

ABSCHLUSSBERICHT AZ 29937

FÖRDERSCHWERPUNKT INTEGRIERTE BIOTECHNOLOGIE:

„BIOKATALYTISCHE SYNTHESE VON FUNKTIONALISIERTEN CHIRALEN AMINEN DURCH TRANSAMINASEN“

Antragsteller:

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer & Jun.-Prof. Dr. Matthias Höhne

Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie und
Enzymkatalyse, Felix-Hausdorffstr. 4, 17489 Greifswald

Tel. 03834 86 4367, Fax: 03834 86 794367

Email: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de, Email: matthias.hoehne@uni-greifswald.de

Enzymicals AG

Dr. Ulf Menyes

Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Tel: 03834 515 470, Fax: 03834 515 473

Email: u.menyes@enzymicals.com

Projektbeginn: 01. April 2012

Greifswald, 24.11.2015

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	ANLASS UND ZIELSETZUNG	4
3	VERWENDETE METHODEN	5
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	6
4.1	Identifizierung der Amin Transaminasen	6
4.2	Identifizierung geeigneter Keto-Reduktasen	11
4.3	Präparative Darstellung der Hydroxyketone und des Aminoalkohols im kleinen Maßstab	12
4.4	Zuordnung der absoluten Konfiguration der erhaltenen Produkte	12
4.5	Präparative Darstellung des Aminoalkohols im Gramm- Maßstab (Enzymicals)	14
4.5.1	Reduktion des Diketons zum chiralen Hydroxyketon	15
4.5.2	Biokatalytische Aminierung des Hydroxyketons zum chiralen <i>syn</i> -Aminoalkohol	15
5	SOLL/IST-VERGLEICH	18
6	WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNGEN UND ÖKOEFFIZIENZ-ANALYSE	19
7	DISKUSSION UND FAZIT	21
8	KOOPERATIONEN / PROJEKTTREFFEN	21
9	TEILNAHME AN PROJEKT-RELEVANTEN VERANSTALTUNGEN	22
10	VERÖFFENTLICHUNGEN/PATENTANMELDUNGEN	22
11	LITERATUR	23

1 ZUSAMMENFASSUNG

Zu Beginn des Projekts wurde die chemische Synthese der Modell- und Referenzverbindungen geplant und durchgeführt. Der erste Schritt war die Auswahl und Synthese einer geeigneten Modellverbindung. Weiterhin wurde die Synthese der durch die enzymatische Umsetzung zu erwartenden Produkte untersucht.

Als Modellsubstrat wurde das prochirale Diketon 1-Phenylpentan-2,4-dion (**3**) gewählt (Abbildung 1). Diese Verbindung weist eine „randständige“ Ketofunktion am C4-, sowie eine „mittelständige“ Ketofunktion am C2-Atom auf. An dem C2-Atom befindet sich ein Benzylrest. Dieser wurde bewusst anstatt eines Phenylrestes gewählt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von einigen Amin-Transaminasen (ATA) ein höherer Umsatz des Ketons erzielt werden konnte, wenn sich die Ketofunktion nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum aromatischen Rest befindet.^[1]

Die organische Synthese des Diketons **3**, der Hydroxyketone **2** und **8** sowie des Diols **5** konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Eine Route zur chemischen Synthese des Aminoalkohols **16** wurde gefunden und erfolgreich durchgeführt. Mit Hilfe des chemisch synthetisierten Aminoalkohols **16** wurde die Etablierung einer analytischen Methode, welche die Trennung aller vier Stereoisomere der Zielverbindung erlaubt, möglich. Weiterhin konnte für die Hydroxyketone **8** und **2**, das Diketon **3** sowie für das Diol **5** eine Chiralanalytik etabliert werden, welche die Trennung und quantitative Erfassung der genannten Verbindungen ermöglicht.

Nach Identifikation mehrerer Enzyme, welche das Substrat **2** umsetzten, wurde eine Keto-Reduktase und zwei enantiokomplementäre Amintransaminasen für die weiteren Experimente ausgewählt. Eine Kombination dieser drei Enzyme erlaubte schließlich die selektive Darstellung aller vier Stereoisomere des Aminoalkohols **16** was zunächst im analytischen Maßstab gezeigt werden konnte. Anschließend wurde das Isomer **16d** im kleinen präparativen Maßstab dargestellt und die absolute Stereokonfiguration *via* NMR Spektroskopie bestimmt. Diese Ergebnisse und alle methodischen Details wurden im Fachblatt *Advanced Synthesis and Catalysis* veröffentlicht (*Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 1808-1814). Eine Gegenüberstellung dieses biokatalytischen Synthesewegs mit einer etablierten, chemokatalytischen Methode zeigt das deutliche Umweltentlastungspotential, da Lösungsmittel, toxische Reagenzien und Schwermetalle eingespart werden können.

2 ANLASS UND ZIELSETZUNG

Das Ziel des Forschungsprojektes bestand darin, Amin-Transaminasen (ATA) als Biokatalysatoren für die Synthese funktionalisierter Amine einzusetzen. Dabei lag der Fokus auf der Synthese von enantiomerenreinen 1,3-Aminoalkoholen, welche durch die kombinierte Verwendung von ATA und Alkoholdehydrogenasen (ADH) bzw. Kettoreduktasen (KRED) aus Diketonen dargestellt werden sollten (Abbildung 1). Hierdurch sollte eine Toolbox von Enzymen zusammengestellt werden, welche die Synthese von enantiomerenreinen Diastereomeren ausgehend von einfachen, prochiralen Verbindungen ermöglicht. Um das Potential einer solchen enzymatischen Toolbox voll ausschöpfen zu können, sollten ATAs und KREDs mit jeweils komplementärer Enantioselektivität und Regioselektivität eingesetzt werden.

In Zusammenarbeit mit dem KMU-Partner Enzymicals AG sollte ein Up-scaling der Zweistufen-Reaktion und dessen Optimierung hinsichtlich Wirtschaftlichkeit und Umweltfreundlichkeit für ein ausgewähltes Modells substrat erfolgen.

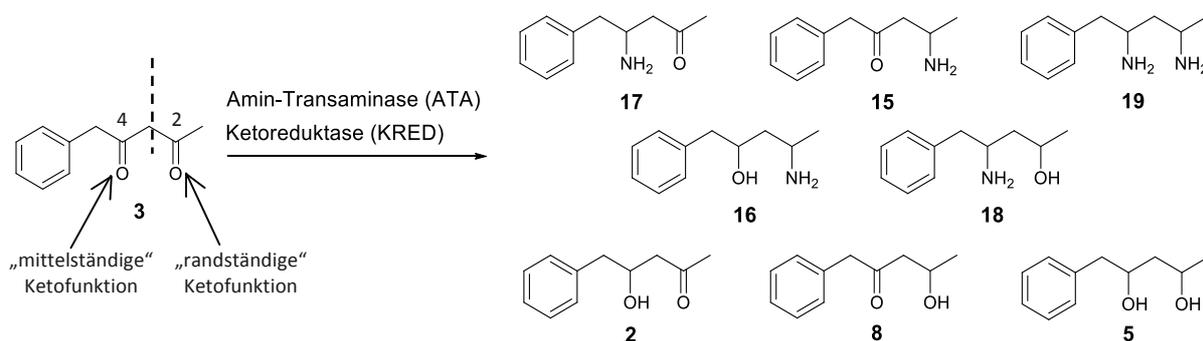


Abbildung 1: Übersicht der zu synthetisierenden Referenzverbindungen, welche als Produkte im Verlauf der Umsetzung durch die Enzyme Amin-Transaminase (ATA) und Kettoreduktase (KRED) aus dem Modells substrat gebildet werden können. Die Synthese des Modells substrates (3), der Hydroxyketone (2; 8), des Diols (5) sowie des Aminoalkohols (16) wurde abgeschlossen.

