider, *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 405–413.
- [44] B. Desai, K. Dixon, E. Farrant, Q. Feng, K. R. Gibson, W. P. van Hoorn, J. Mills, T. Morgan, D. M. Parry, M. K. Ramjee, C. N. Selway, G. J. Tarver, G. Whitlock, A. G. Wright, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 3033–3047.
- [45] W. Czechtizky, J. e. Dedio, B. Desai, K. Dixon, E. Farrant, Q. Feng, T. Morgan, D. M. Parry, M. K. Ramjee, C. N. Selway, T. Schmidt, G. J. Tarver, A. G. Wright, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 768–772.
- [46] M. Werner, C. Kuratli, R. E. Martin, R. Hochstrasser, D. Wechsler, T. Enderle, A. I. Alanine, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2014**, 126, 1730–1735; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1704–1708.
- [47] T. P. Petersen, A. Ritzen, T. Ulven, *Org. Lett.* **2009**, 11, 5134–5137.
- [48] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Mol. Diversity* **2011**, 15, 613–630.
- [49] F. Venturoni, N. Nikbin, S. V. Ley, I. R. Baxendale, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1798–1806.
- [50] C. Battilocchio, I. R. Baxendale, M. Biava, M. O. Kitching, S. V. Ley, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, 16, 798–810.
- [51] M. Reutlinger, C. P. Koch, D. Reker, N. Todoroff, P. Schneider, T. Rodrigues, G. Schneider, *Mol. Inf.* **2013**, 32, 133–138.
- [52] L. Guetzoian, N. Nikbin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 764–769.
- [53] C. Battilocchio, B. J. Deadman, N. Nikbin, M. O. Kitching, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 7917–7930.
- [54] P. P. Lange, K. James, *ACS Comb. Sci.* **2012**, 14, 570–578.
- [55] a) D. Kopetzki, F. Lévesque, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 5450–5456; b) F. Lévesque, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1738–1741; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1706–1709.
- [56] a) M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2450–2452; b) M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 1822–1839; c) B. J. Deadman, M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 1766–1800.
- [57] Z. Qian, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Synlett* **2010**, 4, 505–508.
- [58] Z. Qian, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 12342–12348.
- [59] J. Hartwig, S. Ceylan, L. Kupracz, L. Coutable, A. Kirschning, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9995–9999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9813–9817.
- [60] S. Mascia, P. L. Heider, H. Zhang, R. Lakerveld, B. Benyahia, P. I. Barton, R. D. Braatz, C. L. Cooney, J. M. Evans, T. F. Jamison, K. F. Jensen, A. S. Myerson, B. L. Trout, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 12585–12589; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 12359–12363.
- [61] G. Schneider, S.-S. So, *Adaptive Systems in Drug Design*, Landes Bioscience, Georgetown, **2001**.