

Chemoenzymatische Synthese von Bausteinen für Statin-Seitenketten

Michael Müller*

Stichwörter:

Enzymkatalyse · Inhibitoren · Naturstoffe · Statine · Steroide

Professor Heinz G. Floss
zum 70. Geburtstag gewidmet

Statine^[1] hemmen das Enzym HMG-CoA-Reduktase (HMG = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl), das die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat katalysiert, einen frühen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese. Diese Hemmung führt zu einem reduzierten Gehalt an LDL-Cholesterin (LDL = low-density lipoprotein). Bei klinischen Untersuchungen in großem Maßstab mit Cholesterolsenkenden Medikamenten der Statin-Klasse wurde festgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen der Reduktion des Gehalts an LDL-Cholesterin und einer Abnahme von koronaren Herzerkrankungen besteht.^[2] Zusätzlich reduzieren Statine den Gehalt an Triglyceriden und erhöhen den Gehalt an HDL-Cholesterin (HDL = high-density lipoprotein).

Der Markt für Cholesterolsenkende Medikamente, der auf mehr als 20 Milliarden US \$ geschätzt wird und damit als einer der größten des pharmazeutischen Sektors gilt, wird durch die Statine dominiert. 2003 verzeichneten Atorvastatin und Simvastatin einen Umsatz von 9.2 Milliarden US \$ (2002: 8.0 Milliarden US \$) bzw. 6.1 Milliarden US \$ (2002: 6.2 Milliarden US \$), was bedeutet, dass diese beiden Pharmazeu-

tika weltweit die zwei umsatzstärksten Medikamente sind. Gegenüber den mikrobiell (partiell synthetisch) hergestellten Wirkstoffen Simvastatin, Pravastatin (2003: 2.8 Milliarden US \$) und Lovastatin (das erste, 1987 vermarktete Statin) gewinnen die synthetischen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Fluvastatin, Atorvastatin^[3] und Rosuvastatin (im August 2003 durch die US-FDA zugelassen)^[4] zunehmend an Bedeutung.^[5] Mit Pitavastatin (NK 104) hat bereits die nächste Substanz die klinische Phase III erreicht.^[2b] Üblicherweise haben alle Statine ein homochirales Seitenketten-Pharmakophor in Form einer 3,5-Dihydroxysäure^[6] sowie einen (hetero-)aromatischen oder cyclischen Rest (Schema 1).

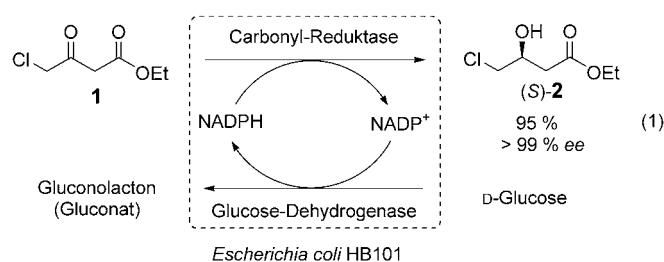
Wegen des außerordentlich hohen Marktanteils und der Forderung nach hoher chemischer und stereochemischer Reinheit (> 99.5 % ee, > 99 % de) wurden von konkurrierenden Forschungsgruppen große Bemühungen in die Produktion synthetischer Statine investiert. Pharmazeutische, chemische und biotechnologische Firmen haben in letzter Zeit chemoenzymatische Strategien für die stereoselektive Synthese der 3,5-Dihydroxysäure-Seitenkette entwickelt, bei denen unterschiedliche Biokatalysatoren eingesetzt wurden (Schema 2). Dabei wurden einige beachtenswerte