3 VERWENDETE METHODEN

Universität Greifswald

- Chemische Synthese der Substrat- und Produktstandards
- (chirale) HPLC- und GC Analytik
- Proteinexpression, Proteinreinigung (Metallaffinitätschromatographie) der Transaminasen und Ketoreduktasen im Labormaßstab (max. 1 l Kulturvolumen)
- Biokatalysen im analytischen Maßstab
- Biokatalysen im präparativen Maßstab
- Isolierung und Charakterisierung der Produkte (optische Reinheit, NMR)

Enzymicals

- Fermentationstechnik zur Kultivierung für die Präparation der Transaminase
- Biokatalyse und Produktisolation im präparativen Maßstab
- Analytik zur Produktcharakterisierung (optische Reinheit, NMR)

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die folgenden Ergebnisse sind Gegenstand einer umfangreichen Publikation (*Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 1808-1814), im Weiteren Artikel I genannt. Für experimentelle Details, insbesondere die Synthese der Substrat- und Produktstandards und die Analytik, sei auf diese Publikation bzw. die Supporting Information (SI) zu diesem Artikel verwiesen.

4.1 Identifizierung der Amin Transaminasen

Wir begannen damit mehrere Amin-Transaminasen (ATAs) nach der Eigenschaft zu untersuchen die Hydroxyketone **20** und **21** als Substrate umzusetzen (Abbildung 2A). Diese Substrate wurden *via* asymmetrischer Aldolreaktionen synthetisiert (siehe Artikel I, Figure S5). Mehrere Versuche *rac-20* zu dem korrespondierenden Aminoalkohol umzusetzen blieben erfolglos. Weder die (*S*)-selektive ATA des Organismus' *Chromobacterium violaceum* (ATA-Cvi) oder eine Mutante dieses Enzyms (W60C)^[4], noch sechs (*R*)-selektive ATAs führten in Gegenwart eines großen Überschusses des Aminodonors Alanin zu einer Umsetzung des Hydroxyketons (für Details siehe SI des Artikel I, Table S1). Auch wenn eine Enzymkaskade eingesetzt wurde (L-Alanin-Dehydrogenase und Glukose-Dehydrogenase^[5]), welche die Gleichgewichtslage der angestrebten Reaktion auf die Produktseite verschiebt, konnte kein Produkt erhalten werden. Stattdessen wurde Benzylamin mit Umsätzen von bis zu 52 % gebildet. Ähnlich verliefen die Versuche mit dem Hydroxyketon *rac-21*. Wenn die oben erwähnte Enzymkaskade eingesetzt wurde, konnte lediglich Vanillylamin als Produkt mit einem Umsatz von 40 % erhalten werden. Weitere Untersuchungen ergaben, das *rac-20* unter den gegebenen Bedingungen im Verlauf einer Retroaldolreaktion zu Benzaldehyd zerfällt.^[5] Die Reaktion verlief langsam wenn *rac-20* in Puffer gelöst war. Die Abbaureaktion wurde jedoch durch die Anwesenheit des Aminodonors Alanin beschleunigt. Der daraus hervorgehende Benzaldehyd wurde durch das Enzym anschließend transaminiert. Als Alternative zu Alanin wurde 1-Phenylethylamin (1-PEA) als Aminodonor untersucht (siehe SI Artikel I, Table S2), da es nicht die Retroaldolreaktion des Hydroxyketons *rac-20* beschleunigt und nur Spuren von Benzylamin gebildet wurden. Dennoch wurde der korrespondierende Aminoalkohol nicht gebildet. Wir untersuchten, ob die Transaminierung durch eine möglicherweise auftretende Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Alkohol- und der Ketofunktion des Hydroxyketons die Transaminierung behindert. Dazu synthetisierten wir ein Derivat mit

einer Acetylschutzgruppe an der Alkoholfunktion. Leider wurde auch diese Verbindung nicht durch die getesteten Enzyme umgesetzt. Es konnte kein Umsatz *via* HPLC detektiert werden (HPLC Methode 1).

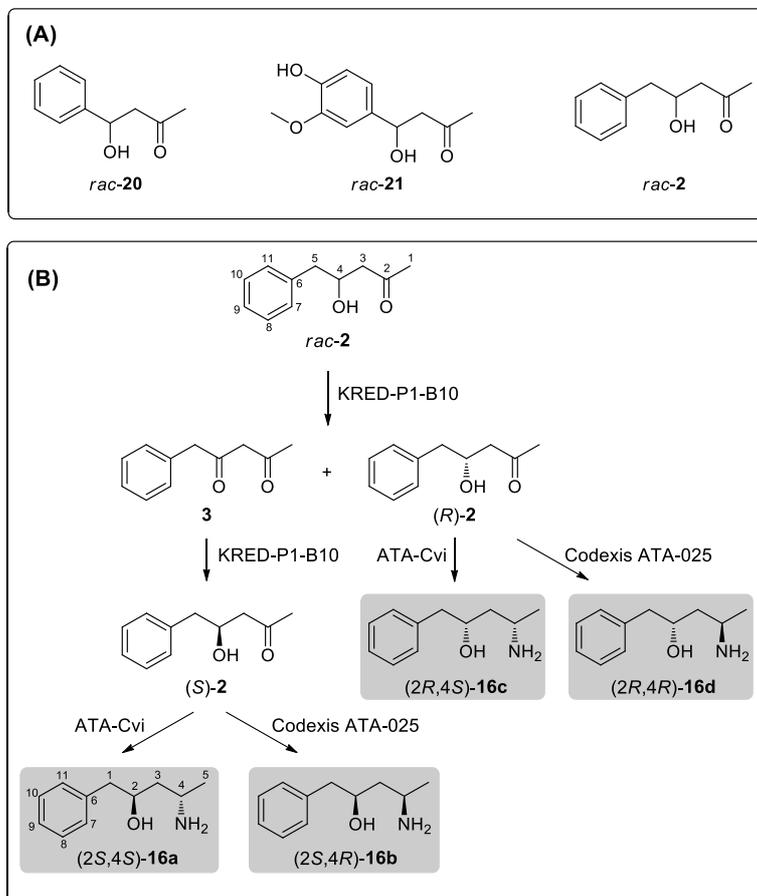


Abbildung 2: (A) Untersuchte Substrate. (B) Biokatalytische Route zur Synthese der vier Stereoisomere des Aminoalkohols 4-Amino-1-phenylpentan-2-ol (**16**). Nach einer KRED-katalysierten Oxidation des Hydroxyketons *rac-2* kann das nicht umgesetzte Stereoisomer (*R*)-**2** mit 86 % *ee* sowie das Diketon **3** isoliert werden. Nach der Trennung der Produkte kann **3** zum Hydroxyketon mit der entgegengesetzten Stereochemie mit Hilfe derselben KRED erhalten werden. Schließlich wird die selektive Synthese aller vier Stereoisomere des Aminoalkohols **16** durch die Verwendung zweier enantiokomplementärer ATAs möglich.

