

ABSCHLUSSBERICHT

DBU AZ 31842-32

„ENTWICKLUNG EINER BIOKATALYTISCHEN SYNTHESE VON β -CHIRALEN AMINEN“

Antragsteller:

Herbrand PharmaChemicals GmbH

Dr. Martin Erhardt

Brambachstraße 31

77723 Gengenbach

Tel: 07803 9687 18

Email: erhardt@herbrand-hpc.de



Kooperationspartner:

Jun.-Prof. Dr. Matthias Höhne

Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Institut für Biochemie, Proteinbiochemie

Felix-Hausdorffstr. 4

17487 Greifswald

Tel. 03834 86 22832

Email: Matthias.Hoehne@uni-greifswald.de



Projektbeginn: 01.09.2014

Gengenbach, 27.09.2018

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	2
2	ZUSAMMENFASSUNG	4
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	6
3.1	Synthese der Standards zu analytischen Zwecken	6
3.2	Teilprojekt „CarbonsäureReduktase“	7
3.2.1	Klonierung und Expression der Reduktasen	8
3.2.2	Untersuchung der Aldehyddehydrogenase	9
3.2.3	Untersuchung der Carbonsäurereduktasen	10
3.3	„BackUp-Projektprojekt: Aldehyd-Synthese für Transaminase“	15
3.4	Teilprojekt „Transaminase“	18
3.4.1	Analytik und Enzymscreening	18
3.4.2	Racemisierungsstudien	21
3.4.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen und Upscaling	23
3.5	Teilprojekt „Enzym-Herstellung“	30
3.6	Teilprojekt „UpScaling“	31
3.7	Teilprojekt „Ökoeffizienz-Analyse“	31
4	AUSBLICK	33
5	SOLL/IST-VERGLEICH	34

1 EINFÜHRUNG

Für das Thema der Entwicklung einer biokatalytischen Synthese β -chiraler Amine wurde anfänglich Pregabalin als Zielmolekül gewählt, welches auch aufgrund der späteren Vermarktung einen Anreiz stellt: Pregabalin wird von der Firma Pfizer mit einem Jahresumsatz in Höhe von 4,6 Mrd \$ vertrieben. In der mehrstufigen Synthese von Pfizer erkannten die Antragsteller Optimierungspotential in Bezug auf ökologische wie auch ökonomische Effizienz und schlugen eine chemoenzymatische Synthese vor, die für β -chirale Amine allgemein anwendbar ist (Abb. 1-1). Die Route beinhaltet hauptsächlich zwei enzymatische Schritte: Carbonsäure-Reduktasen katalysieren die Bildung eines Aldehyds, welcher nachfolgend durch eine Transaminase-katalysierte reduktive Aminierung in das β -chirale Amin überführt wird (Abb. 1-1).



Abbildung 1 Chemo-Enzymatische Darstellung eines β -chiralen Amins am Beispiel von Baclofen.

A) Reduktion der Carbonsäure **1**, chemische Alkylierung des gebildeten Aldehyds **2**, Aminierung des Carbonsäureesters **4** und Racemisierung des verbleibenden Aldehyd-Enantiomers (nicht dargestellt). Prinzipiell kann die freie Säure (R=H) oder ein Ester (R=Alkyl) als Substrat dienen, je nach Akzeptanz durch die Enzyme. Der Ester muss ggf. am Ende zum freien Baclofen (R=H) hydrolysiert werden.

Im Laufe des Projekts wurde ein ergänzendes Patent zur Herstellung von Pregabalin der Firma Pfizer eingereicht und später auch akzeptiert. Dieses Patent deckte sich in wesentlichen Punkten, insbesondere aber in dem der reduktiven Aminierung mittels Transaminasen, mit den im Rahmen des DBU-Projekts entwickelten Ideen. Das Patent ist auf Pregabalin beschränkt. Aus diesem Grunde wurde der Projektfokus auf weitere β -chirale Amine ausgeweitet, die möglicherweise basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen zur biokatalytischen Herstellung von Pregabalin (siehe Abbildung 1) hergestellt werden könnten. Ein entsprechender Änderungsantrag wurde Ende Oktober 2015 vorgelegt und genehmigt. Der Projektname lautet seither „ENTWICKLUNG EINER BOKATALYTISCHEN SYNTHESE VON β -CHIRALEN AMINEN“.

Von besonderem Interesse ist hierbei Baclofen, das schon seit längerer Zeit als Muskelrelaxans verwendet wird. In Zukunft könnte durch eine Indikationserweiterung (Unterstützung bei einer Abstinenztherapie) ein neues Anwendungs- und Marktfeld hinzukommen. Die Zulassung hierfür ist bereits für Frankreich erteilt und könnte bei Erfolg ggf. ausgeweitet werden. Zurzeit befinden sich rund 44 Fertigarzneimittel auf dem deutschen Markt. Der weltweite Jahresumsatz liegt bei ca. 133 Mio Euro. Nur das Racemat findet pharmazeutisch Verwendung, da das wirksame (*R*)-Baclofen nur schwer zu isolieren ist. Sollte unsere biokatalytische Synthese erfolgreich sein, wäre es möglich, Präparate nur mit dem bis zu 5-fach aktiverem (*R*)-Baclofen zu vermarkten. Dies wäre zwar mit einer Neuzulassung verbunden, jedoch würde es den Gedanken der spezialisierten Pharmazie verstärken, die sich auf Patientenindividualität und Reinheit der wirksamen Bestandteile fokussiert. Außerdem wäre es im Vergleich zu den aktuellen Syntheseschritten eine Verbesserung in puncto Effizienz und Verringerung schädlicher Umwelteinflüsse.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die angestrebte chemo-enzymatische Synthese von Baclofen enthält zwei enzymatische Schlüsselschritte (Abbildung 1). Diese werden in den beiden Teilprojekten „Carbonsäure-Reduktase“ und „Transaminase“ bearbeitet.

In einer ersten Projektphase nach der Änderung zum Baclofen wurden an der Universität Greifswald die benötigten Enzyme für die beiden enzymatischen Reaktionsschritte (Carbonsäure-Reduktase und Transaminase) gescreent und ausgewählte Substrate im Auftrag von Herbrand PharmaChemicals hergestellt. Nach dem erfolgreichen Optimieren von Reaktions- und Prozessparametern sollte ein erstes UpScaling beim Partner Enzymicals AG erfolgen, ehe der Prozess für die zweistufige Synthese zu Herbrand PharmaChemicals in den Prozess-Maßstab transferiert werden sollte.

Teilprojekt: Carbonsäure-Reduktase

Bisher konnten in diesem Teilprojekt, bei dem an einer chemisch sehr interessanten, bislang nur wenig erforschten Enzymklasse gearbeitet wird, nur einzelne Achtungserfolge erzielt werden. Im Photometer-Screening konnten geringe Umsätze nachgewiesen werden, allerdings fehlt es noch an einer ökonomisch sinnvollen Cofaktor-Regenerierung, einer Steigerung der Umsätze sowie dem Nachweis einer Regioselektivität.

Das Projekt wurde zu Beginn im Rahmen der Promotionsarbeit von Herrn Christian Thöle bearbeitet, welcher jedoch nach zwei Jahren aus dem Projekt aus persönlichen Gründen ausschied. Nach kurzer Suche und Einarbeitungszeit hat Herr Andy Beier das Projekt weitergeführt.

Trotz kostenneutraler Verlängerung konnte dieses Teilprojekt nicht in den präparativen Maßstab überführt werden und der Aufwand, um die CAR im Rahmen der Baclofensynthese nutzen zu können, überstieg die Kapazität dieses Projekts. Deshalb wurden die Arbeitskräfte in diesem Projekt auf den Teil Transaminase fokussiert. Da die CAR trotz alledem ein Enzym mit großem Potential darstellt, wurden die für das Projekt erstellten CARs mit einem Spektrum an Substraten gescreent, welche in Zukunft z.B. für die Synthese von Aromastoffen relevant sind. Weiterhin wurden Voruntersuchungen für eine Charakterisierung der Regioselektivität der CARs durchgeführt.

Wie im Zwischenbericht und dem Antrag zur kostenneutralen Verlängerung angekündigt, wurde durch die Firma Herbrand PharmaChemicals versucht, einen alternativen Syntheseweg für die Substrate der Transaminasen zu etablieren: das „Backup-Projekt: Aldehyd-Synthese für Transaminase“.

„BackUp-Projekt: Aldehyd-Synthese für Transaminase“

Alternativen Synthese-Strategien für die bisher nicht erfolgreich skalierbare Carbonsäure-Reduktase-Reaktion wurden evaluiert und Synthesen im Gramm-Maßstab etabliert. Trotz intensiver Bemühungen, ökonomische und ökologische Aspekte bei den Synthesen zu berücksichtigen, waren die Protokolle nicht geeignet für eine Maßstabsvergrößerung (insbesondere, da quantitative Mengen an Raney-Nickel gebraucht werden). Eine ökonomisch und ökologisch sinnvolle Alternative zu den Substraten der Transaminase-Reaktion konnte zudem nicht gefunden werden. Eine ebenfalls hinzugezogene Firma, die auf die Entwicklung von Syntheserouten spezialisiert ist, konnte ebenfalls keine wirtschaftlich durchführbare Syntheseentwicklung in Aussicht stellen.

Teilprojekt: Transaminase

Im Teilschritt der reduktiven Aminierung mittels Transaminasen konnten Enzyme erfolgreich gescreent und identifiziert werden, die Baclofen aus dem entsprechenden Säure-Aldehyd herstellen können. Auch wenn der Prozess noch nicht so weit optimiert ist, sind die Grundsteine für eine Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Baclofen gelegt. Die Synthese von (*R*)-Baclofen konnte im analytischen mL-Maßstab mit einem Enantiomerenüberschuss von *ee* >99% durchgeführt werden. Der Projektfortschritt war jedoch noch nicht so weit, dass ein UpScaling sinnvoll durchgeführt werden konnte. Dies wurde Mitte 2017 im Rahmen einer beantragten kostenneutralen Verlängerung kommuniziert. Zur Steigerung der Effizienz hinsichtlich eines industriell anwendbaren Prozesses wurde in der verbliebenen Zeit mit der Optimierung der Reaktionsparameter begonnen. Insbesondere die Prozessparameter Enzymstabilität und Produktkonzentrationen müssten jedoch von den bisherigen geringen mM-Konzentrationen (max. 40 mM) auf industrielle Ansprüche (>200mM) weiter gesteigert werden.

Sind diese Hürden überwunden, könnte ein Zwischen-UpScaling mit maßgeschneidertem Downstream-Processing im Liter-Maßstab durchgeführt werden. Auf dieser Basis kann dann eine prozessbegleitende Ökoeffizienz-Analyse sinnvoll sein, um die Stellgrößen bei Synthese (z.B. in Bezug auf Energieeinsatz, Prozessführung, -dauer) und im Einkauf (z.B. Transportwege) abbilden, identifizieren und optimieren zu können.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Synthese der Standards zu analytischen Zwecken

(Arbeitspaket Herbrand PharmaChemicals GmbH)

Nach der Zulassung des Änderungsantrags und des Wechsels auf das neue Zielmolekül wurden die erforderlichen Substrate initial per Auftrags-synthese in kleinen Mengen erworben, um weiteren Verzögerungen im Projektplan entgegenzuwirken.

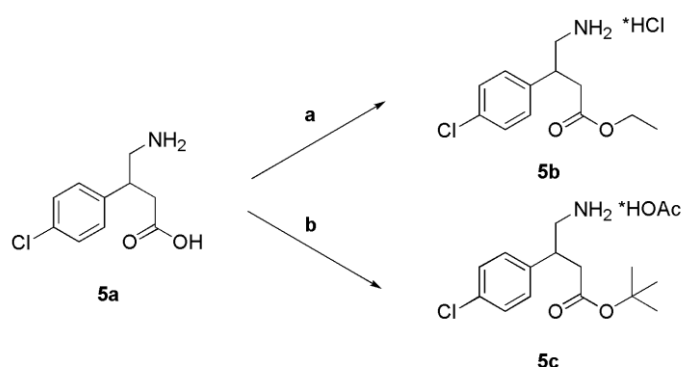


Abbildung 2 Syntheseroute der Substrate **2**: 4-Amino-3-(4-chloro-phenyl)-butyric acid ethyl ester *hydrochloride; **3**: 4-Amino-3-(4-chloro-phenyl)-butyric acid tert-butyl ester *HOAc

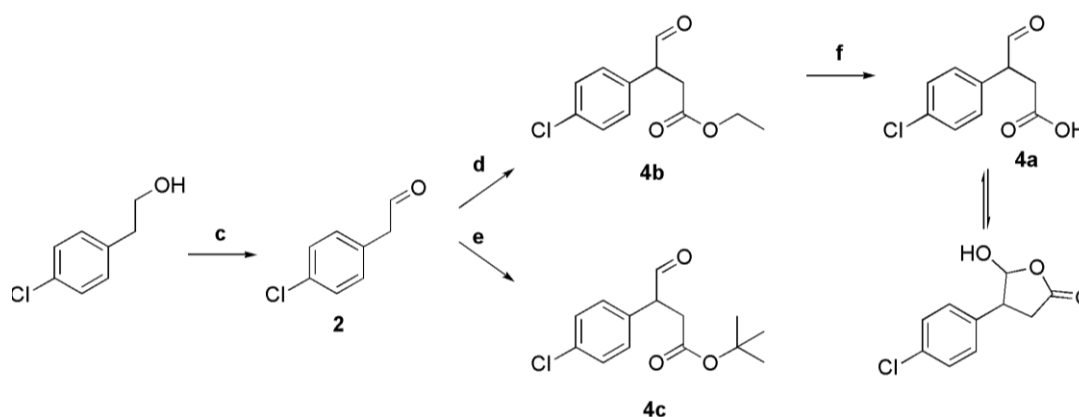


Abbildung 3 Syntheseroute der Substrate **6**: 3-(4-chloro-phenyl)-4-oxo-butyrac acid ethyl ester; **7**: 3-(4-chloro-phenyl)-4-oxo-butyrac acid tert-butyl ester; **8**: 3-(4-chloro-phenyl)-4-oxo-butyrac acid

Die benötigten Substrate und Produkte der Carbonsäure-Reduktase bzw. der Transaminase konnten im analytischen Maßstab durch die Firma Herbrand PharmaChemicals erfolgreich hergestellt werden. Die aufwändigen und ökonomisch wie ökologisch nicht sinnvollen Synthesen dienten dazu, genügend Material zur Etablierung der Analytik und für die Durchführung erster biokatalytischer Synthesen bereitzustellen.