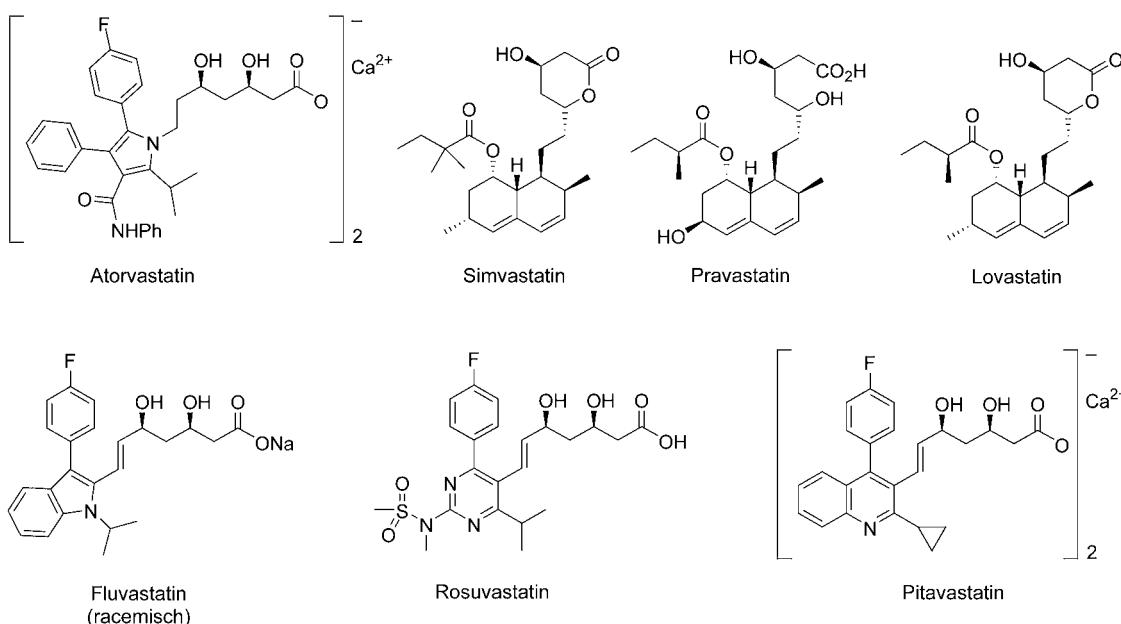
Leistungen bei der Optimierung der biokatalytischen Stufe für die Anwendung im industriellen Maßstab erbracht. Diese Beispiele verdeutlichen, dass zur Synthese eines bestimmten Zielmoleküls viele verschiedenartige enzymatische Umsetzungen anwendbar sind.

Die etablierte Strategie (Schema 2 A) der enantioselektiven Reduktion von 4-Chloracetessigestern wie **1** wurde von Shimizu et al. in Zusammenarbeit mit Kaneka optimiert. Permeabilisierte Zellen eines rekombinanten *E. coli*-Stammes, die sowohl eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH) in Form einer Carbonyl-Reduktase aus *Candida magnoliae* als auch Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* überproduzieren, werden in einem Zweiphasensystem aus organischem Lösungsmittel und wässrigem Puffer zur Produktion von enantiomerenreinem (S)-Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutanoat ((S)-**2**) verwendet. Dabei werden Produktkonzentrationen von 63 g L⁻¹ in der organischen Phase in einer Ausbeute an isoliertem Produkt von 95 % erhalten,^[7] aber auch weit höhere Produktkonzentrationen können erreicht werden.^[7c] Von Nachteil sind hier jedoch die hohe Konzentration des Nebenproduktes Gluconat und die Verwendung von nichtlebenden Zellen. Lebende Organismen, die sowohl den Katalysator als