Aus diesem Grund synthetisierten wir *rac-2* (Abbildung 2, für Details siehe SI Artikel 1, Scheme S2) in der Annahme, dass dieses Molekül als Substrat akzeptiert wird, da es im Gegensatz zum Phenylrest der Verbindungen **20** bzw. **21** einen Benzylrest trägt. Dadurch ist das Hydroxyketon **2** flexibler und kann daher möglicherweise besser von den ATAs umgesetzt werden. Weiterhin ist dieses Molekül stabil, wenn es in Puffer zusammen mit Alanin oder Isopropylamin (ein weiterer alternativer Aminodonor (IPA)) sowie PLP und bis zu 20 % (v/v) Isopropanol inkubiert wird. Es konnten keine Abbauprodukte des Substrates nach drei

Tagen Inkubationszeit gefunden werden (DC und GC/MS Methode 1). Diese Beobachtung deckt sich mit den nicht erfolgreichen Versuchen der Synthese dieser Verbindung *via* Prolin-katalysierter asymmetrischer Aldolreaktion.

Via DC konnten mehrere ATAs identifiziert werden, welche *rac-2* umsetzten (Tabelle 1). Nachdem die chemische Synthese der Referenzsubstanz *rac-16* glückte, konnten diese Beobachtungen *via* HPLC-Analytik bestätigt werden. Weiterhin wurde eine GC/MS-Analytik entwickelt, welche die Trennung aller vier Stereoisomere der Verbindung **16** erlaubte.

Die vielversprechendste Transaminase - ATA-025 - wurde für die asymmetrische Synthese des Aminoalkohols **16b** bzw. **16d** eingesetzt. Bei Verwendung von 50 Äq. IPA als Aminodonor war nach 20 h Reaktionszeit das Substrat abreagiert und es wurden mit der oben erwähnten Chiralanalytik erwartungsgemäß zwei der vier möglichen Stereoisomere nachgewiesen (Abbildung 3A).

Tabelle 1: Untersuchte Bedingungen für die Transaminierung des Substrates *rac*-2.

Eintrag	Enzyme	Aminodonor	16 detektiert	Methode
1	ATA-AspTer	D-Alanin	nein	DC
2	ATA-AspFum	D-Alanin	nein	DC
3		IPA ^{c)}	nein	HPLC Methode 2
4		(<i>R</i>)-1-PEA ^{d)}	nein	DC
5		ATA-AspOry	D-Alanin	nein
6	ATA-NeoFis	D-Alanin	nein	DC
7	ATA-Cvi wt	L- Alanin ^{a)}	ja	DC, GC/MS Methode 2
8		L- Alanin ^{b)}	nein	DC
9		(<i>S</i>)-1-PEA ^{b)}	nein	DC
10		Benzylamin ^{b)}	nein	DC
11		IPA ^{b)}	nein	DC
12	ATA-Cvi R267A	L- Alanin	nein	DC
13	ATA-VibFlu	L- Alanin	nein	DC
14	ATA-RhoSph	L- Alanin	nein	DC
15	ATA-007	IPA ^{c)}	nein	DC, HPLC Methode 2
16	ATA-009	IPA ^{c)}	nein	DC, HPLC Methode 2
17	ATA-012	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
18	ATA-013	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
19	ATA-015	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
20	ATA-016	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
21	ATA-024	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
22	ATA-025	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2, GC/MS Methode 2
23		(<i>R</i>)-1-PEA ^{d)}	ja	HPLC Methode 2
24		(<i>S</i>)-1-PEA ^{d)}	nein	HPLC Methode 2
25	ATA-033	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
26	ATA-217	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
27	ATA-224	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
28	ATA-231	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
29	ATA-234	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
30	ATA-301	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
31	TA-P1-A01	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
32	TA-P1-A06	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
33	TA-P1-F03	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
34	TA-P1-F12	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
35	TA-P1-G05	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
36	TA-P1-G06	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2
37	TA-P2-A07	IPA ^{c)}	ja	DC, HPLC Methode 2

^{a)} Aufgereinigtes und lyophilisiertes Enzym wurde eingesetzt (10 mg/ml).

^{b)} Fünf Äq. des Aminodonors wurden eingesetzt. Von IPA wurden entweder 20 oder 100 Äq. eingesetzt. Aufgereinigtes und lyophilisiertes Enzym wurde eingesetzt (10 mg/ml), LDH/GDH wurde in diesem Fall nicht verwendet.

^{c)} Die Reaktion wurde entsprechend der Vorgaben des "TA Screening Kit" Handbuches des Herstellers Codexis® durchgeführt.

^{d)} Drei Äq. des Aminodonors 1-Phenylethylamin wurden eingesetzt. LDH/GDH wurden in diesem Fall nicht verwendet.

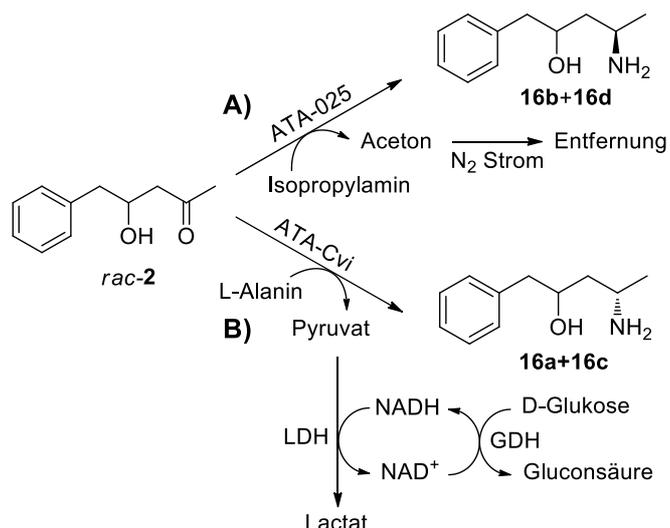


Abbildung 3: Asymmetrische Synthese des Aminoalkohols **16** unter Verwendung zweier enantiokomplementärer ATAs. **A)** Inkubation von *rac-2* mit dem Enzym ATA-025 und 50 Äq. Isopropylamin (IPA) als Aminodonor resultierte in der Bildung der Stereoisomere **16b** und **16d** (GC/MS Methode 2). Das Co-Produkt Aceton wurde unter einem Stickstoffstrom entfernt. Reaktionsbedingungen: 20 mM *rac-2*, 1 M IPA und 0,25 mM PLP wurden in 100 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 7,5), welcher 20 % (v/v) 2-Propanol enthält, bei 30°C in einem Glas-Vial gerührt. **B)** Nach Transaminierung von *rac-2* unter Verwendung von ATA-Cvi wurden die Stereoisomere **16a** und **16c** erhalten. Dazu wurde die Gleichgewichtsverschiebung auf die Produktseite der Reaktion realisiert, indem das Co-Produkt Pyruvat durch eine Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus dem Gleichgewicht der Reaktion entfernt wurde. Das dazu benötigte NADH wurde durch eine Glukose-Dehydrogenase (GDH) unter Verbrauch von Glukose regeneriert. Reaktionsbedingungen: 10 mM *rac-2*, L-Alanin (250 mM), D-Glukose (150 mM), NADH (1 mM), PLP (0.1 mM), 90 U/ml LDH, 15 U/ml GDH und 10 mg/ml ATA-Cvi Lyophilisat wurden bei 1000 rpm und 30°C in 100 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7.5) in einem Glas-Vial gerührt. Der Puffer enthielt 20 % (v/v) 2-Propanol als Co-Solvens.