3.2 Teilprojekt „CarbonsäureReduktase“

(Arbeitspaket Universität Greifswald)

Für das Projekt wurden zwei verschiedene Enzyme für die Reduktion untersucht: Aldehyddehydrogenasen und Carbonsäurereduktasen (Abb. 4). Aldehyddehydrogenasen sind in der Literatur bekannt dafür, Aldehyde unter Verbrauch von NAD^+ zur Säure zu reduzieren. In den meisten Literaturstellen wurde bislang nicht untersucht, ob die Reaktion reversibel ist. Nur in einem Fall wurde von einer reversiblen Reaktion mittels *E. coli* Aldehyddehydrogenase berichtet, was für das Projekt den Anlass gab, dieses Enzym genauer zu untersuchen, da hierbei auf Zugabe von ATP verzichtet werden könnte. Da eine ungünstige Gleichgewichtslage erwartet wurde, sollten mehrere Möglichkeiten zur Gleichgewichtsverschiebung untersucht werden.

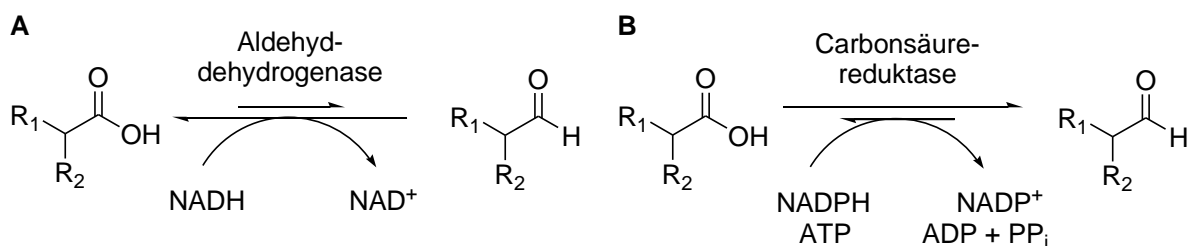


Abbildung 4 Reaktionsschema der biokatalytischen Synthese von Aldehyden mit A) Aldehyddehydrogenasen und B) Carbonsäurereduktasen

Neben einer Charakterisierung der Substratspezifität für die Reduktasen waren die Zielsubstrate für die Baclofensynthese 2-(4-Chlorphenyl)-essigsäure und 2-(4-Chlorphenyl)-succinylsäure und deren Ethyl und *t*-Butylester, da diese direkt oder mit einem chemischen Zwischenschritt mit der Aminierung gekoppelt werden könnten (Abbildung 5). In letzterem

Falle wäre es wichtig, dass die Reduktion ohne Stereoselektivität abläuft, da sonst nicht das gesamte Säureracemat umgesetzt werden würde.

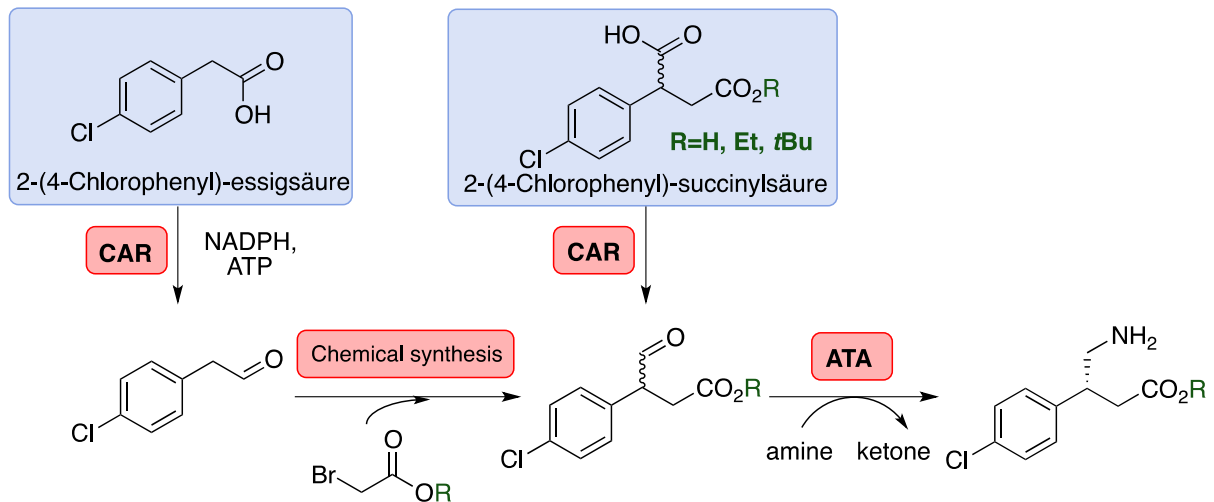


Abbildung 5: Mögliche Routen der Carbonsäurereduktion für die Baclofensynthese

3.2.1 Klonierung und Expression der Reduktasen

Die Aldehyddehydrogenase aus *E. coli* K12 (EcAldH) wurde erfolgreich kloniert. Die Expression des Gens sowie die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgten nach Literaturangaben. Zur Untersuchung der Carbonsäurereduktasen wurden als Referenzenzyme die in der Literatur beschriebene Carbonsäurereduktase sowie die dazugehörige Phosphopantethointransferase aus *N. iowensis* (NiCSR und NiPPT) als synthetische Gene bestellt. Eine Liste Sequenz-ähnlicher, bisher uncharakterisierter Enzyme wurde mittels BLAST erstellt und eine Auswahl von vier R1-Stämme mit putativen Carbonsäurereduktasen erstellt, die von der Firma Enzymicals bereitgestellt wurden.

Tabelle 1: Auswahl von R1-Stämmen mit putativen Carbonsäurereduktasen aus der Gruppe der Aktinobakterien unter Angabe der Sequenzidentität zur NiCSR und des GC-Gehaltes.

Aktinobakterien	Identität zur NiCSR	GC-Gehalt
<i>Kutzneria albida</i> DSM43870	67 %	71 %
<i>Nocardia seriolae</i>	67 %	70 %
<i>Actinokineospora diopyrosa</i>	64 %	73 %
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	62 %	65 %

Lediglich die Amplifikation des Genes aus *K. albida* gelang nach Optimierung der PCR-Bedingungen. Als Hauptursache für das Misslingen der Amplifikation der Gene wird die Kombination aus hohem GC-Gehalt und der langen Sequenzlänge von 3,5 kb angesehen. Der für die Amplifikation des Genes aus *K. albida* notwendige Anteil von DMSO (5 % v/v) begünstigte Punktmutationen, weshalb nach der Klonierung des PCR-Produktes eine große Menge von Varianten sequenziert werden musste, bevor ein fehlerfreies Konstrukt erhalten wurde.

Um weitere Carbonsäurereduktasen charakterisieren zu können, wurden zwei putative Carbonsäurereduktase-Gene als kostengünstige Alternative zu synthetischen Genen in Form von unklonierten, linearen DNA-Fragmenten bestellt: ein codonoptimiertes Gen aus *R. wratislaviensis* mit 62 % Sequenzidentität zur NiCSR sowie ein codonoptimiertes Gen aus *Allokutzneria albata* mit 55 % Sequenzidentität. Pro Gen wurden zwei Fragmente bestellt, deren Sequenzen sich teilweise überlappen. Durch Zugabe endständiger Primer konnten aus den DNA-Fragmenten mit Hilfe einer PCR die vollständigen Gensequenzen gewonnen werden, welche anschließend erfolgreich kloniert wurde.

Die rekombinante Herstellung der NiCSR sowie der NiPPT konnte nach Literaturangaben durchgeführt werden. Nach Anpassung der Expressionsbedingungen (Induktorkonzentrationen, Temperatur- und Zeiten) konnten die bisher uncharakterisierten Reduktasen mit der Transferase löslich coexprimiert werden.

3.2.2 Untersuchung der Aldehyddehydrogenase

Da die Aldehyddehydrogenase aus *E. coli* K12 unter physiologischen Bedingungen die NAD⁺-abhängige Oxidation ihrer Substrate katalysiert und die Rückreaktion in die reduktive Richtung lediglich für 3-Hydroxypropionsäure in der Literatur bekannt ist, wurden mit dem Enzym sowohl Aktivitätstests für die gewünschten Reduktionen von 2-(4-Chlorphenyl)-essigsäure zum Aldehyd durchgeführt, als auch für die korrespondierenden Oxidationsreaktionen. Für 2-(4-Chlorphenyl)acetaldehyd konnte eine spezifische Aktivität von 2,8 U/mg bestimmt werden. Die Rückreaktionen der Carbonsäure mit NADH zum Aldehyd und NAD⁺ hingegen konnte nicht festgestellt werden. Auch eine durch die EcAldH katalysierte NADH-abhängige Reduktion von 3-Hydroxypropionsäure wurde nicht beobachtet, obwohl der V_{\max} -Wert für dieses Enzym/Substrat-Paar in der Literatur mit $0,30 \pm 0,05$ U/mg angegeben ist. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Aldehydbildung wäre durch die Entfernung

des Aldehydes in einem Zweiphasensystem denkbar. Um herauszufinden, ob sich die EcAldH für die Katalyse in einem Zweiphasensystem eignet, wurde die Stabilität des Enzyms in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht, wobei mit Ethylacetat, Methylt-butylether, *n*-Hexan und Toluol jeweils ein Vertreter aus der Kategorie der Ester, Ether, Kohlenwasserstoffe und Aromaten getestet wurde. Bereits eine einstündige Inkubation der wässrigen Enzymlösungen mit den Lösungsmitteln führte zu über 60 % Aktivitätsverlust, wobei eine Durchmischung der Phasen eine noch schnellere Inaktivierung verursacht. Nach 3,5 h konnte keine Restaktivität mehr detektiert werden. Selbst die Inkubation bei 37°C in Puffer in Abwesenheit von Lösungsmittel führte zu einem starken Aktivitätsverlust. Die Daten legen nahe, dass sich die EcAldH nicht für ein Zweiphasensystem eignet.

Des Weiteren wurden Biokatalysen in Gegenwart eines Überschusses einer Glucosedehydrogenase durchgeführt, um festzustellen, ob bei hohen NADH-Konzentrationen eine Reduktion der Säure durch die EcAldH katalysiert wird. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurden Proben genommen, extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. In keinem der Ansätze konnte der Aldehyd oder der entsprechende (durch eine weitere Reduktion generierte) Alkohol detektiert werden.

3.2.3 Untersuchung der Carbonsäurereduktasen

Mit Hilfe des NADPH-Assays konnten die gereinigten Carbonsäurereduktasen über den Verbrauch von NADPH unter zuvor beschriebenen Bedingungen^[2b] photometrisch auf Aktivitäten gegenüber einer Reihe verschiedener Substrate untersucht werden (s. Tabelle 2). Hierfür wurden die Reduktasen nach Coexpression mit der NiPPT über His₆-Tag-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend entsalzt.

Die gewünschten Substrate 2-(4-Chlorphenyl)essigsäure und -bernsteinsäure wurden von drei Carbonsäurereduktasen umgesetzt, wobei 2-(4-Chlorphenyl)bernsteinsäure unter den getesteten Bedingungen von zwei der drei bisher uncharakterisierten Enzyme besser umgesetzt wurde als von der in der Literatur häufig beschriebenen NiCSR. Die Ethyl- und *t*-Butylester waren leider nicht erhältlich und konnten daher nicht untersucht werden.

Tabelle 2 zeigt, dass die CARs für eine Reihe von Substraten aktiv sind, unter anderem Carbonsäuren, dessen Aldehydprodukte als Geruchsstoffe Verwendung finden, nur Vanillinsäure wurde von den untersuchten Substraten nicht umgesetzt.

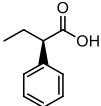
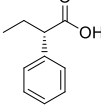
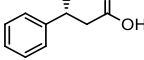
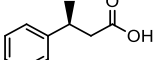
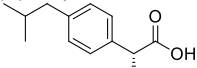
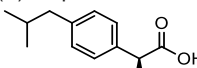
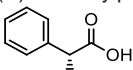
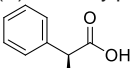

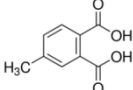
Tabelle 2: Substratspezifität der vier CARs im photometrischen Screening.