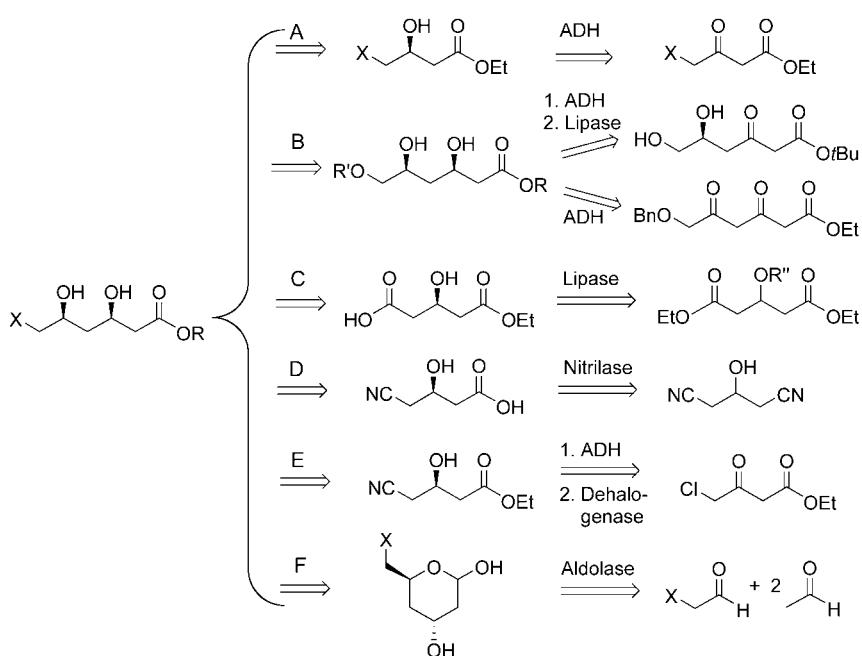
[*] Prof. Dr. M. Müller[†]
Institut für Biotechnologie 2
Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich (Deutschland)
Fax (+49) 2461-613-870
E-mail: mi.mueller@fz-juelich.de

[†] Aktuelle Anschrift: Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Lehrstuhl für Pharmazeutische und
Medizinische Chemie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 25, 79104 Freiburg (Deutschland)





Schema 1. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.



Schema 2. Biokatalytische Transformationen zur Synthese von (3R,5S)-Dihydroxyhexanoaten.
Bn = Benzyl.

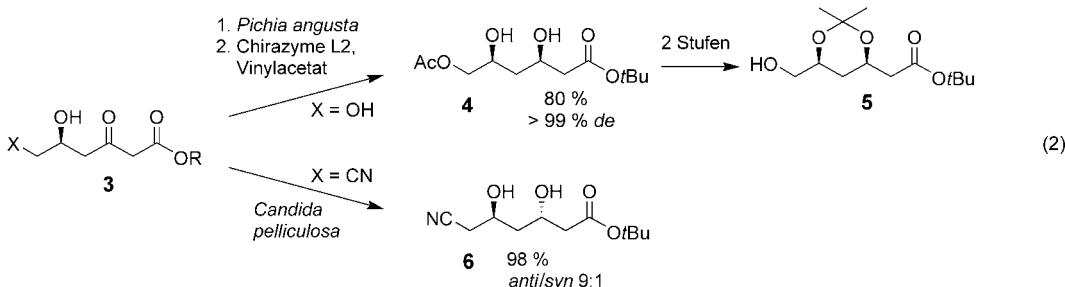
auch das Cofaktor-regenerierende Enzym bilden, könnten eine kontinuierliche Produktion mit hohen Umsatzzahlen für Katalysator und den Cofaktor NAD(P)H ermöglichen.^[8]

Wissenschaftler von Avecia Pharmaceuticals (vormals Zeneca, vormals ICI) haben für die problematische diastereo-selektive Reduktion von 3-Hydroxyke-

tonen (**3**), die aus ökologischen und ökonomischen Gründen ein preislimiterender Faktor im industriellen Maßstab ist, eine biokatalytische Alternative entwickelt. Die Reduktion von (*S*)-**3** ($X = \text{OH}$) mit Zellen von *Pichia angusta* führt zur Bildung des diastereomererenreinen Triols in einer Ausbeute an isoliertem Produkt von 80% (Substratkonzentration 25 g L⁻¹). Immobilisierte Lipase aus *Candida antarctica* (Chirazyme L2) ermöglicht in sehr hoher Ausbeute den Zugang zum regioselektiv acetylierten **4**, das anschließend bei der Synthese des wichtigen Bausteins **5** verwendet wird.^[9] Abhängig vom Stamm und vom Substituenten an C-6 wird entweder das *syn*- oder *anti*-1,3-Diol (zum Beispiel **6**) erhalten.^[9b] Ein ähnlicher Zugang wurde von Wissenschaftlern der Kaneka ausgearbeitet, zum Beispiel unter Verwendung von *Candida magnoliae*.^[10]