Das Enzym ATA-025 katalysierte die Synthese des Aminoalkohols **16** auch in Verbindung mit dem (*R*)-konfigurierten Aminodonor 1-PEA. Wenn hingegen (*S*)-1-PEA als Aminodonor eingesetzt wurde, wird kein Produkt gebildet. Diese Beobachtung ist ein Indiz für die (*R*)-Selektivität des Enzyms ATA-025. Diese Vermutung wurde überprüft, indem die (*S*)-selektive ATA-Cvi für die asymmetrische Transaminierung von *rac-2* benutzt wurde. Erwartungsgemäß sollten die Produkte **16a** und **16c** (Abbildung 3B) gebildet werden, was *via* GC/MS Methode 2 auch bestätigt werden konnte. Das Substrat *rac-2* wurde von der ATA-Cvi unter Verwendung der Enzymkaskade (LDH/GDH) nach drei Tagen vollständig umgesetzt.

4.2 Identifizierung geeigneter Keto-Reduktasen

Da nun zwei enantioselektive ATAs zur Verfügung standen, wurden passende Keto-Reduktasen (KRED) gesucht, um die selektive Darstellung eines Stereoisomers von **16** zu realisieren. Dazu suchten wir zunächst nach einer KRED, welche ausschließlich an dem „inneren“ C2-Kohlenstoff (Hydroxygruppe von **2** bzw. Ketogruppe von **3**) reagiert, da dies uns den Zugang zu (*R*)-**2** *via* kinetischer Racematspaltung bzw. (*S*)-**2** *via* asymmetrischer Synthese ermöglichen würde. Bei der Untersuchung eines Enzymkits fanden wir, dass fünf von 22 Enzymen die Oxidation der Hydroxygruppe von *rac*-**2** ermöglichten: KRED-P1-B02, KRED-P1-B10, KRED-P1-B12, KRED-P2-B02 und KRED-P1-C02 (DC und GC Methode 3). Die Reaktion verlief am schnellsten mit dem Enzym KRED-P1-B10, welches daher für die weiteren Experimente verwendet wurde. Alle fünf Enzyme hatten die gleiche Enantioselektivität und oxidierten (*S*)-**2**. Dadurch war ein biokatalytischer Zugang zum korrespondierenden Diketon **3** und (*R*)-**2** (89 % ee, bei 50 % Umsatz) gefunden (Abbildung 4). Das korrespondierende Regioisomer **8** wurde nur in Spuren detektiert.

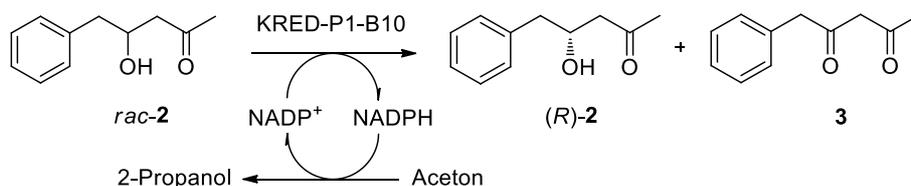


Abbildung 4: Racematspaltung des Hydroxyketons *rac*-**2** zur Darstellung von (*R*)-**2** und des korrespondierenden Diketons **3**. Fünf KREDs wurden identifiziert, welche die gezeigte Reaktion katalysieren. Alle gefunden Enzyme besitzen die gleiche Enantiopräferenz gegenüber dem Substrat. Die Reaktion war nach 24 h vollständig abgelaufen. Reaktionsbedingungen: 10 mM *rac*-**2**, 1 mM NADP⁺, 1 mM MgSO₄, 20 % (v/v) Aceton, 1 mg/ml KRED Lyophilisat wurden in 100 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 7) bei 1200 rpm und 30° C in einem Glas-Vial gerührt.

Um das Hydroxyketon **2** mit der entgegengesetzten Konfiguration, also (*S*)-**2**, zu erhalten, wurde es nötig ein Enzym zu identifizieren, welches selektiv eine Reduktion am C2-Kohlenstoff des Diketons (**3**) katalysiert. Die Untersuchung der zur Verfügung stehenden Enzyme auf diese Eigenschaft zeigte, dass die Verwendung desselben Enzyms – KRED-P1-B10 – die selektive Einführung eines Stereozentrums am C2-Kohlenstoff mit hoher Regio- und Enantioselektivität erlaubte (86 % ee, Abbildung 5). Gleichzeitig war dieses Enzym das einzige der 22, welches diese Reaktion katalysierte. Dabei ist es wichtig zu bemerken, dass das Regioisomer **8** nur in Spuren gebildet wurde (1 %, GC/MS Methode 1). Dieser Befund zeigt die hohe Regioselektivität des Enzyms auf. Diese Reaktion verlief sehr schnell und es war not-

wendig sie abzustoppen nachdem das Substrat aufgebraucht war. Wurde die Reaktion über diesen Punkt weiter geführt, reagierte (*S*)-**2** weiter mit dem Enzym und wurde schließlich vollständig zu dem korrespondierenden Diol **5** reduziert.

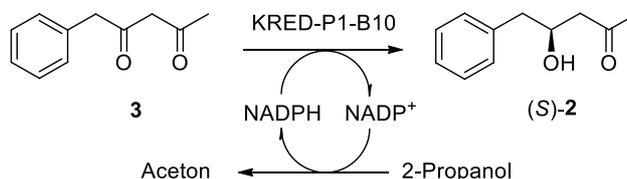


Abbildung 5: Asymmetrische Synthese des Hydroxyketons (*S*)-**2**. Reaktionsbedingungen: 10 mM *rac*-**2**, 1 mM NADP⁺, 1 mM MgSO₄, 20 % (v/v) 2-Propanol und 1 mg/ml KRED Lyophilisat wurden in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) bei 1200 rpm in einem Glas-Vial bei 30°C gerührt.

4.3 Präparative Darstellung der Hydroxyketone und des Aminoalkohols im kleinen Maßstab

Da jetzt ein Weg für die Synthese der optisch angereicherten Stereoisomere von **2** gefunden worden war, übertrugen wir die Bedingungen auf den mg Maßstab. Dazu wurden 321 mg (1,8 mmol) des Hydroxyketons *rac*-**2** zu 160 mg (50 %, 86 % *ee*) des Hydroxyketons (*R*)-**2** und 85 mg (27 %) des Diketons **3** überführt. Die geringe Ausbeute des Diketons ist vermutlich mit der Instabilität von 1,3-Diketonen gegenüber Silika, welches für die chromatographische Aufreinigung verwendet wurde, begründet.^[6] Das isolierte Diketon **3** (0,312 mmol) wurde in das Hydroxyketon (*S*)-**2** überführt (48 mg, 86 %, 71 % *ee*). Unter Verwendung der so erhaltenen Verbindungen (*R*)-**2** und (*S*)-**2** wurden die vier Stereoisomere des Aminoalkohols **16a**-**16d** mit hoher Enantioselektivität im analytischen Maßstab erhalten (> 98 % *ee* am C4-Kohlenstoff, an welchem die Aminofunktion gebunden vorliegt; voller Umsatz der Substrate). Schließlich wurde die Transaminierung von (*R*)-**2** im präparativen Maßstab (90 mg, 0,5 mmol) mit ATA-025 unternommen. Es wurden 66 mg (73 %) des Aminoalkohols **16d** erhalten.