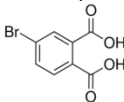
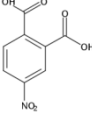

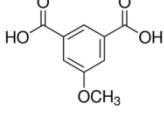
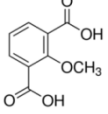
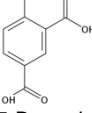
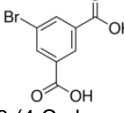
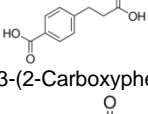
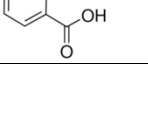
Substrate	NiCAR	RwCAR	KaCAR	AaCAR
	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]	[U/mg]
Odorant precursors				
Pentanoic acid	0,57 ±0.03	1,65 ±0.07	2,36 ±0.23	0,64 ±0.02
Hexanoic acid	0,96 ±0.05	1,91 ±0.22	2,59 ±0.10	1,20 ±0.10
Octanoic acid	0,96 ±0.07	1,24 ±0.06	1,81 ±0.15	1,11 ±0.18
Decanoic acid	0,85 ±0.01	1,40 ±0.11	1,70 ±0.06	1,06 ±0.05
Dodecanoic acid	0,16 ±0.02	0,37 ±0.03	0,28 ±0.01	0,51 ±0.05
Benzoic acid	1,14 ±0.1	1,81 ±0.23	2,01 ±0.20	1,13 ±0.06
<i>p</i> -Toluic acid	1,02 ±0.14	1,90 ±0.27	2,02 ±0.13	1,13 ±0.07
4-Methoxybenzoic acid	0,65 ±0.01	1,35 ±0.11	2,58 ±0.14	0,60 ±0.05
Piperonylic acid	0,48 ±0.03	0,86 ±0.10	1,51 ±0.18	0,48 ±0.06
Cuminic acid	0,69 ±0.001	0,88 ±0.10	1,89 ±0.14	0,94 ±0.06
Vanillic acid	0,00 ±0.000	0,00 ±0.000	0,00 ±0.000	0,00 ±0.000
3-Phenylpropanoic acid	0,90 ±0.04	1,06 ±0.018	1,93 ±0.11	1,01 ±0.02
Cinnamic acid	0,35 ±0.01	1,42 ±0.04	1,78 ±0.14	0,22 ±0.02
Citronellic acid	0,84 ±0.07	0,88 ±0.03	1,59 ±0.04	1,03 ±0.03
Others				
Pyruvate	0,00 ±0.000	0,00 ±0.002	0,00 ±0.001	0,00 ±0.002
Isobutyric acid	0,02 ±0.003	0,69 ±0.07	0,28 ±0.03	0,02 ±0.003
2-Hydroxy-2-methylbutanoic acid	0,02 ±0.003	0,01 ±0.002	0,02 ±0.002	0,02 ±0.002
Phenylacetic acid	0,34 ±0.01	0,08 ±0.001	0,20 ±0.02	0,37 ±0.03
3-Phenylpropionic acid	0,88 ±0.09	1,51 ±0.098	2,63 ±0.13	1,04 ±0.09
Phenylglyoxylic acid	0,05 ±0.004	0,22 ±0.03	0,17 ±0.03	0,17 ±0.02
4-Chlorophenylacetic acid	0,47 ±0.01	0,57 ±0.06	1,22 ±0.05	0,64 ±0.02
4-Chlorophenylsuccinic acid	0,05 ±0.001	1,12 ±0.08	0,60 ±0.03	0,13 ±0.02

Da die Enantio- und Reigioselektivität von CARs noch nicht untersucht ist, wurde ein Panel von chiralen Säuren und aromatischen Disäuren gescreent (Tabelle 3). Hierbei fielen die Aktivitäten generell niedriger aus, und Aktivitäten im 1 U/mg-Bereich wurden nur für einzelne Substrate beobachtet wie beispielsweise durch KaCAR mit (*S*)-3-Phenylbutanoic acid (1,8 U/mg). Bei den Enantiopreferenzen gab es keinen klaren Trend, diese war Enzym- und Substratabhängig. Signifikante Enantioselektivitäten konnten in Einzelfällen beobachtet werden, z.B. zeigte NiCAR und AaCAR eine klare Präferenz für (*R*)-2-phenylbuttersäure, ein Umsatz des (*S*)-Enantiomers wurde nicht detektiert. Für die anderen chiralen Säuren wurden Selektivitäten von 2-7-fach höherer Aktivität für eines der Enantiomere beobachtet. Aktivitäten gegenüber Dicarbonsäuren sind in den meisten Fällen gering. Hervorzuheben wäre hier die Aktivität der KaCAR gegenüber 4-Nitrophthalsäure und 3-(4-Carboxyphenyl)propionsäure. Die Ergebnisse des Substratscreenings sollen demnächst

veröffentlicht werden (Manuskript in Vorbereitung). Als spannend erachten wir die Möglichkeit, regioselektive Carbonsäurereduktion von Disäuren durchzuführen. Die Selektivitäten hierfür könnten z.B. direkt mittels NMR-Analysen untersucht werden, da ein photometrischer Assay hier nicht möglich ist.

Tabelle 3: Spezifische Aktivitäten der NiCAR, RwCAR, KaCAR and AaCAR gegenüber chiralen Säuren und aromatischen Dicarbonsäuren. Stabw: Einfache Standardabweichung der Triplikate.

Substrate	NiCAR		RwCAR		KaCAR		AaCAR	
	[U/mg]	Stabw	[U/mg]	Stabw	[U/mg]	Stabw	[U/mg]	Stabw
Chiral acids								
(R)-2-Phenylbutanoic acid 	0.4527	0.0191	0	0	0.0301	0.0037	0.6123	0.0994
(S)-2-Phenylbutanoic acid 	0	0	0	0	0.0294	0.0082	0.0067	0.0027
(R)-3-Phenylbutanoic acid 	0.4189	0.0199	0.4203	0.0274	1.0453	0.0975	0.5340	0.0264
(S)-3-Phenylbutanoic acid 	0.2098	0.0208	0.6139	0.0525	1.8304	0.0111	0.1985	0.0261
(R)-Ibuprofen 	0.9779	0.1047	0.0604	0.0207	0.2119	0.0074	0.8102	0.0738
(S)-Ibuprofen 	0.1407	0.0121	0	0	0.0534	0.0003	0.1594	0.0162
(R)-2-Phenylpropionic acid 	0.3173	0.0456	0	0	0.0842	0.0262	0.3706	0.0340
(S)-2-Phenylpropionic acid 	0.1210	0.0021	0	0	0.1542	0.0120	0.0959	0.0107
Dicarboxylic acids								
Phthalic acid 	0.0747	0.0087	0	0	0.1066	0.0075	0	0
4-Methylphthalic acid 	0.0818	0.0199	0.0449	0.0139	0.0795	0.0151	0	0

<p>4-Bromophthalic acid</p> 	0	0	0	0	0.0484	0.0212	0	0
<p>4-Nitrophthalic acid</p> 	0	0	0	0	0.6360	0.0716	0	0
<p>Isophthalic acid</p> 	0	0	0	0	0.1441	0.0087	0	0
<p>5-Methoxyisophthalic acid</p> 	0	0	0	0	0	0	0	0
<p>2-Methoxyisophthalic acid</p> 	0	0	0.0598	0.0040	0.2668	0.0377	0	0
<p>4-Hydroxyisophthalic acid</p> 	0	0	0	0	0.0666	0.0163	0	0
<p>5-Bromoisophthalic acid</p> 	0.0282	0.0045	0	0	0.0581	0.0123	0	0
<p>3-(4-Carboxyphenyl)propionic acid</p> 	0.4651	0.0317	0.2227	0.0139	0.8265	0.0762	0.5170	0.0669
<p>3-(2-Carboxyphenyl)propionic acid</p> 	0.0330	0.0121	0	0	0	0	0	0

Die Enantioselektivitäten für das Substrat 4-Chlorphenylsuccinylsäure sind bisher unbekannt. Da sich im Projektverlauf herausstellte, dass der *t*-Butylester dieses Säurealdehyds für die Transaminierung benötigt wird, wurden Experimente mit 4-Chlorphenylsuccinylsäure nicht weiter verfolgt. Hingegen könnte der mittels CAR gewonnene 2-(4-Chlorphenyl)acetaldehyd zum gewünschten *t*-Butylesteraldehyd mittels chemischer Synthese umgesetzt werden (s. Abbildung 6).

Methoden der Extraktion und Detektion des 2-(4-Chlorphenyl)acetaldehyds sowie des korrespondierenden Alkohols in der GC/MS wurden entwickelt. Wünschenswert wäre eine Analytik, bei der sich sowohl Edukte (Säuren), als auch mögliche Produkte (Aldehyde) und

Nebenprodukte (Alkohole) in einer Methode nachweisen lassen, um die Massenbilanz und mögliche Nebenreaktionen quantifizieren zu können. Dies könnte z.B. durch Derivatisierung der Proben mit Methoxyamine und MSTFA + 1 % TMCS erreicht werden. Der Nachweis einer Produktbildung in den Biokatalysen mit ganzen Zellen gelang anfangs nicht: Weder Aldehyd noch Alkohol konnten detektiert werden, obwohl die Säure in den Biokatalysen merklich bzw. quantitativ verbraucht wurde. Inkubation eines Ansatzes mit dem Aldehydprodukt zeigte die Bildung des Alkohols. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Wahl des Extraktionsmittels entscheidend ist: Anfangs wurden die Proben mit Ethylacetat extrahiert. Das Alkohol/Aldehyd Produktgemisch konnte nur dann nachgewiesen werden, wenn Chloroform oder Dichlormethan für die Extraktion verwendet wurde. Vermutlich lagerten sich die relativ geringen Mengen (Substratkonzentrationen 5-10 mM) in die Membranbestandteile der Zellen, und konnten daher nicht mit Ethylacetat extrahiert werden. Durch die Verwendung des in der Literatur beschriebenen *E. coli* RARE Stammes (reduced aromatic aldehyde reduction) konnte die Reduktion zum Alkohol jedoch erfolgreich unterdrückt werden. Parallel hierzu erfolgten Versuche, den chemischen Schritt für die Herstellung des *t*-Butylester-Aldehyds zu optimieren. Leider konnte kein ökonomisch und ökologisch nutzbarer Weg gefunden werden, um das Produkt von einer Vielzahl an entstehenden Nebenprodukten zu reinigen, da eine Säulenchromatographie nicht skalierbar ist.

3.3 „BackUp-Projekt: Aldehyd-Synthese für Transaminase“

(Arbeitspaket Herbrand PharmaChemicals GmbH)

Für eine alternative Synthese des Substrataldehyds wurde der folgende Syntheseweg verwendet. 4-Chlorphenylacetonitril (**1**) und Glyoxylsäure (**2**) wurde in einer basischen Lösung reagiert und danach mit Natriumborohydrid die Doppelbindung reduziert.^[1] Das hergestellte Zwischenprodukt **4** kann danach zur Synthese des gewünschten Substrats **5** oder **7** verwendet werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Ester **7** auf zwei Wegen synthetisiert werden kann.

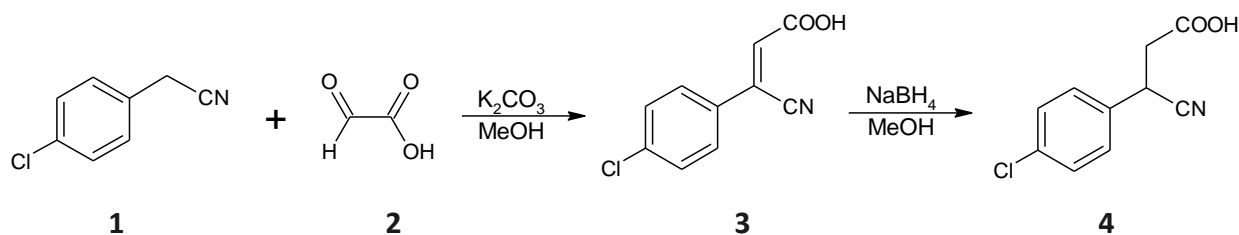


Abbildung 6 Herstellungsweg von Zwischenprodukt **4** für Säurealdehyd **7**

Zunächst wurde die 3-(4-chlorphenyl)-3-oxobutansäure (**5**) durch Transfer-Hydrierung mit Raney-Nickel Katalysator synthetisiert^[2]. Danach wurde die Veresterung mit der Dicyclohexylcarbodiimid Methode^[3] mehrmals versucht aber leider blieben diese Reaktionen erfolglos. Im Gegenteil dazu zeigten Experimente zur Veresterung der Säure **4** gute Ausbeuten. Tert-butylat **6** wurde danach mit Raney-Nickel Katalysator in Pyridin-Eisessig hydriert^[4]. Als Wasserstoff-Donor fungierte hier NaH_2PO_2 . Die Reaktion läuft gut und das gewünschte Produkt **7** wurde gebildet.

¹ WO2017009753A1. An Improved Process for the preparation of Baclofen and its Intermediate.

² The Reduction of Nitriles to Aldehydes: Applications of Raney Nickel/Sodium Hypophosphite Monohydrate, of Raney Nickel/Formic Acid, or of Raney(Ni/Al)Alloy/Formic Acid, Respectively. Staskun, S. Afr. J. Chem., 2008, **61**, 144–156

³ Esterification. Methods, Reactions, and Applications. 2nd Ed. J. Otera and J. Nishikido; Wiley, 2010. ISBN: 978-3-527-32289-3

⁴ A Novel Reduction of Nitriles to Aldehydes. Backeberg and Staskun, J. Chem. Soc. 1962, 0, 3961-63.