Die Gruppe um Patel (Bristol-Myers Squibb) verwendete zur stereoselektiven Direduktion von Ethyl-6-benzyloxy-3,5-dioxohexanoat Zellsuspensionen von *Acinetobacter calcoaceticus* (Schema 2B). Das entsprechende Diol wurde in 85% Ausbeute an isoliertem Produkt mit 97% ee erhalten.^[11]

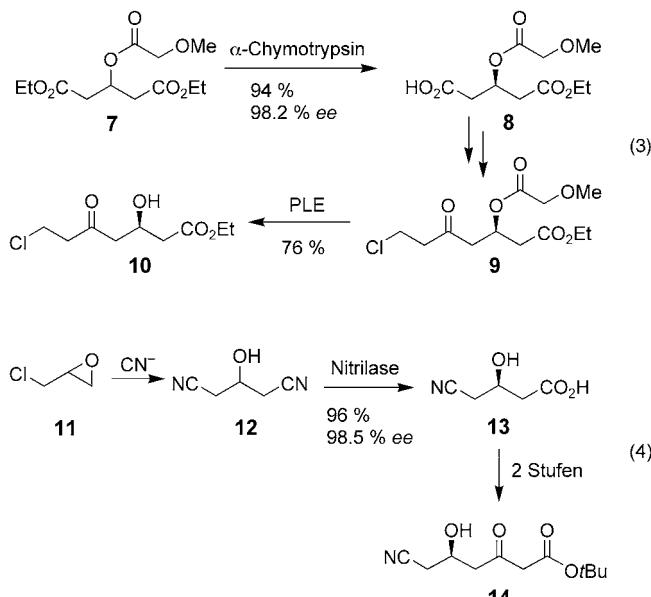
Die bekannte Desymmetrisierung von prochiralen 3-substituierten Glutarsäurediestern durch enzymatische Hydrolyse (Schema 2C)^[12] wurde von Chemikern der Ciba Speciality Chemicals für die Synthese von **8** im Kilogramm-Maßstab optimiert.^[13] α -Chymotrypsin, ein besonders preiswerter und robuster Biokatalysator, wurde bei der selektiven Hydrolyse des Triesters **7** verwendet. Der Prozess ist charakterisiert durch die hohe Substratkonzentration^[14] von 285 g L⁻¹ und eine Ausbeute von 94%



an isoliertem Produkt mit 98.2 % *ee*. Nach Kettenverlängerung wird die Methoxyacetylester-Einheit durch eine Schweineleber-Esterase(PLE)-katalysierte Hydrolyse (**9**→**10**) selektiv gespalten, wobei die Ethylester-Einheit unverändert bleibt.^[13] Wegen der Möglichkeit zur flexiblen Funktionalisierung des monogeschützten Glutarates **8**^[12] eröffnet diese Strategie, genauso wie die folgende, prinzipiell den Zugang zu beiden Enantiomeren von 3-Hydroxy-5-oxohexanoaten und 5-Hydroxy-3-oxohexanoaten.