4.4 Zuordnung der absoluten Konfiguration der erhaltenen Produkte

Da keine optisch reinen Referenzsubstanzen für die untersuchten Verbindungen kommerziell erhältlich sind, wurde der isolierte Alkohol **16d** verwendet, um mit Hilfe von NMR-Spektroskopie die absolute Konfiguration der chiralen Zentren des Moleküls zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde die absolute Konfiguration am C4-Kohlenstoff von **16d** als (*R*)-konfiguriert

angenommen. Diese Festlegung geschah aufgrund der folgenden Überlegungen: 1.) Das Enzym ATA-025 ist für eine Reihe von Substraten als (*R*)-selektive ATA beschrieben worden.^[7] 2.) Der Aminoalkohol **16** wurde nur dann detektiert, wenn das (*R*)-Enantiomer des Aminodonors 1-PEA in der Reaktionsmischung gegenwärtig war – nicht jedoch, wenn (*S*)-1-PEA als Aminodonor eingesetzt wurde. 3.) Die Umsetzung von *rac*-**2** mit der (*S*)-selektiven ATA-Cvi führte zur Bildung der zwei verbleibenden Stereoisomere, was mit Hilfe der GC/MS Methode 2 gezeigt wurde. Die NMR Auswertung ergab, dass es sich bei **16d** um ein *anti*-Enantiomer des Aminoalkohols handelt. Daraus schlussfolgernd ergibt sich für den biokatalytisch erhaltenden Aminoalkohol **16d** die absolute Konfiguration (*2R,4R*).

Zuordnung der *syn*- und *anti*-Isomere via NMR

Die skalaren Kopplungskonstanten des diastereotropen H3-Protons wurden zur Unterscheidung der *syn*-(**16b**, **16c**) und *anti*-Isomere (**16a**, **16d**) untersucht. Diese Konstanten korrelieren mit dem Torsionswinkel zwischen den gekoppelten Protonen und nehmen gewöhnlich, im Fall einer freien Rotierbarkeit um eine Einfachbindung innerhalb einer Alkylkette, einen Wert zwischen 6-7 Hz an. In diesem Fall scheint die Rotation behindert zu sein und die beobachteten Kopplungskonstanten weichen von den erwarteten Werten ab. Dieser Befund legt eine starke Präferenz für ein einzelnes Konformer nahe. Die charakteristischen Kopplungsmuster, welches geminale Kopplungskonstanten von rund 14 Hz beinhalteten, zeigen ein dreifaches Dublett für das Produkt **16d** der Biokatalyse (Abbildung 6A) und für den chemisch synthetisierten Aminoalkohol **16** Dubletts, welche sich weiter in Triplets mit sehr verschiedenen Kopplungskonstanten aufspalten (Abbildung 6B). Letzteres spricht für das *syn*-Isomer. Dies wird bestätigt durch die vicinalen Kopplungskonstanten von 2,0 Hz und 10,7 Hz, welche bei der Verschiebung von 1,5 ppm bzw. 1,21 ppm bestimmt wurden, denn, auf Grundlage dieser Kopplungen, müssen die Protonen H2 und H4 beide *gauche* oder *trans* zum H3-Proton orientiert sein.

Im Gegensatz dazu stammen die ungleichen vicinalen Kopplungskonstanten mit H2 oder H4 für **16d** vom *anti*-Isomer. Durch die unterschiedliche Orientierung der Hydroxy- bzw. Amino-Gruppe muss das H3 Proton notwendigerweise einen anderen Torsionswinkel mit beiden Nachbarn haben. Dadurch werden zwei *trans*-Orientierungen ausgeschlossen.

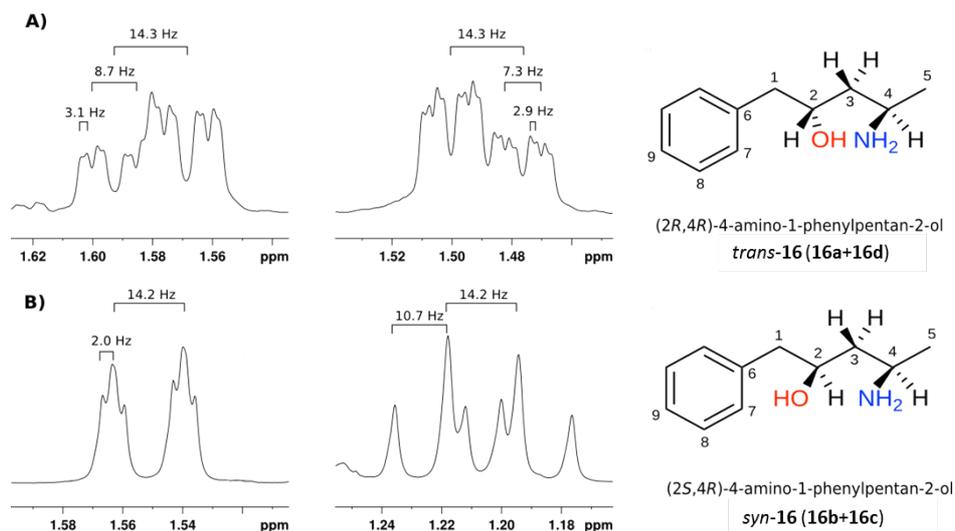


Abbildung 6: NMR-Auswertung zur Unterscheidung der *syn*- und *anti*-Isomere.

4.5 Präparative Darstellung des Aminoalkohols im Gramm-Maßstab (Enzymicals)

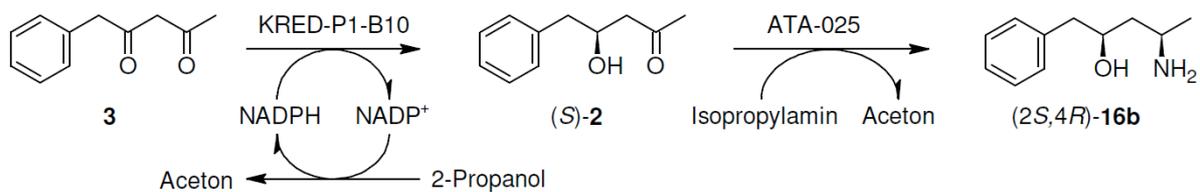


Abbildung 7: Syntheschema zur Herstellung des Aminoalkohols **(2S,4R)-16b**

Ausgehend von den experimentellen Daten der Synthese des Aminoalkohols im kleinen Maßstab wurde eine Maßstabsvergrößerung in den Gramm-Maßstab durchgeführt. Die Zielverbindung **(2S,4R)-16b** konnte erfolgreich mit der Syntheseroute in Abbildung 7 dargestellt werden. Hierfür wurde die Ausgangsverbindung **3** kommerziell beschafft – diese wurde leider erst zum Ende des Projektes kommerziell verfügbar – und mit der bereits beschriebenen KRED-P1-B10 zum Ketoalcohol **(S)-2** umgesetzt. In einem zweiten Reaktionsschritt wurde **(S)-2** mit der ATA-025 und Isopropylamin zum Aminoalkohol **(2S,4R)-16b** umgewandelt.

4.5.1 Reduktion des Diketons zum chiralen Hydroxyketon

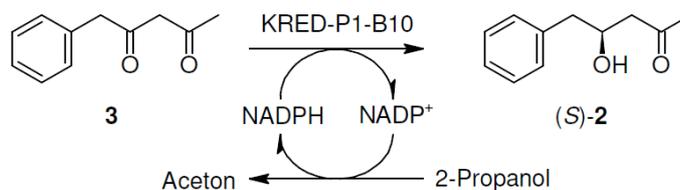


Abbildung 8: **Asymmetrische Synthese des Hydroxyketons (S)-2.** Reaktionsbedingungen: 25 mM **3** (4,7 g/L), 1 mM NADP⁺ (0,65 g/L), 1 mM MgSO₄ (0,1 g/L), 20 % (v/v) 2-Propanol und 0,8 g/L KRED Lyophilisat wurden in 100 mL 100 mM Kaliumphosphat Puffer (pH 7,5) bei 30°C gerührt.