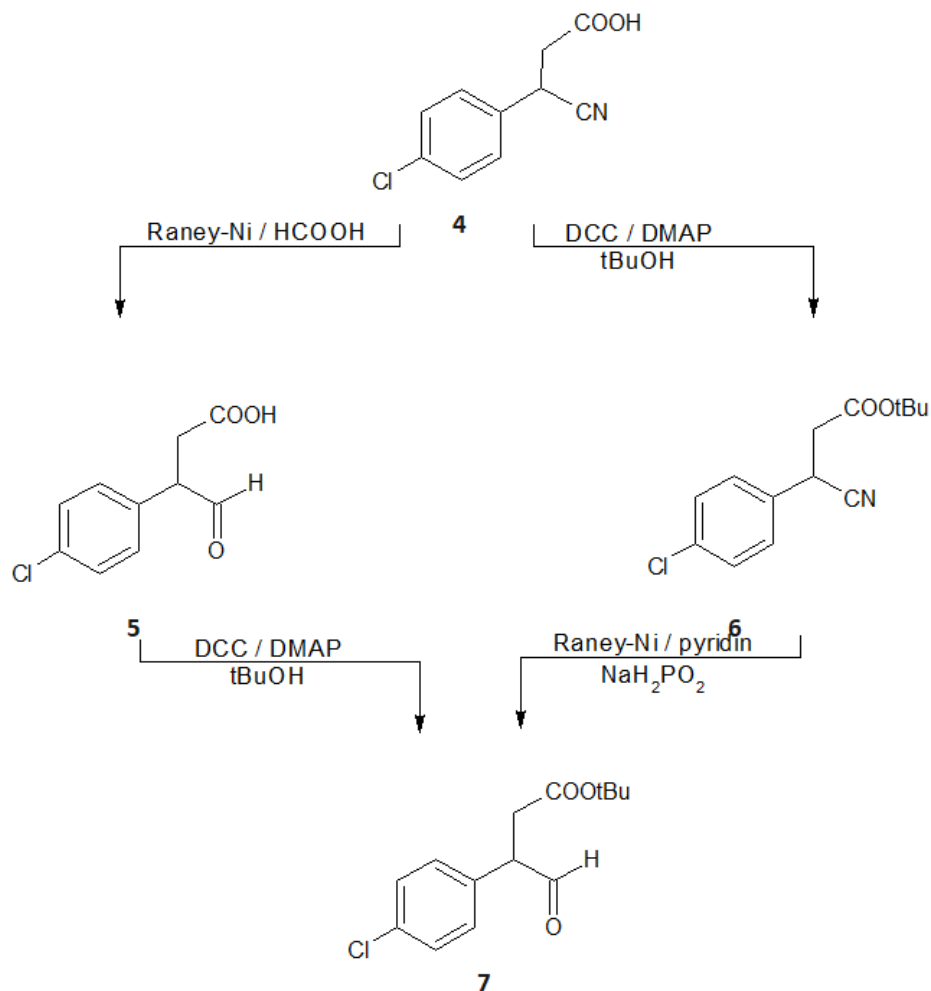


Abbildung 7 Herstellungsweg von Säurealdehyd 7

Herstellung von 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropansäure (4)

80 g 4-Chlorphenylacetonitril und 59 g Glyoxylsäure wurden in 600 mL MeOH in einem 1L-Reaktor gelöst. 168 g wasserfreies K₂CO₃ wurde zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur bei 220 U/min gerührt. Reaktionskontrolle (DC, Laufmittel: DCM/Aceton/AcOH = 90/15/1) nach 3,5 Stunden zeigte Vollumsatz. Das Gemisch wurde mit 900 mL Wasser verdünnt und filtriert. Der Feststoff 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropensäure (3) wurde in 720 mL Methanol suspendiert und bei 60 °C Innentemperatur und 220 U/min gerührt. 27 g NaBH₄ wurde gleichmäßig in Portionen zugegeben. Nach 2 Stunden Reaktionszeit war der gesamte Feststoff gelöst und die Reaktionskontrolle zeigte kein Substrat mehr. Methanol wurde abdestilliert, der Rückstand in 400 mL Toluol gelöst und mit 600 mL Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde danach angesäuert bis pH 1.0-1.5 woraufhin das Produkt 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropensäure ausgefällt wurde. Das Produkt wurde durch Filtration isoliert, und über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Herstellung von 3-(4-chlorphenyl)-3-oxobutansäure (5)

30 g Raney-Nickel (50 %ige wässrige Suspension) wurde eingewogen, einmal mit Wasser gewaschen, und dekantiert. Der restliche Katalysator (ca. 20 g) wurde in 100 mL 90 % Ameisensäure suspendiert. 20 g 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropensäure (4) wurde in 100 mL 90 % Ameisensäure gelöst und zu der Katalysatorsuspension gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionskontrolle (DC, Laufmittel: DCM/Aceton/AcOH = 90/15/1) Vollumsatz anzeigte, wurde das Gemisch auf Celite filtriert und der Filterkuchen einmal mit 50 % Ameisensäure gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit kalter gesättigter NaCl-Lösung verdünnt und 3x mit 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und die Lösung wurde bei einer Wasserbadtemperatur < 25 °C evaporiert. Das Produkt ist ein weißes Pulver, 10,5 g. (DC zeigt ausschließlich das Produkt, entspricht dem Referenzmaterial. HPLC (220 nm): 95%)

Herstellung von tert-butyl 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropanoat (6)

In einem 1-L Reaktor wurden 80 g 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropansäure, 42,55 g tert-Butanol und 2,34 g Dimethylaminopyridin in 650 mL Dichlormethan aufgelöst. Aufgrund der exothermen Reaktion wurde die Manteltemperatur auf 0 °C eingestellt. Die Lösung wurde bis auf 6 °C gekühlt. 79 g Dicyclohexylcarbodiimid wurde gleichmäßig innerhalb einer Stunde dazugeben. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle zeigte fast Vollumsatz (DC, Laufmittel: DCM/Aceton=96/4). Die gebildete Suspension wurde filtriert und der Filterkuchen mit Dichlormethan gewaschen. Die Lösung wurde bei einer Wasserbadtemperatur < 25 °C evaporiert. Das eingedampfte Rohprodukt wurde in Hexan gelöst und der unlösliche Rückstand wurde filtriert. Nach Evaporation ist das Produkt ein rosafarbenes Öl, 70,0 g.

Herstellung von tert-butyl 3-(4-chlorphenyl)-3-oxobutanoat (7)

120 g Raney-Nickel (50 % wässrige Suspension) wurde eingewogen, einmal mit Wasser gewaschen, und dekantiert. Der restliche Katalysator (ca. 60 g) wurde in 100 mL Lösungsmittelgemisch (Wasser/Eisessig/Pyridin=1/1/2) suspendiert. 60 g tert-butyl 3-(4-chlorphenyl)-3-cyanopropanoat (6) in 500 mL Lösungsmittelgemisch wurde zugegeben. Die Wasserbadtemperatur wurde auf 43 °C eingestellt und 120 g NaH₂PO₂ wurde portionsweise innerhalb von 90 Minuten zugegeben. (Zugabe immer so, dass die Mischung nur moderat schäumt.) Eine Stunde nach beendeter Zugabe sieht man keine Gasentwicklung mehr. Die Reaktionskontrolle zeigte kein Substrat. (DC, Laufmittel: Cyclohexan/Aceton=10/4)

Das Gemisch wurde auf Celite filtriert, die Lösung 3x mit 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit eiskaltem Wasser, zweimal mit gesättigter CuSO₄ Lösung extrahiert und noch einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet. Nach Evaporation bei Raumtemperatur erhält man als Produkt ein grünes Öl, m= 34 g. DC entspricht dem Referenzmaterial.

Zwischenfazit:

Die Suche nach alternativen Synthesestrategien für die bisher nicht erfolgreiche Strategie über die Carbonsäure-Reduktase-Reaktion führte zur Herstellung der Zielverbindungen **5** und **7** im Maßstab von 70 g (5) bzw. 30 g (7) Produkt. Dies stand für weitere Transaminase-Reaktionen zur Verfügung. Trotz intensiver Bemühungen, ökonomische und ökologische Aspekte bei den Synthesen zu berücksichtigen, stellen die entwickelten Synthesen nur Möglichkeiten zur Herstellung der Zielsubstanzen nur im unteren 100 g-Maßstab dar. Die Protokolle sind nicht geeignet für eine Maßstabsvergrößerung, da quantitative Mengen Raney-Nickel gebraucht werden, um das entsprechende Nitril zur Aldehyd-Funktion umzuwandeln. Eine ökonomisch und ökologisch sinnvolle alternative Synthese-Route zu den Substraten der Transaminase-Reaktion konnte nicht gefunden werden. Eine ebenfalls hinzugezogene Firma, die auf die Entwicklung von Syntheserouten spezialisiert ist und auch an der Entwicklung der Referenzverbindungen (siehe Kapitel 3.1) beteiligt war, konnte keine wirtschaftlich durchführbare Syntheseentwicklung in Aussicht stellen.

3.4 Teilprojekt „Transaminase“

(Arbeitspaket Universität Greifswald)

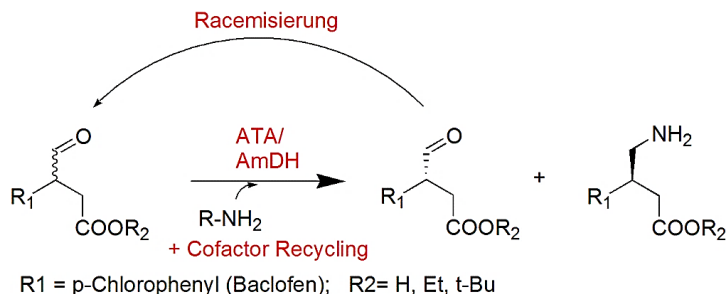


Abbildung 8: Verfolgte Route zur Darstellung von β -chiralen Aminen, z.B. Baclofen, aus einem Aldehyd-Precursor mit Hilfe einer Amintransaminase oder einer Amindehydrogenase.

Ziel dieses Teilprojekts ist die Synthese von Baclofen ausgehend von einem Aldehyd mittels einer Amintransaminase (ATA) oder Amindehydrogenase. Für eine effiziente Synthese werden benötigt:

- 1) Ein Enzym mit hoher Aktivität und Enantioselektivität für das (*R*)-Enantiomer
- 2) *In situ* Racemisierung des Aldehyds unter den Reaktionsbedingungen.
- 3) Verschiebung des Gleichgewichts durch eine Enzymkaskade, z.B. durch enzymatisches Entfernen des Coprodukts und Cofaktorrecycling.

3.4.1 Analytik und Enzymscreening

In einem ersten Schritt wurden instrumentelle Analytikmethoden für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit entwickelt. Die hierfür untersuchten Methoden sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Eine Antrennung des *t*-Butyl-geschützten Substrataldehyds gelang nach einem Screening vorhandener HPLC Säulen mit der Chirasil-Dex CB (Agilent). Eine Basislinientrennung konnte nicht erhalten werden, jedoch wurde die Trennleistung als ausreichend erachtet, um einzuschätzen, ob ein racemisches Gemisch vorliegt (Abbildung 9). Die Methode eignete sich außerdem zur quantitativen Bestimmung des Substratverbrauchs.

Tabelle 4: Zusammenfassung der untersuchten Methoden zur chiralen Analytik von Baclofen

Methode		Ergebnis
GC	Derivatisierung mit Ethylchloroformiat (4 chirale Säulen, variierte Temperaturprogramme)	Schwache Antrennung
CE	HS-CD als chirale Selektoren	Gute Trennung, Methode unzuverlässig für hohen Durchsatz
HPLC	Ohne Derivatisierung (3 chirale Säulen, <i>reversed phase</i>)	Keine Trennung
	Vorsäulen-Ligandenaustausch und achirale Säule	Schwache Antrennung, nicht quantitativ
	OPA-Derivatisierung	Unvollständige Derivatisierung mit instabilen Derivaten, keine gute Trennung
	Dansylchlorid-Derivatisierung	Stabile Derivate und sehr gute Trennung, Überlagerung mit Reaktionskomponenten
	Chirex 3126 ohne Derivatisierung	Gute Trennung, quantitativ, auch bei hohem Durchsatz zuverlässig

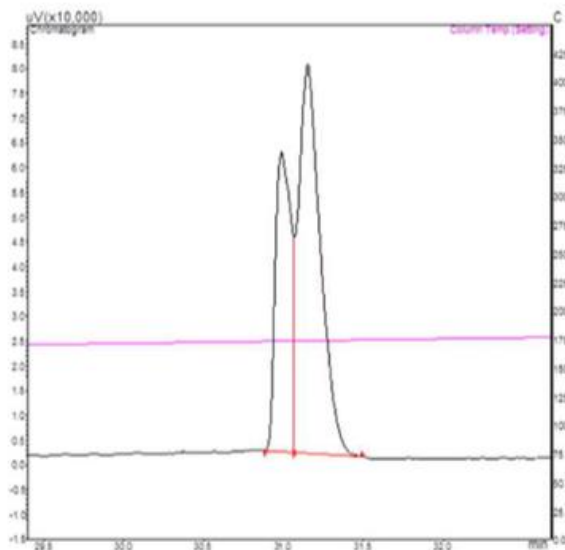


Abbildung 9: Antrennung der Enantiomeren des t-Butyl-geschützten Aldehydsubstrats.

Untersucht wurden ca. 120 Transaminasen: Die Expression für die ersten Screening-Experimente wurden im 1 mL-Maßstab durchgeführt, wonach die Enzyme mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt wurden. Im

Screening aufgefundene, vielversprechende Enzym-Varianten (Tabelle 5) wurden in größerem Maßstab (400 mL) exprimiert und automatisiert mit Hilfe eines Äkta-Purifiers gereinigt. Im Screening wurden auch vier Amindehydrogenasen von Prof. Bommarius untersucht, nachdem deren Expression optimiert wurde.