Die enzymatische Reduktion des Diketons **3** wurde im 0,5 g Maßstab durchgeführt (Abbildung 8). Ausgehend von 0,56 g (3,2 mmol) 1-Phenylpentan-2,4-dion **3**, wurde mit Hilfe der KRED-P1-B10 und NADP⁺, 0,56 g (3,1 mmol) (4S)-4-Hydroxy-5-phenylpentan-2-on (**(S)-2**) mit einer isolierten Ausbeute von 98 % erhalten. Die Reaktion konnte bei 30 °C innerhalb von 1,5 Stunden abgeschlossen werden.

Die Reaktionslösung wurde mit dem vierfachen Volumen an Ethylacetat extrahiert und die organische Phase am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Produkt wurde als klares Öl mit einem Enantiomerenüberschuss >99 %ee erhalten und eine 1H-NMR Analyse zeigte nur geringe Verunreinigungen des Extraktionsmittels Ethylacetat.

4.5.2 Biokatalytische Aminierung des Hydroxyketons zum chiralen *syn*-Aminoalkohol

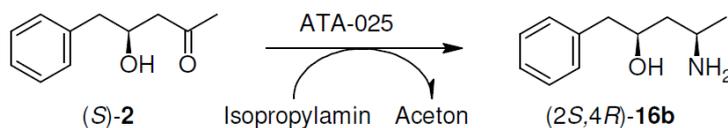


Abbildung 9: **Asymmetrische Synthese des Aminoalkohols (2S,4R)-16b.** Reaktionsbedingungen: 22 mM (**(S)-2**) (4 g/L), 2 mM Pyridoxalphosphat (0,5 g/L), 7 % (v/v) Isopropylamin, 5 % (v/v) 2-Propanol und 4 g/L ATA-025 Lyophilisat wurden in 120 mL 100 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7,5) bei 30°C in einem belüfteten Runkolben gerührt.

Das Produkt der asymmetrischen Reduktion (**(S)-2**) konnte vollständig, mit der ATA-025 zum gesuchten Aminoalkohol (**(2S,4R)-16b**) umgesetzt werden.

Diese Synthese wurde ebenfalls im 0,5 g Maßstab durchgeführt (Abbildung 9). 0,38 g der Zielverbindung (**(2S,4R)-4-Amino-1-phenylpentan-2-ol (2S,4R)-16b**) wurden mit einer isolierten Ausbeute von 60 % erhalten.

Die Umsetzung erfolgte bei 30 °C im wässrigen Puffersystem mit Isopropylamin als Aminodonor und zeigte nach 24 Stunden Vollumsatz. Die Reaktionslösung wurde mit Natronlauge auf pH >10 eingestellt und mit 3,5 Liter Ethylacetat extrahiert. Die getrockneten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und das Produkt (2*S*,4*R*)-**16b** wurde als Öl erhalten. Die gaschromatographische Untersuchung ergab ein enantiomeren- als auch diastereomerenreines Produkt (>99 %ee; >99 %de, Abb. 10). Die Struktur konnte durch ein 1H- und 13C-NMR Spektrum bestätigt werden.

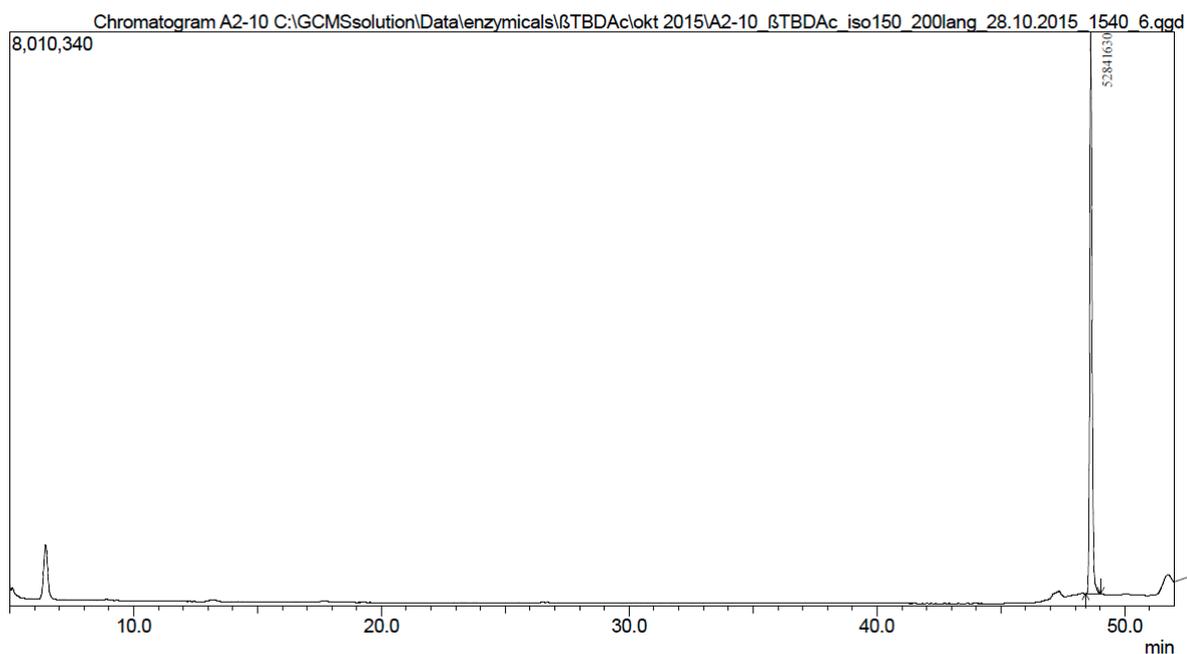


Abbildung 10: GC-Chromatogramm zur Analyse der optischen Reinheit des Produkts **16b**.



Abbildung 11: Isoliertes Produkt (2*S*,4*R*)-**16b**

Die biokatalytische Synthese von (2*S*,4*R*)-4-Amino-1-phenylpentan-2-ol (2*S*,4*R*)-**16b** ausgehend von 1-Phenylpentan-2,4-dion **3** konnte erfolgreich im Gramm-Maßstab durchgeführt werden. Die Ausbeute der Reaktion über zwei Schritte betrug 54 % und das Produkt konnte

mit >99 %ee und >99 %de erhalten werden. Dieses Ergebnis kann als sehr positiv angesehen werden, da die Reaktionen Optimierungspotential aufweisen. Hierbei können durch Optimierung der Reaktionsbedingungen wesentlich höhere Substratkonzentrationen eingeführt werden und durch einen geringeren Lösungsmiteleinsatz in der Aufarbeitung, die Prozessökonomie verbessert werden. Durch den Einsatz von Enzymen mit entgegengesetzter Enantiopräferenz können, über diesen Prozess, alle vier Stereoisomere dieser Verbindung zugänglich gemacht werden.

5 SOLL/IST-VERGLEICH

Nachfolgend ist dargestellt, inwieweit die Ziele der Meilensteinplanung für das Projekt erreicht wurden.

M1 (6 Monate): Modellsubstrate wurden ausgewählt und deren Synthese begonnen.