Tabelle 5: Charakterisierung der aus dem photometrischen bzw. DC-Screening erhaltenen ATA-Varianten bezüglich Umsatz (Produktbildung) und Enantiomerenüberschuss für die Modellsubstrate:

Enzym	Säure		Ethylester		t-Butylester	
	Umsatz [%]	%ee	Umsatz [%]	%ee	Umsatz [%]	%ee
Cvi WT	19,5	70,4 (S)	-	-	-	-
Cvi 88V	27,7	77,3 (R)	8,2	64,2 (R)	-	-
Cvi 88L	28,1	73,1 (R)	6,6	69,3 (R)	7,9	11,1 (S)
Cvi 88L 418L	18,5	91 (R)	5,6	86,3 (R)	5,1	34,1 (S)
Cvi 88L 418G	21,8	66,3 (R)	11,1	1,1 (R)	13,7	58,4 (S)
3HMU WT	26,3	42,7 (S)	-	-	-	-
3HMU 91 A	34,9	20,4 (S)	-	-	-	-
3HMU 233S	36,6	60,7 (R)	-	-	-	-
3HMU 419M	24,7	83,8 (S)	-	-	-	-
3FCR 59W 231A	-	-	8,1	72,6 (R)	-	-
3FCR 59W 87F	-	-	5,9	55,3 (R)	-	-
152F 231A						
3FCR 59W 87L	-	-	4,7	58,9 (R)	48,5	99 (R)
231A 382M 429A						
Vfl 56V 57C 153A	62,5	97,6 (R)	35,3	64,6 (R)	21,4	85,3 (R)
415F 417A*						
Vfl 56V 57C 85V*	9,3	99 (R)	18,5	93,6 (R)	24,3	75,6 (R)
ATA 10*	55,5	99 (R)	-	-	-	-

Die mit * gekennzeichneten Varianten wurden im Zellextrakt eingesetzt, alle anderen wurden zuvor mittels Äkta gereinigt.

Bis zur Bereitstellung der Aldehyd-Substrate wurden die Transaminasen in Richtung der Desaminierung gescreent mittels Dünnschichtchromatographie. Sobald die Aldehyd-vorläufer zur Verfügung standen, konnte das Screening in Richtung der gewünschten Aminierungsreaktion erfolgen. Der Acetophenon-Assay identifizierte 15 potenzielle Biokatalysatoren für die drei Baclofen-Aldehydvorläufer (freie Säure, Ethyl- und t-Butylester). Dabei fiel auf, dass die Treffer auf vier ATAs bzw. deren Varianten begrenzt waren: Die Enzyme aus *Chromobacterium violaceum* (Cvi), *Silicibacter pomeroyi* (3HMU), *Ruegeria* sp. TM1040 (3FCR) und *Vibrio fluvialis* (Vfl), die alle für α -chirale Amine als (S)-selektiv annotiert sind. Zur

Untersuchung der Enantiopräferenz und des Umsatzes der Aminierungsreaktion wurden die Treffer im 400 mL-Maßstab exprimiert, mittels Äkta gereinigt und in Biokatalysen im 700 µL-Maßstab eingesetzt. Dabei wurden als Substrate 250 mM L-Alanin und 20 mM des jeweiligen Aldehyds bei pH 8 verwendet.

Unter den Varianten der Cvi konnten zwar Umsätze für alle drei der eingesetzten Substrate gefunden werden, diese waren jedoch vergleichsweise gering und es wurde teilweise das unerwünschte (*S*)-Enantiomer im Überschuss gebildet, weshalb keine weiteren Arbeiten mit dieser Amintransaminase durchgeführt wurden. Die ATA 3HMU setzt ausschließlich die freie Säure um und bildet hierbei bevorzugt (*S*)-Baclofen. Hervorzuheben ist die Variante 3HMU A233S, welche die gewünschte Enantiopräferenz für das (*R*)-Enantiomer aufwies und daher für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen wurde.

Bis auf eine Fünffach-Mutante (3FCR 59W 87L 231A 382M 429A; im Folgenden 3FCR_5M), zeigten auch die 3FCR-Varianten nicht die erhofften Eigenschaften. 3FCR_5M hingegen wies einen zufriedenstellenden Umsatz und einen hervorragenden Enantiomerenüberschuss für die Bildung des *tert*-Butylester-Derivats auf. Da dieser Ester insbesondere in Hinblick auf die Produktaufarbeitung aus einer wässrigen Reaktion durch Extraktion mit organischem Lösungsmittel interessant ist, wurde dieses Enzym für weitere Experimente gegenüber allen anderen bevorzugt. Die drei Vfl-Mutanten wurden später als die übrigen Enzyme zur Verfügung gestellt, sodass nicht weiter mit ihnen gearbeitet wurde. Zwei von ihnen zeigten jedoch vielversprechende Ergebnisse, insbesondere für die Synthese der freien Säure.

Untersuchungen zur biokatalytischen Herstellung der freien Säure wurden ausschließlich mit 3HMU A233S durchgeführt. Nur Alanin als Aminodonor führte zur Produktbildung, allerdings bildete sich das gewünschte (*R*)-Enantiomer von Baclofen nicht mit ausreichender Spezifität oder die gewählten Bedingungen ermöglichten keine Racemisierung des Substrats.

3.4.2 Racemisierungsstudien

Da die ATA 3FCR_5M aus dem initialen Screening als vielversprechendste Variante hervorging, wurden im Nachfolgenden die Untersuchungen zur Racemisierung und den geeigneten Reaktionsbedingungen für die Herstellung von Baclofen auf diese Variante mit dem Aminoakzeptor 3-(4-Chlorophenyl)-4-amino-buttersäure-*tert*-butylester begrenzt.

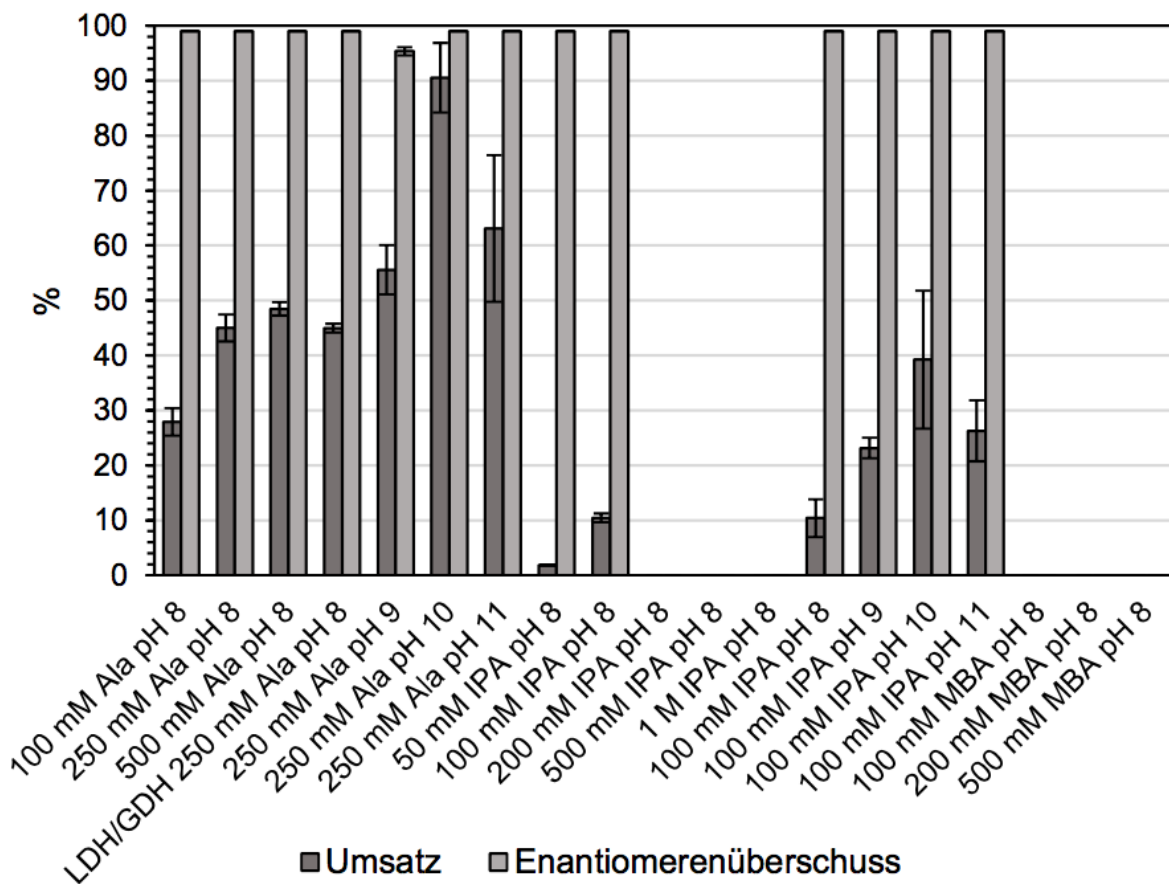


Abbildung 10: Umsatz und Enantiomerenüberschuss (*R*) von Biokatalysen, die bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 8: 50 mM HEPES-Puffer, pH 9,10 und 11 100 mM CHES-Puffer) und Aminodonor-Konzentrationen (Ala = L-Alanin, IPA = Isopropylamin, MBA = (S)- α -Methylbenzylamin) durchgeführt wurden. Die Reaktionszeit betrug 20 h und es wurden 20 mM Aminoakzeptor eingesetzt.

Initiale Experimente wurden mit gereinigtem Enzym (IMAC) durchgeführt, und der pH-Wert sowie der Aminodonor variiert bzw ein System zur Gleichgewichtsverschiebung über Lactatdehydrogenase und Glucosedehydrogenase (LDH/GDH) getestet. Mit α -Methylbenzylamin (MBA) konnte bei keiner der eingesetzten Konzentrationen Produkt detektiert werden. Mit IPA wurden nur sehr geringe Umsätze von 2%-10% detektiert, welche sich jedoch bei pH 10 auf ca. 40% steigern ließen. Der Einsatz verschiedener L-Alanin-Konzentrationen zeigte, dass bereits mit 250 mM ein Umsatz von 45% erzielt werden kann (20 mM Aldehyds substrat). Ein Einsatz des LDH/GDH-Systems konnte den Umsatz nicht verbessern. Allerdings wurde bei pH 10 ein Umsatz von 90,5% erzielt und ein Enantiomerenüberschuss von 99% festgestellt. Generell ist zu beachten, dass bei dem Einsatz eines racemischen Substrats hohe Enantiomerenüberschüsse bei Umsätzen unter 50% nicht bemerkenswert sind, wenn das Enzym eines der Substrat-Enantiomere spezifisch oder auch nur bevorzugt

umsetzt. Allerdings schlussfolgern wir aus der Kombination des hohen Umsatzes und hohen Enantiomerenüberschusses bei pH 10, dass die gewünschte Racemisierung durch die Erhöhung des pH-Werts stattfindet.

Da hohe Umsätze ohne zusätzliche Enzymkaskaden erzielt werden konnten, konnte das Arbeitspaket 1-5: „Klonierung der Kaskade in ein Ganzellsystem und Test des Ganzellsystems“ übersprungen werden

3.4.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen und Upscaling

Da die untersuchte Reaktion langfristig als industrieller Prozess etabliert werden sollte, wurde untersucht, ob die Variante 3FCR_5M auch im Zellextrakt zur Synthese von Baclofen eingesetzt werden kann. Dabei wurde festgestellt, dass der hohe Umsatz nicht direkt reproduziert werden konnte. Dies war zu erwarten, da die Probe im Laufe der Reinigung im Vergleich zum Enzym im Zellextrakt konzentriert wird. Dies spiegelte sich auch in der photometrisch bestimmten Aktivität wieder. Allerdings wurde über mehrere Wiederholungen reproduzierbar ein deutlich geringerer Enantiomerenüberschuss unter den für gereinigtes Enzym als optimal bestimmten Bedingungen festgestellt. Für einen direkten Vergleich wurde das Zellpellet einer Kultivierung aufgeteilt und 3FCR_5M aus derselben Charge einmal mittels Äkta gereinigt und als Zellextrakt vorbereitet. Zusätzlich wurden Reaktionen mit angesetzt, die sowohl gereinigtes Enzym als auch Zellextrakt in den Verhältnissen 2:1 und 1:2 enthielten. Die Enzymaktivität (Acetophenonassay) wurde in allen Ansätzen auf denselben Wert normiert, und alle Reaktionen zeigten daher einen vergleichbaren Umsatz von ca. 62%, wodurch die Enantiomerenüberschüsse ebenfalls direkt miteinander verglichen werden können: Wie erwartet, betrug der Enantiomerenüberschuss mit dem gereinigten Enzym 99 %ee (*R*). Mit dem Zellextrakt konnten wie in den zuvor damit durchgeführten Experimenten jedoch nur 74 %ee (*R*) erreicht werden. Auffällig war des Weiteren, dass in den gemischten Proben der Enantiomerenüberschuss sukzessiv mit der Erhöhung des Anteils des Zellextrakts abnahm (Abb. 11).