M2 (12 Monate): Synthesen der wichtigsten Modellsubstrate und Produktstandards erfolgreich. Durch Komplikationen bei den Synthesen kam es zu Verzögerungen im weiteren Verlauf des Projekts. Folgende im Antrag angestrebten Ziele wurden (mit Verzögerung) erfolgreich realisiert:

- Entwicklung einer Chiralanalytik für die Hydroxyketone und Aminoalkohole
- Identifizierung erster geeigneter Wildtypenzyme
- Demonstration der Zweistufenreaktion (ATA+KR) im präparativen Labormaßstab
- Eine Toolbox verschiedener ATA und KR für die Herstellung verschiedener Stereoisomere der Zielverbindung steht zur Verfügung.
- Upscaling der Zweistufenreaktion in den Gramm-Maßstab durch Enzymicals
- Beurteilung des Umweltentlastungspotentials durch Enzymicals

Folgende Ziele konnten noch nicht erreicht werden bzw. wurden nicht weiter verfolgt:

- Auf Protein-Engineering im größeren Umfang wurde vorerst verzichtet, da die Wildtyp-Enzyme für erste Reaktionen im präparativen Maßstab ausreichend aktiv und vor allem enantioselektiv waren.
- Aus Zeitgründen musste die Optimierung der präparativen Reaktionen bis hin zum Multigramm-Maßstab durch Protein- und Reaktionsengineering zurückgestellt werden.
- Die Toolbox wird zukünftig erweitert werden: Vorrangiges Ziel ist die Identifizierung einer (*R*)-selektiven KRED zur Darstellung des (*R*)-4-Hydroxy-5-phenylpentan-2-on, sowie von Transaminasen welche die „innere“ Ketofunktion transaminieren, damit die regioisomeren Aminoalkohole zugänglich werden. Dafür wurden bereits schon in einer Zusammenarbeit mit einem Doktoranden aus dem AK Bornscheuer erste Mutanten von Transaminasen identifiziert, welche eine breitere Substratspezifität aufweisen und einen guten Ausgangspunkt für zukünftige Experimente darstellen.^[8]

6 WIRTSCHAFTLICHKEITSBETRACHTUNGEN UND ÖKOEFFIZIENZ-ANALYSE

Die Betrachtung des biokatalytischen Prozesses zur Herstellung von 1,3-Aminoalkoholen kann nur qualitativ erfolgen, da nur sehr wenige Vergleichsprozesse beschrieben sind und innerhalb dieses Projekts nur eine Zielverbindung untersucht werden konnte.

Der große Vorteil dieses biokatalytischen Prozesses sind seine milden Reaktionsbedingungen, das wässrige Reaktionsmedium und die exzellente Selektivität der Enzyme. Obwohl der aktuelle Prozess auf einer niedrigen Optimierungsebene steht, kann er im Vergleich zu einem rein chemischen Prozess durchaus vergleichbare Ausbeuten liefern.

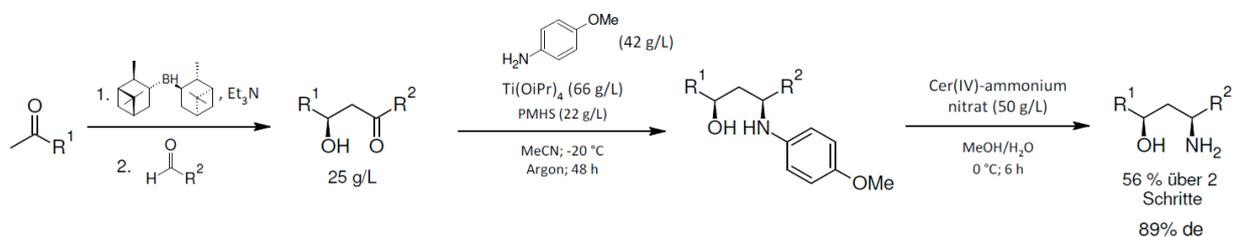


Abbildung 10: Übergangsmetall-katalysierte Syntheseroute zur Herstellung von *syn*-1,3 Aminoalkoholen

In einer chemischen Synthese von 1,3-Aminoalkoholen kann die Alkoholfunktion über gut etablierte selektive Aldolreaktionen eingeführt werden.^[9] Dieser Syntheseweg wurde für die Route in Abbildung 12 genutzt, um den chiralen Alkohol als Intermediat zu erhalten. Die Ausgangsstoffe der Aldolreaktion sind in diesem Fall ein Keton und ein Aldehyd welche mittels eines chiralen Selektors zum Hydroxyketon umgesetzt werden. Im darauffolgenden Reaktionsschritt wird die Aminofunktion über reduktive Aminierung an der verbliebenen Ketogruppe eingeführt. Die Selektivität dieser Reaktion wird durch den eingesetzten Titan-Katalysator realisiert und führt selektiv zu *syn*-1,3-Aminoalkoholen. Die Aminogruppe wird hierbei über eine 4-Methoxyphenyl Gruppe geschützt. Das Reduktionsmittel der chemischen Synthese ist Polymethylhydrosiloxan, weshalb die Reaktion wasserfrei und unter Schutzatmosphäre durchgeführt wird. Um den freien Aminoalkohol zu erhalten wird im letzten schritt die PMP-Schutzgruppe in einer methanolischen Cer-Ammoniumnitrat-Lösung abgespalten. Die Selektivität dieser Reaktion gibt den *syn*-1,3-Aminoalkohol, laut Literatur, zu 89 % de mit einer isolierten Ausbeute von 56 % über die letzten zwei Reaktionsschritte.

Im Vergleich zeigt sich, dass mit der biokatalytischen Synthese der 1,3-Aminoalkohol mit >99 %ee und >99 %de in zwei Reaktionsschritten erhalten werden konnte (Abbildung 5), wohin

gegen in der rein chemischen Synthese drei Reaktionsschritte nötig sind. Des Weiteren werden in der chemischen Synthese alle Zwischenprodukte über Säulenchromatographie gereinigt, was in der biokatalytischen Synthese, durch die hohe Regio- und Stereoselektivität der Enzyme entfällt. Einen weiteren Vergleichspunkt stellen die Reaktionsbedingungen der beiden Synthesestrategien dar. Die biokatalytische Synthese wird ausschließlich in wässrigem gepuffertem Reaktionsmedium bei 30 °C durchgeführt. Die chemische Synthese benötigt wasserfreies organisches Lösungsmittel welches unter Schutzgas und starker Kühlung gehalten werden muss, um die gewünschten Produkte zu erhalten. Ein letzter Punkt ist die Verwendung der unterschiedlichen Reagenzien in den beiden Syntheserouten.

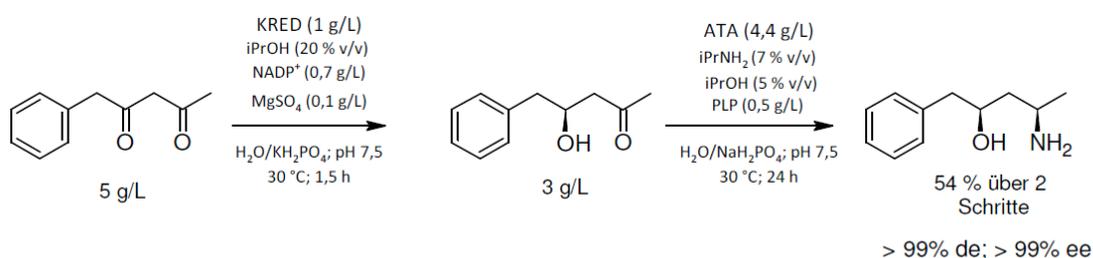


Abbildung 11: Biokatalytischer Gesamtprozess zur Herstellung von 1,3-Aminoalkoholen

In der chemischen Synthese werden Luft- und Wasser-empfindliche Reagenzien, Übergangsmetalle und stark umweltgefährdende Stoffe benötigt, welche am Ende der Gesamtreaktion der Entsorgung zugeführt werden müssen. Alle in der biokatalytischen Synthese verwendeten Reagenzien, ausgenommen die Edukte und Produkte, können biologisch abgebaut werden und stellen kein Umweltrisiko dar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die biokatalytische Synthese gegenüber der Chemischen, besonders im Hinblick auf die Mengen an umweltbelastenden Abfallströmen und Energieaufwand deutlich besser abschneidet. Außerdem ist die chemische Synthese limitiert auf *syn*-1,3-Aminoalkohole, wobei auf biokatalytischem Wege durch den Einsatz von Enzymen, mit der entsprechenden Enantiopräferenz, alle möglichen vier Isomere des 1,3-Aminoalkohols erhalten werden können, ohne dabei substanziell die Reaktionsbedingungen zu verändern. Für eine weitere Optimierung der Ökoeffizienz und der Wirtschaftlichkeit wurde in unseren ersten Analysen vor allem eine Erhöhung der Produktkonzentration als entscheidender Parameter identifiziert.

Die erfolgreiche Etablierung der biokatalytischen Synthese von 1,3-Aminoalkoholen konnte das Produkt im Gramm-Maßstab erzeugen, wodurch bei der Enzymicals AG Tests zur Evaluie-

rung des Produkts durchgeführt werden können, um dieses in das Chemikalien-Portfolio der Firma aufzunehmen.

7 DISKUSSION UND FAZIT

Trotz anfänglichen Verzögerungen bei den Synthesen der Substrat- und Produktstandards aufgrund unerwarteter Komplikationen ist es uns gelungen, die wesentlichen Projektziele zu erreichen. Die Stärke des Konzepts einer modularen Plattform von Biokatalysatoren für die Synthese verschiedener Stereoisomere eines Aminoalkohols konnte anhand der gewählten Modellverbindungen nachdrücklich demonstriert werden. Wir erwarten, dass diese Strategie sich als Plattformtechnologie innerhalb des Forschungsfelds der Biokatalyse und auch für industrielle Anwendungen etablieren wird. Das Produkt konnte im 0,5 g-Maßstab präparativ synthetisiert werden und wird in das Produktportfolio der Firma Enzymicals aufgenommen werden. Das Potential für die Entlastung der Umwelt konnte aufgezeigt werden, sowie weitere Schritte, wie in weiterführenden Arbeiten bei der Enzymicals die Wirtschaftlichkeit und Umweltentlastung erhöht werden können.

8 KOOPERATIONEN / PROJEKTTREFFEN

Häufigkeit	Art des Meetings	TeilnehmerInnen
Bei Bedarf jederzeit kurzfristig vereinbart	Besprechungen zum Projekt mit den Mitarbeitern der Enzymicals AG	Dr. Ulf Menyes, Dr. Sonja Borchert, Dr. Henrike Brundiek
Regelmäßig alle vier Wochen	Treffen der "Transaminase-Gruppe" mit Präsentation und Diskussion der Ergebnisse sowie der verfolgten experimentellen Strategien im Feld der biokatalytischen Aminierung	Mitarbeiter des AK Bornscheuer und AK Höhne sowie Henrike Brundiek von der Enzymicals AG
Halbjährlich	Gruppenseminar der Arbeitsgruppen Bornscheuer, Höhne und Kabisch	Alle Mitglieder der genannten Gruppen
29.02.2013	Projektbesprechung im Vorfeld zur Tagung "Transam2013"	Prof. Per Berglund, Mattias Anderson, KTH Stockholm
Juni/Juli 2013	Forschungsaufenthalt am Institut für Angewandte Synthesechemie	Prof. Marko Mihovilovic, Dr. Florian Rudroff, TU Wien

9 TEILNAHME AN PROJEKT-RELEVANTEN VERANSTALTUNGEN

	<u>Besuchte Konferenzen</u>	<u>Beiträge zu Konferenzen (Poster)</u>
2015	Transam 2.0 - Chiral Amines Through (Bio)Catalysis, Greifswald, Deutschland	Selective access to all four diastereomers of an 1,3-amino alcohol by combination of a keto reductase- and an amine transaminase catalysed reaction
2014	3 rd Multistep Enzyme Catalyzed Processes (MECP14), Madrid, Spanien	Synthesis of optically pure diastereomers with an 1,3-amino alcohol motif using an enzyme cascade reaction
2013	1 st International Symposium on Transaminase Biocatalysis (Transam2013), Stockholm, Schweden	

10 VERÖFFENTLICHUNGEN/PATENTANMELDUNGEN

Kohls, H., Anderson, M., Dickerhoff, J., Weisz, K., Córdova, A., Berglund, P., Brundiek, H., Bornscheuer, U.T., Höhne, M. (2015), Selective access to all four diastereomers of an 1,3-amino alcohol by combination of a keto reductase- and an amine transaminase-catalysed reaction, *Adv. Synth. Catal.*, **357**, 1808-1814

11 LITERATUR

- [1] Schätzle, S; Steffen-Munsberg, F; Thontowi, A; Höhne, M; Robins, K; Bornscheuer, UT; Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (*R*)-selective amine transaminases. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2439-2445
- [2] Fauve, A; Veschambre, H; Regiospecificity and enantiospecificity in microbiological reduction of acyclic β -diketones. *Biocatal. Biotrans.* **1990**, *3*, 95-109
- [3] Demir, AS; Hamamci, H; Ayhan, P; Duygu, AN; İgdir, AC; Capanoglu, D; Fungi mediated conversion of benzil to benzoin and hydrobenzoin. *Tetrahedron: Asymm.* **2004**, *15*, 2579-2582
- [4] Humble, MS; Cassimjee, KE; Abedi, V; Federsel, H-J; Berglund, P; Key amino acid residues for reversed or improved enantiospecificity of an ω -transaminase. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1167-1172
- [5] Anderson, M; Afewerki, S; Berglund, P; Córdova, A; Total synthesis of capsaicin analogues from lignin-derived compounds by combined heterogeneous metal, organocatalytic and enzymatic cascades in one pot. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2113-2118
- [6] Bartlett, SL; Beaudry, CM; High-yielding oxidation of β -hydroxyketones to β -diketones using *o*-iodoxybenzoic acid. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9852-9855
- [7] Paul, CE; Rodríguez-Mata, M; Busto, E, *et al.*; Transaminases applied to the synthesis of high added-value enantiopure amines. *Org. Proc. Res. Dev.* **2013**, *18*, 788-792
- [8] Nobili, A; Steffen-Munsberg, F; Kohls, H; Trentin, I; Schulzke, C; Höhne, M; Bornscheuer, UT; Engineering the active site of the amine-transaminase from *Vibrio fluvialis* for the asymmetric synthesis of aryl-alkyl amines and amino alcohols, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 757-760
- [9] Menche, D; Arikan, F; Li, J; Rudolph, S; Directed reductive amination of β -hydroxyketones: convergent assembly of the ritonavir/lopinavir core. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 267-270