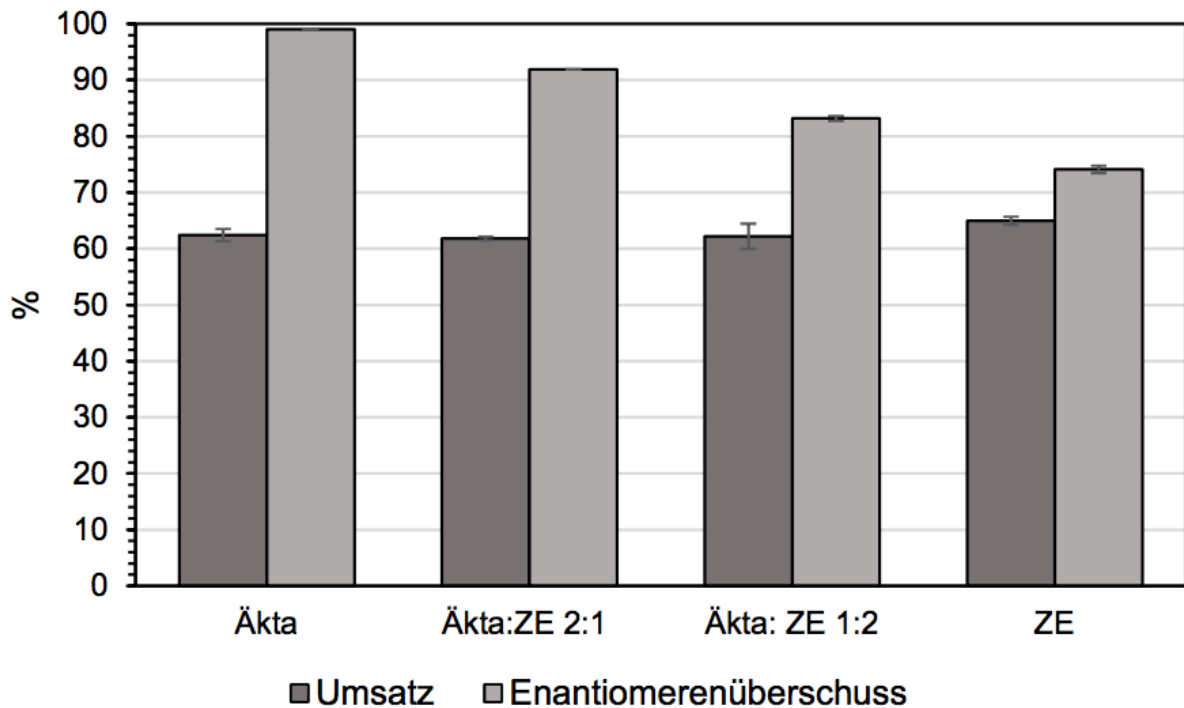


Abbildung 11: Umsatz und Enantiomerenüberschuss (*R*) von Biokatalysen, die gereinigtem Enzym (Äkta) und Zellextrakt (ZE) und beiden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt durchgeführt wurden. Die Reaktionszeit betrug 20 h und es wurden 20 mM Substrat eingesetzt.

Eine engmaschige Beprobung der Reaktion zeigte, dass (i) der ee des Produkts vor allem zum Ende hin abnimmt, und (ii) das Substrat komplett verbraucht war, obwohl nur ein Umsatz von 70% bezogen auf das gebildete Produkt erreicht wurde. Bei gereinigtem Enzym ist eine äquivalente Restmenge des Substrataldehyds jedoch vorhanden. Dies sprach dafür, dass im Zellextrakt möglicherweise Nebenreaktionen auftraten, die einerseits das Substrat verbrauchten, andererseits auch in Zusammenhang mit dem niedrigen Produkt-Enantiomerenüberschuss stehen. Im Folgenden sind Experimente zusammengefasst, um mögliche Ursachen beider Phänomene zu untersuchen:

Fragestellung	Experiment	Ergebnis
Chemische Instabilität des Aldehyd-Substrats?	Inkubation unter Biokatalyse-Bedingungen, aber ohne Enzym/Zellextrakt	Aldehyd ist stabil

Abbau des Aldehyds durch Komponenten des Zellextrakts?	Inkubation von Zellextrakt (E. coli mit „Leer“-Vektor ohne Transaminasegen)	Aldehyd wird abgebaut
Endogene Transaminase im Zellextrakt bildet Produkt mit (S)-Präferenz?	Inkubation von Zellextrakt (E. coli mit „Leer“-Vektor ohne Transaminasegen)	Kein Produkt gebildet
Racemisierung des Produktamins durch Komponenten des Zellextrakts?	Inkubation von t-Butyl-Baclofen mit Komponenten des Zellextrakts	Keine Racemisierung
Niedermolekulare Verbindungen stört / katalysiert Racemisierung?	Aminierung des Aldehyds mit dialysiertem Zellextrakt	Keine Verbesserung des Enantiomerenüberschuss

Eine Erklärung für den niedrigeren Enantiomerenüberschuss konnte bisher nicht gefunden werden, außer dass eine makromolekulare Komponente eine Ursache dafür zu sein scheint. Eine Racemisierung des Produkts durch den Zellextrakt konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Da die Enantioselektivität durchaus andere Faktoren beeinflusst werden kann, wurden die Temperaturen (15-37 °C) und Zusatz von Co-Solvenzien (10-50 % (v/v) DMSO) untersucht. Als optimale Bedingungen stellten sich eine Temperatur von 20 °C und 30 % DMSO heraus.

Für eine industrielle Anwendung ist gereinigtes Enzym nicht wirtschaftlich. Eine Alternative stellt jedoch die relativ kostengünstige Ammoniumsulfatfällung dar, mit der die Transaminase angereinigt werden konnte mit dem Ziel, störende Komponenten zu entfernen. Voruntersuchungen zeigten, dass eine fraktionierende Fällung zw. 40-60% Ammoniumsulfat-Sättigung am effektivsten war, wobei ungefähr die Hälfte der eingesetzten Transaminasemenge am Ende isoliert werden konnte (Abb. 11).

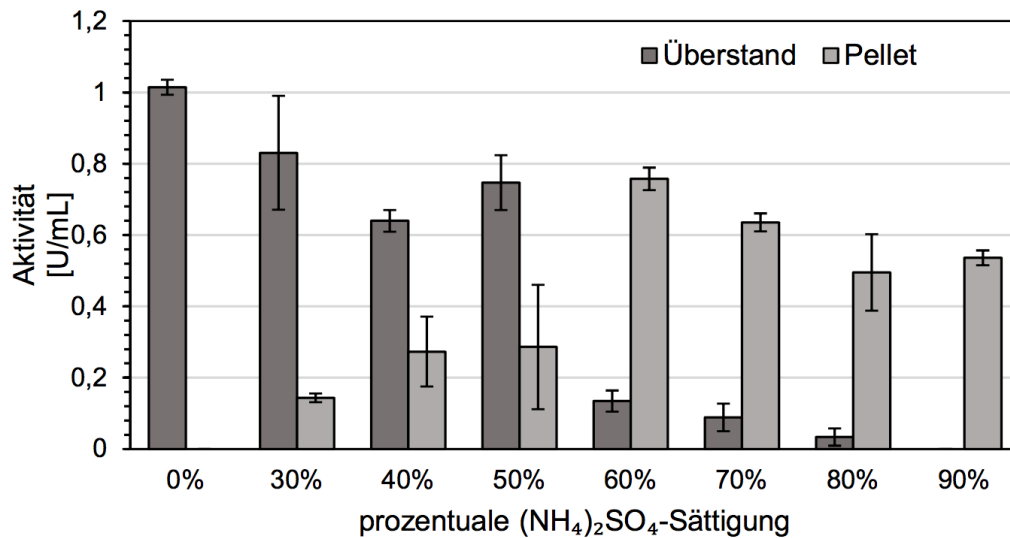


Abbildung 12: Volumetrische Aktivität der Überstände und Pellets nach einer Fällung von 1 mL Zellextrakt bei unterschiedlichen Ammoniumsulfat Konzentrationen.

In der Tat wurden in den anschließend durchgeführten Reaktionen mit dem gefällten Enzym annähernd die gleichen Umsätze und Enantiomerenüberschüsse wie mit der mittels Äkta gereinigten Probe erzielt (Abb. 13) wodurch sich die Ammoniumsulfat-Präzipitation als günstige Reinigungsalternative qualifizierte.

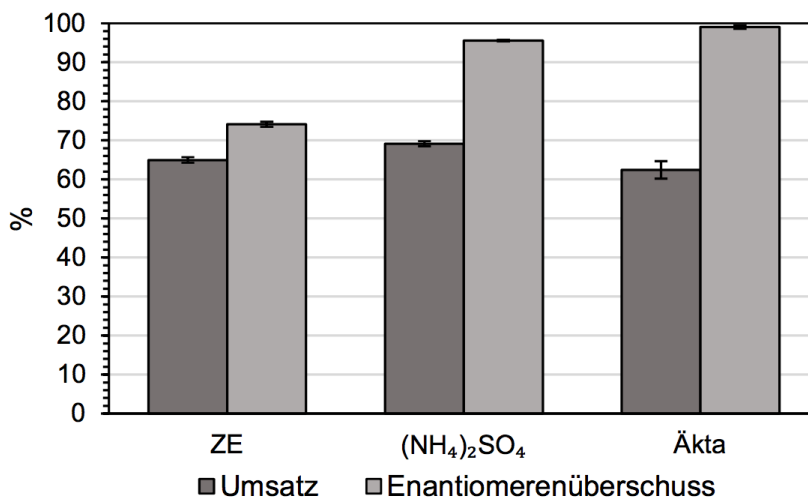


Abbildung 13: Umsatz und Enantiomerenüberschuss (*R*) von Biokatalysen, die mit Zellextrakt (ZE), Ammoniumsulfat-präzipitiertem Enzym ((NH₄)₂SO₄) und IMAC-gereinigtem Enzym (Äkta) durchgeführt wurden. Die Reaktionszeit betrug 20 h und es wurden 20 mM Substrat eingesetzt.

Der Erfolg der Reaktion mit gereinigtem Enzym ließ vermuten, dass die Störungen im Zellextrakt durch enzymatische Nebenreaktionen verursacht worden sein könnten. Daher wurde auch ein Experiment zur Expression von 3FCR_5M in *E. coli* K12 MG1655 RARE (reduced aromatic aldehyde reduction) durchgeführt. Dieser Stamm wurde so konstruiert, dass sechs

Gene, welche für Aldo-Ketoreduktasen und Alkoholdehydrogenasen codieren, deletiert wurden. Dadurch konnten erfolgreich Nebenreaktion bei der biokatalytischen Synthese von Aldehyden unterdrückt werden. Allerdings konnten bei der hier untersuchten Reaktion keine Unterschiede zur Reaktion mit Zellextrakt von *E. coli* BL21 festgestellt werden, sodass die Ammoniumsulfat-Präzipitation weiterhin die beste Alternative zur Reinigung mittels IMAC darstellte.

Für die industrielle Synthese wurde des Weiteren untersucht, ob eine Erhöhung der Substratkonzentrationen möglich ist. Eine Verdopplung der Aldehydkonzentration führte zwar zu einer höheren absoluten Produktkonzentration, jedoch waren die prozentualen Umsätze geringer (Abb. 14). Auch der Enantiomerenüberschuss sank mit steigenden Substratkonzentrationen. Anscheinend ist die pH-induzierte Racemisierung des Substrats durch dessen Konzentration limitiert.

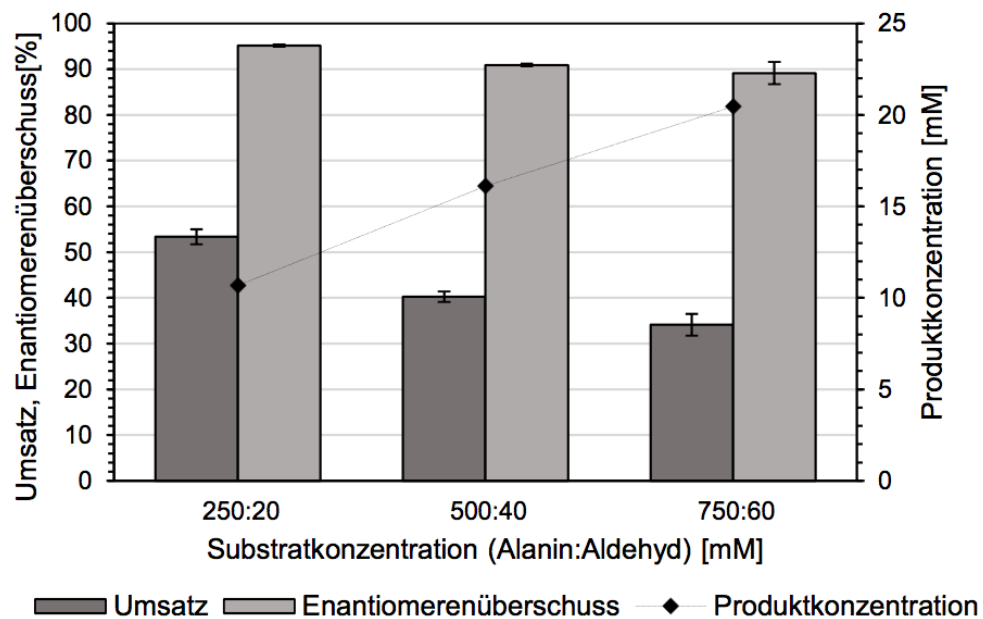


Abbildung 14: Umsatz, Enantiomerenüberschuss (*R*) und absolute Produktkonzentration von Biokatalysen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Als Biokatalysator wurde Ammoniumsulfat-präzipitierte 3FCR_5M eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob niedrigere Umsätze, die im Projektverlauf des Öfteren aufgrund expressionsbedingt schwankender Aktivitäten der Enzympräparationen festgestellt wurden, der Gleichgewichtslage oder der Stabilität des Enzyms geschuldet waren und wie sie behoben werden könnten. Dazu wurden jeweils Biokatalysen mit den drei bisher verwendeten Präparationen (IMAC-gereinigt, Ammoniumsulfat-präzipitiert und Zellextrakt) angefertigt, bei denen zum Vergleich die Standard-Bedingungen, Reaktionen mit doppelter

Enzymkonzentration und Reaktionen, bei der die Enzymkonzentration erst nach 2 h verdoppelt wurde, durchgeführt wurden. Interessant dabei war, dass im Vergleich der Standardbedingung mit der direkt verdoppelten Enzymmenge kein Unterschied in der Produktbildung festgestellt werden konnte, was möglicherweise durch die geringe Stabilität des Enzyms bedingt war. Jedoch konnte durch die versetzte Zugabe von 3FCR_5M der Umsatz mit allen Präparationen entsprechend gesteigert werden (Abb. 15). Dies impliziert, dass die Produktausbeute in einem Prozess durch kontinuierlichen Zusatz des Katalysators die Ausbeute gesteigert werden könnte, wodurch ebenfalls expressionsbedingte Schwankungen der Enzymaktivität ausgeglichen werden könnten.

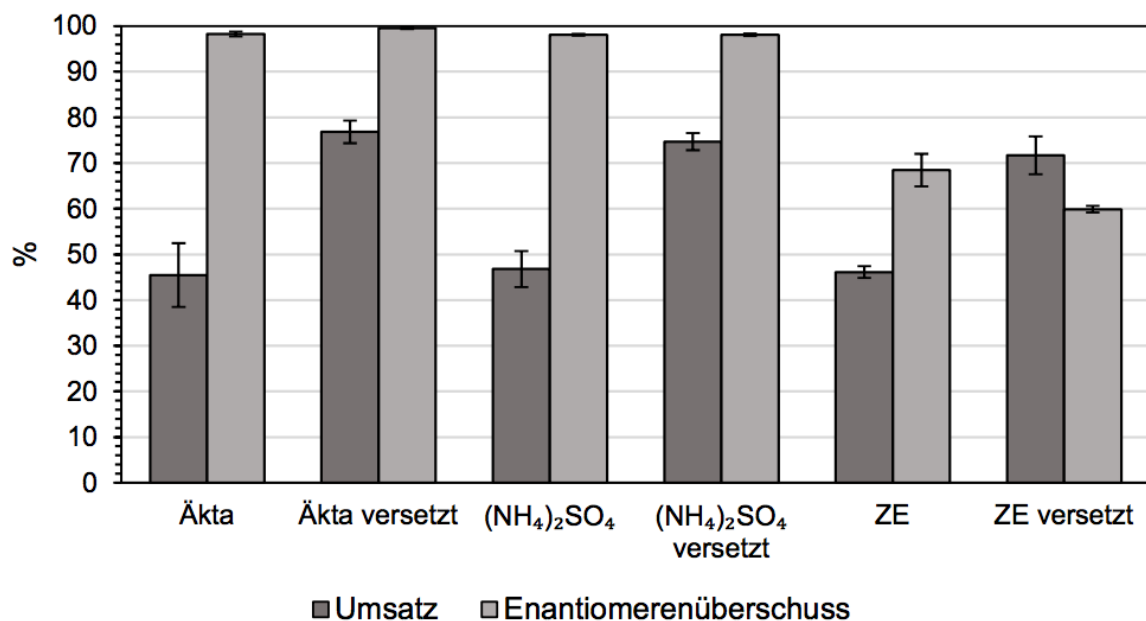


Abbildung 15: Umsatz und Enantiomerenüberschuss (*R*) von Biokatalysen mit unterschiedlich vorbereiteter Enzymlösung. Bei den mit „versetzt“ bezeichneten Proben wurden nach 2 h weitere 200 µL der jeweiligen Enzymlösung hinzugefügt. Die Gesamtreaktionszeit betrug 20 h und es wurden 250 mM L- Alanin und 20 mM Aldehyd eingesetzt.

Damit ein Upscaling der Enzymproduktion durch die Firma Enzymicals untersucht werden konnte, musste die Expression von 400 mL im Schüttelkolben zunächst auf 1 L im Fermenter übertragen und optimiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der Expression der 3FCR_5M bei unterschiedlichen Bedingungen. Die optische Dichte und volumetrische Aktivität wurden 20 h nach der Induktion bei OD₆₀₀~0,8 mit 0,5 mM IPTG bestimmt. Zur Ermittlung der Aktivität wurde ein photometrischer Acetophenon-Assay (s. 6.10.3.1) verwendet:

Expressionsbedingung	OD ₆₀₀	Aktivität [U/L]
Schüttelkolben 20°C	16,8	31
Fermenter 20°C	17,4	20,1
Fermenter 30°C	25,8	162,8

Eine Expression bei konstant 30°C erzielte eine deutlich höhere Aktivität, sodass alle weiteren Experimente zur Expression unter diesen Bedingungen durchgeführt wurden. Als nächstes wurde die optimale Dauer der Expression untersucht. Die volumetrische Aktivität des Zielenzyms nahm nach 6 h deutlich ab. Vorteilhaft wirkte sich eine spätere Induktion bei OD₆₀₀ = 3 aus: Durch diese Optimierungen konnten insgesamt 629 U/L 3FCR_5M nach nur 7 h Expression produziert werden (Abb. 16).

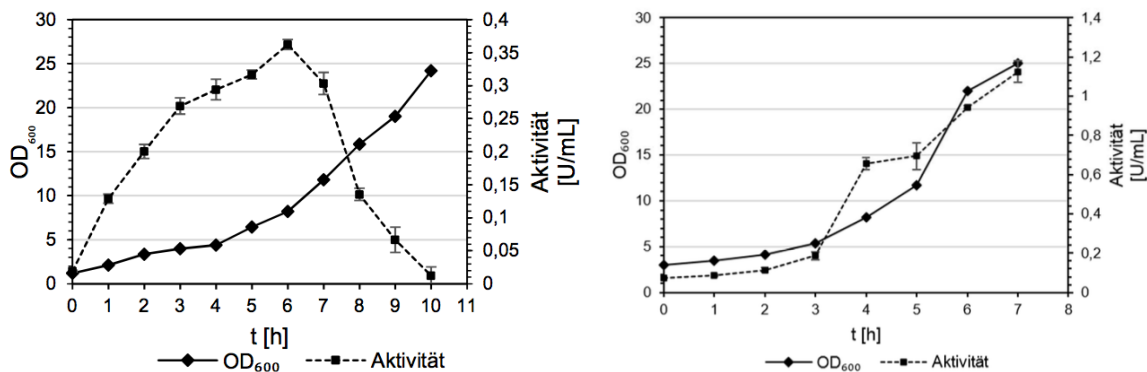


Abbildung 16: Optische Dichte und Aktivität der Verlaufspuren (bestimmt mittels Acetophenon-Assay) bei der Expression der 3FCR_5M im Fermenter. Links: Nach Induktion bei nach Induktion bei OD₆₀₀~0,8 nimmt die maximale Aktivität der Transaminase: nach 6 h nach Induktion deutlich ab. Rechts: Induktion bei nach Induktion bei OD₆₀₀~3 führt zu höheren volumetrischen Aktivitäten. Die Verlaufspuren wurden vor der Aktivitätsbestimmung auf 7/OD₆₀₀ normiert.

Die unter diesen Bedingungen gewonnene Aktivität der 3FCR_5M würde, bezogen auf die besten Reaktionsbedingungen im kleinen Maßstab (700 µL mit Vorreinigung durch Ammoniumsulfat-Präzipitation, 20°C und 30% (v/v) DMSO), theoretisch die Herstellung von ungefähr 2,8 g (R)-Baclofen (>95%ee) ermöglichen.

3.5 Teilprojekt „Enzym-Herstellung“

(Arbeitspaket Herbrand PharmaChemicals GmbH)

Für ein Screening wurden der Universität Greifswald Transaminasen aus dem Enzymicals-ATA Screening Kit bereitgestellt sowie die Carbonsäurereduktase (CAR) und Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase) aus *Nocardia iowensis*. Zudem wurden Methoden und Assays zur Überprüfung der funktionalen Expression der CAR und PPTase an die Universität Greifswald übertragen, um die Expressionsoptimierung dieser Enzyme zu unterstützen.

Die Maßstabsvergrößerung eines geeigneten Expressionsprotokolls für die ausgewählte Transaminase (3FCR-Variante) konnte erfolgreich durchgeführt werden, indem Standardkultivierungsprotokolle für Transaminasen auf die ausgewählte 3FCR-Variante übertragen und an diese angepasst wurden. Dazu ist sowohl die Enzymproduktion im nicht regulierten Erlenmeyerkolben mit der Produktion unter regulierten Bedingungen im Bioreaktor verglichen worden. Die Produktion der ausgewählten Transaminase erfolgte dabei unter Batch und Fed-Batch Bedingungen in einer 1,2L Parallel-Bioreaktoranlage unter Variation der Induktionsbedingungen und Medienzusammensetzung. Da sich eine Kultivierung im Batch-Modus als am geeignetsten für die Herstellung der Transaminase herausstellte, wurde das Protokoll auf die 30L-Anlage, Bioreaktor Sartorius Biostat Cplus, übertragen und die Fermentation der ausgewählten Transaminase wiederholt. Schließlich wurde die ausgewählte Transaminase als Zellpellet bzw. Zellpaste dem Projektpartner bereitgestellt. Die Maßstabsvergrößerung der Produktion der Carbonsäurereduktase im Bioreaktor wurde nach Absprache mit dem Auftraggeber nicht durchgeführt.

Beispielhafte Ergebnisse für eine 30L-Herstellung der 3FCR-Variante im 30L-Batch-Bioreaktor:

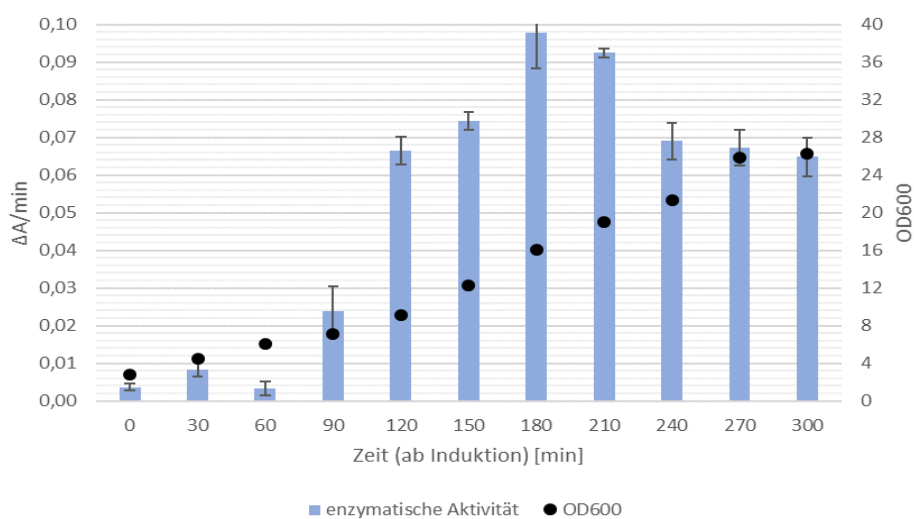


Abbildung 17: Veränderung der volumetrischen Enzymaktivität während der Produktion einer rekombinanten S-ATA in *E.coli* sowie Zunahme der Biomasse, als OD₆₀₀ dargestellt, während der Kultivierung im 30L-Fermenter im Batch-Modus.

3.6 Teilprojekt „UpScaling“

(Arbeitspaket Herbrand PharmaChemicals GmbH)

Da die Carbonsäure-Reduktase-Reaktion nicht in den präparativen Maßstab gebracht werden konnte und trotz intensiver Suche auch keine alternativen Synthesewege zur Herstellung der Transaminase-Substrate (auf chemischen Wege als BackUp-Projekt) zu einem ökonomisch oder ökologisch sinnvoll skalierbaren Prozess führten, konnte das Projekt nicht wie geplant in einen industriellen Prozessmaßstab überführt werden.

Aus diesem Grund wurde der für das Zwischen-UpScaling vorgesehene Unterauftrag (Position 2.2, nach kostenneutraler Verlängerung) von Herbrand PharmaChemicals an den Projektpartner Enzymicals AG nicht ausgelöst. In weiterer Konsequenz konnten auch die wesentlichen Arbeitspakete des Technologie-Transfers und die Arbeiten zum industriellen UpScaling seitens Herbrand PharmaChemicals nicht durchgeführt werden, so dass ein großer Teil der Projektmittel entsprechend dem ursprünglich geplanten Projektfortschritt nicht abgerufen wurde.

3.7 Teilprojekt „Ökoeffizienz-Analyse“

(Arbeitspaket Herbrand PharmaChemicals GmbH)

Im Rahmen des Projektfortschritts zum Zeitpunkt des Zwischenberichts und der kostenneutralen Verlängerung Mitte des Jahres 2017 wurde der Kontakt zur Arbeitsgruppe von Prof. Finkbeiner der TU Berlin bzgl. einer möglichen Ökoeffizienz-Analyse des Baclofen-Prozesses verstärkt. Nach ersten intensiven Treffen und Gesprächen mit Herrn Finkbeiner und Kollegen seiner Arbeitsgruppe, wurde klar, dass der zu dem Zeitpunkt erzielte Projektfortschritt noch keine Ökoeffizienz-Analyse zulässt, da hierfür zunächst die Prozess-Parameter hinreichend bekannt sein müssen. Da die von Herrn Finkbeiner und Kollegen entwickelte Methode optimal für etablierte, feststehende Prozesse ist, wurde eine erste Analyse eines bei Herbrand PharmaChemicals bestehenden Herstellungsprozesses eines pharmazeutischen Produkts durchgeführt. Dabei wurden für beide Seiten wertvolle Erkenntnisse gewonnen, wie Ökoeffizienzanalysen bei der Evaluierung und Verbesserung von pharmazeutischen Prozessen eingesetzt werden können. Interessant hierbei war vor allem, dass in dem abgebildeten Prozess die Transportkette für den Carbon-Fingerprint weniger von Gewicht ist als

beispielsweise der Energieeinsatz bei der Synthese des Wirkstoffs. Iterativ konnte die entwickelte Methode der AG Finkbeiner verbessert und auf die Bedürfnisse angepasst werden. Das Ergebnis kann zukünftig zur Steigerung der ökonomischen und ökologischen Effizienz des bestehenden Prozesses bei Herbrand PharmaChemicals genutzt werden. Die gewonnenen Daten könnten zu einem späteren Zeitpunkt anonymisiert von der AG Finkbeiner veröffentlicht werden.

Analog könnte das hierbei gewonnene Wissen zukünftig auf einen möglichen Baclofen-Prozess angepasst werden, sobald dieser im sinnvollen Maßstab skalierbar und damit simulierbar ist.

4 AUSBLICK

Das Projekt zur biokatalytischen Synthese von Baclofen mittels Carbonsäure-Reduktasen und Transaminasen konnte nur teilweise erfolgreich zu Ende gebracht werden. (*R*)-Baclofen ist prinzipiell herstellbar, allerdings sind beide enzymatische Prozessschritte noch nicht für ein sinnvolles UpScaling optimiert.

Bei dem Teilprojekt der Carbonsäure-Reduktase sind derzeit die geringen Produktkonzentrationen im zweistelligen mM-Bereich sowie die Notwendigkeit zur Etablierung eines sinnvollen ATP-basierten Cofaktor-Regenerierungssystems limitierend für die industrielle Anwendbarkeit. Da auch alternative Synthesewege zu den Transaminase-Substraten nicht gefunden bzw. etabliert werden konnten, scheint der Syntheseweg mittels Carbonsäure-Reduktase derzeit vielversprechend. An dieser wissenschaftlich und industriell sehr spannenden Enzymklasse soll weiter geforscht werden, um die wichtigen Durchbrüche in Bezug auf die ökonomische und ökologische Effizienz zu erzielen.

Im Teilprojekt der Transaminasen wurden zunächst erfolgreiche Enzyme gescreent, die in der Lage sind Baclofen aus dem entsprechenden Säure-Aldehyd herzustellen. Zwar sind auch hier weitere Optimierungen zur Steigerung der Effizienz notwendig, aber der Grundstein für eine Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Baclofen ist gelegt. Im analytischen mL-Maßstab konnte die Synthese von (*R*)-Baclofen mit einem Enantiomerenüberschuss $ee >99\%$ durchgeführt werden. Hinsichtlich der industriellen Anwendbarkeit müsste eine Optimierung der Reaktions- und Prozessparameter durchgeführt werden, um insbesondere die Produktkonzentrationen von den bisherigen geringen mM-Konzentrationen (<20 mM) auf industrielle Ansprüche (>200mM) zu steigern.

Können Lösungen für die beschriebenen Limitierungen im Gesamtprozess gefunden werden, kann ein sinnvolles UpScaling im Liter-Maßstab durchgeführt werden. Eine prozessbegleitende Ökoeffizienz-Analyse kann dann sinnvoll sein, um die Stellgrößen bei der Synthese (z.B. in Bezug auf Energieeinsatz, Prozessführung, -dauer) und in der Materialwirtschaft (z.B. Transportwege) abbilden, identifizieren und optimieren zu können.

5 SOLL/IST-VERGLEICH

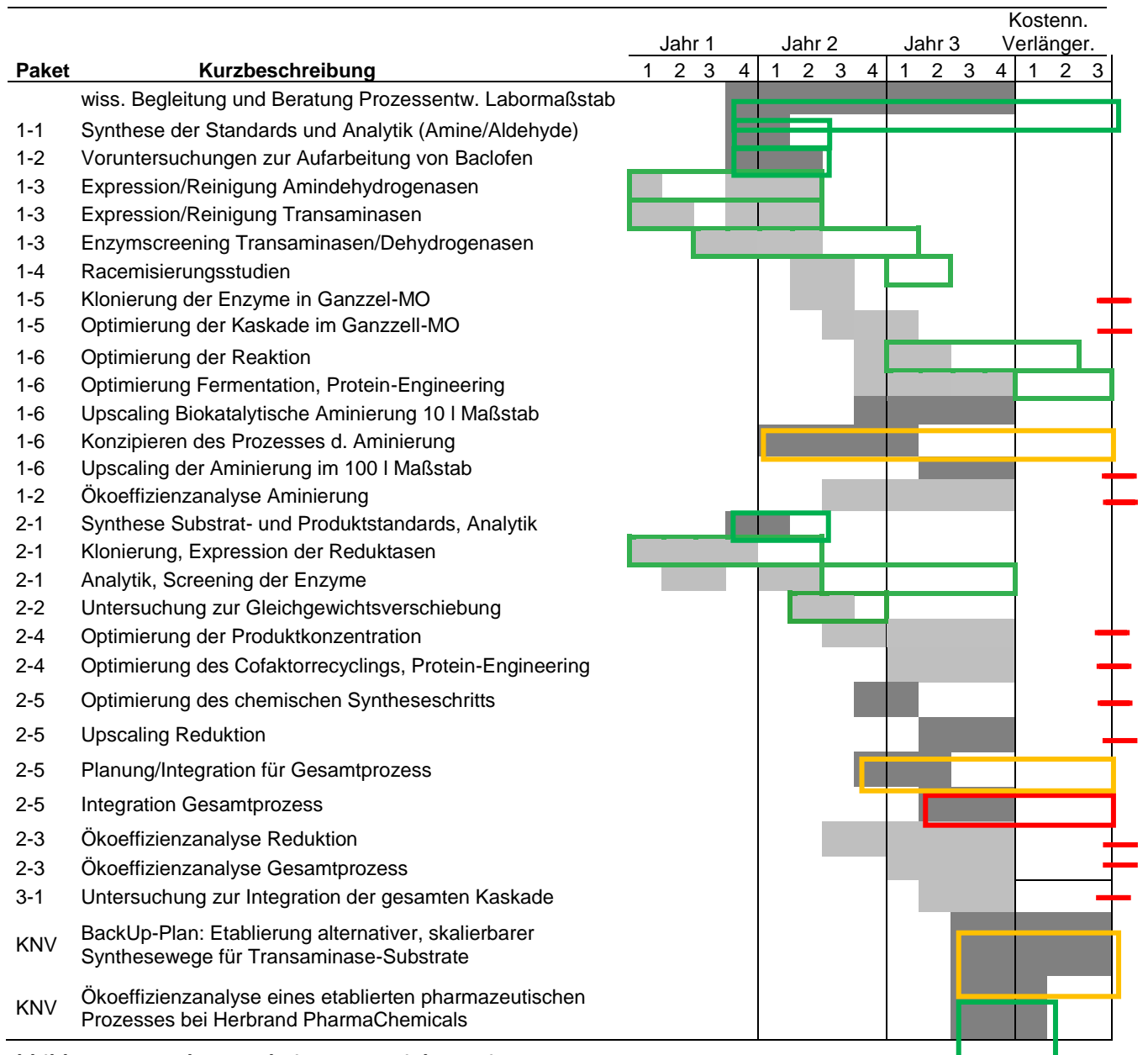


Abbildung 18: geplante Arbeiten zu Projekt-Beginn

hellgrau: Arbeitspakete Uni Greifswald; dunkelgrau: Arbeitspakete Herbrand PharmaChemicals. Grüne Rahmen: Arbeitspakete vollumfänglich abgeschlossen, gelbe Rahmen: Arbeitspakete nur teilweise abgeschlossen; rote Rahmen: Arbeitspakete konnten gar nicht abgeschlossen werden, bzw. konnten nicht begonnen werden (roter Strich)

Der Projektbeginn verzögerte sich bei den Arbeitspaketen der Uni Greifswald, da Frau Miriam Sowa und Herr Christian Thöle erst nach Abschluss ihres Masterstudiums im Dezember 2014 bzw. Januar 2015 eingestellt werden konnten. Um den Fortschritt des Projektes bewerten zu können, wird daher intern der Jahreswechsel 2014/2015 als Projektstart definiert. Aufgrund der durch das Pfizer-Patent bedingten Änderung des Projekts von Pregabalin auf Baclofen kam es zu einer anfänglichen Verzögerung. Da weder die Universität Greifswald noch HerbrandPharma Chemicals die Projektmittel entsprechend dem ursprünglich geplanten Projektfortschritt abrufen konnten, wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projekts um 10 Monate beantragt und bewilligt. Das Projekt endete demnach am 31.07.2018 und umfasste ergänzend zu den ursprünglichen Arbeitspaketen insbesondere die „Etablierung alternativer, skalierbarer Synthesewege für Transaminase-Substrate“.

Uni Greifswald

Im Teilprojekt Carbonsäurereduktion (Arbeitspakete 2-1 bis 2-4) konnten neue Carbonsäurereduktasen kloniert und exprimiert werden. Durch anfänglich große Schwierigkeiten bei der Molekularbiologie kam es bei der Bereitstellung der Enzyme zu deutlichen Verzögerungen. Das Screening der Enzyme konnte abgeschlossen werden und Aktivität u.a. für die Zielverbindungen detektiert werden, wobei es auch bei den Biokatalysen aufgrund von Analytikproblemen zu Verzögerungen kam. Da die Schwierigkeiten im Bereich der chemischen Synthese nicht gelöst werden konnten, wurde jedoch der präparative Einsatz der CARs nicht weiter verfolgt.

Im Teilprojekt Transaminierung (Arbeitspakete 1-3 bis 1-6) konnte trotz der Änderung der Zielsubstanz auf Baclofen innerhalb des Zeitrahmens und der kostenneutralen Verlängerung eine Enzymvariante identifiziert und die Reaktionsbedingungen umfänglich optimiert werden und bilden die Basis für ein Upscaling. Aufgrund von zeitlichen Limitationen und Engpässen bei der Substratverfügbarkeit des Aldehyds wurden Experimente zur Erhöhung der Raum-Zeitausbeute nicht mehr durchgeführt.

Herbrand PharmaChemicals

Die wissenschaftliche Begleitung und Beratung der Prozessentwicklung erfolgte durch die Firma Herbrand PharmaChemicals während der gesamten Projektlaufzeit in enger Zusammen-

arbeit mit allen Projektpartnern. Der Fokus lag dabei insbesondere auf der industriellen Anwendbarkeit unter Berücksichtigung von ökonomischen und ökologischen Faktoren.

Nach der Änderung des Projekts von Pregabalin auf Baclofen lieferte Herbrand PharmaChemicals mit nur kurzer Verzögerung die für den Aufbau der instrumentellen Analytik notwendigen Referenzverbindungen. Diese konnten auch für die ersten Screenings und biokatalytischen Reaktionen von der Universität Greifswald genutzt werden.

Wie im Zwischenbericht und der Beantragung der kostenneutralen Verlängerung kommuniziert, kam es bei dem Teilprojekt Carbonsäure-Reduktasen zu ungeplanten Verzögerungen. Um dem entgegenzuwirken, wurden alternative Synthesewege zur Herstellung der für die Transaminase benötigten Substrate evaluiert und deren Etablierung versucht. Zwar konnte Material im Gramm-Maßstab erzeugt werden, jedoch war die Synthese nicht zum ScaleUp geeignet. Da darüber hinaus auch die Transaminase-Reaktion bis zum Projektende noch nicht so weit optimiert werden konnte, dass ein ScaleUp nach industriellen Maßstäben sinnvoll wäre, kam es bei allen UpScaling-betreffenden Arbeitspaketen zu ungeplanten Verzögerungen bzw. Ausfällen. Aus diesem Grund wurden weder der Unterauftrag zum Zwischen-UpScaling im 10L-Maßstab an die Firma Enzymicals AG ausgelöst, noch hat Herbrand PharmaChemicals die Projektmittel für das ScaleUp in den industriellen Prozess-Maßstab entsprechend dem ursprünglich geplanten Projekt-Fortschritt abgerufen.

Da sowohl für die Carbonsäure-Reduktase als auch für die Transaminase weitere Reaktions- und Prozessoptimierungen durchgeführt werden müssen, ehe skalierbare Prozessparameter feststehen, konnte auch keine sinnvolle Ökoeffizienzanalyse durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde ein bei Herbrand PharmaChemicals bestehender Prozess ausgewählt und dieser in enger Kooperation mit der AG Finkbeiner analysiert. Dies konnte nach dem geänderten Zeitplan der kostenneutralen Verlängerung plangemäß und vollumfänglich abgeschlossen werden. Auf diesen Erkenntnissen kann bei anderen Projekten oder ggf. bei weiterem Fortschritt im Baclofen-Projekt aufgebaut werden. Die gewonnenen Daten können zu einem späteren Zeitpunkt anonymisiert von der AG Finkbeiner veröffentlicht werden.

Insgesamt gesehen konnten wertvolle Erkenntnisse im spannenden Forschungsfeld der Carbonsäure-Reduktase gewonnen werden. Da der Projektfortschritt weder hier noch bei den Transaminasen ein industriell sinnvolles ScaleUp möglich machte und auch kein sinnvoller

alternativer Weg zur Herstellung der Transaminase-Substrate gefunden werden konnte, war es trotz kostenneutraler Verlängerung des Projekts um 10 Monate nicht möglich, eine Maßstabsvergrößerung aus dem Labor- zum Prozess-Maßstab durchzuführen. Zwar kann (R)-Baclofen prinzipiell mit hohen Enantiomerenreinheiten im Transaminase-Schritt hergestellt werden, allerdings müssten weitere Optimierungen erfolgen, um die beschriebenen Hürden zu überwinden. Erst dann könnten ScaleUp und Ökoeffizienz-Analyse sinnvoll durchgeführt werden. Eine kommerzielle Nutzung ist nach dem aktuellen Projektfortschritt ausgeschlossen. Die Projektpartner behalten sich allerdings vor, unabhängig vom Projektrahmen weiter an der (R)-Baclofen-Synthese zu arbeiten.

Für die umfangreiche Förderung des Projektes möchten wir uns bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt sehr herzlich bedanken.