Burk et al. (Diversa) identifizierten mehr als 200 neue Nitrilasen mithilfe großer Genom-Datenbanken, erstellt durch Extraktion von DNA direkt aus Umweltproben. Vier der identifizierten Enzyme wurden erfolgreich zur Desymmetrisierung des aus Epichlorhydrin (**11**) leicht zugänglichen 3-Hydroxyglutarnitrils (**12**) verwendet (Schema 2 D). Anschließend wurde durch Sättigungs-mutagenese eine hoch enantioselektive Nitrilase generiert. Bei der so optimierten, effizienten enzymatischen Transformation kann mit hohen Konzentrationen gearbeitet werden (die Transformation wurde im Gramm-Maßstab mit einer Substratkonzentration von 3 M durchgeführt). Nach 15 Stunden Reaktionszeit wurde das Produkt (98.5 % *ee*) in 96 % Ausbeute isoliert, was einer Raum-Zeit-Ausbeute an Produkt von 619 g L⁻¹ d⁻¹ entspricht.^[15]

Kasai et al. (Daiso) beschrieben die Dehalogenase-katalysierte Racemattrennung von *rac*-**2**.^[16] Prochirales 1,3-Dichlorpropanol wurde bei der Synthese von (*R*)-4-Chlor-3-hydroxybutannitril ((*R*)-**16**) über (*R*)-Epichlorhydrin ((*R*)-**11**) verwendet. Das Dehalogenase-Enzym katalysiert sowohl die reversible HCl-Abspaltung von 1,3-Dichlorpropanol als auch die Einführung einer Cyangruppe in (*R*)-Epichlorhydrin.^[17] Das Enantiomer (*S*)-**16** kann in zwei Stufen

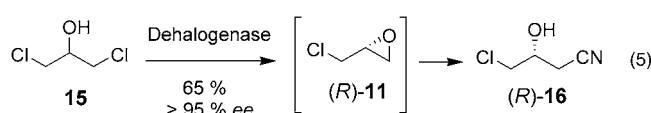


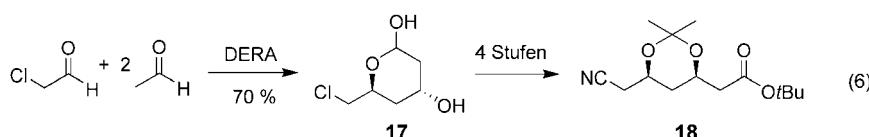
entweder aus racemischem Epichlorhydrin oder aus prochiralem 1,3-Dichlorpropanol synthetisiert werden.^[18]

Vor kurzem wurde durch Wissenschaftler bei Codexis zusammen mit Roger Sheldon die Kombination einer Ketoreduktase- und einer Dehalogenase-katalysierten Eintopfreaktion beschrieben (Schema 2 E).^[19] Dies ist zwar ein interessanter Zugang, allerdings genügen die publizierten Ergebnisse bislang nicht einer Anwendung dieser Zweistufenumsetzung in größerem Maßstab.

Ein auf C-C-Bindungsknüpfung basierender, hochinteressanter Zugang, der auf einer von Wong et al. vorgestellten Umsetzung beruht, wurde von Wissenschaftlern bei DSM ausgearbei-

tet.^[20,21] Die durch 2-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase (DERA) katalysierte Bildung des Pyrans **17** erfolgt über eine asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung ausgehend von den preiswerten Grundstoffen Acetaldehyd und Chloracetaldehyd. Die im ursprünglichen Artikel veröffentlichten Reaktionsbedingungen waren zwar nicht sehr vielversprechend (niedrige Substratkonzentration, hoher Katalysatorbedarf, sieben Tage Reaktionszeit), diese Biotransformation konnte aber jetzt in den industriellen Maßstab übertragen werden.^[20c] Die optimierte enzymatische Umsetzung, die bei niedriger Temperatur (2–4 °C) durchgeführt wird, ist durch eine hohe Endkonzentration des Produktes (> 100 g L⁻¹) gekennzeichnet.^[20a]





Vor kurzem haben Wissenschaftler bei Diversa die bereits am Beispiel der Nitrilasen erwähnte Strategie der Isolierung von DNA aus Umweltproben zur Erstellung von Genom-Datenbanken genutzt, um verbesserte DERA-Enzyme zu identifizieren.^[22] Mehr als 15 DERA-Enzyme wurden dabei entdeckt, von denen eines zur Prozessoptimierung im 100-g-Maßstab verwendet wurde. Burk et al. haben durch Verwendung einer Fed-Batch-Strategie, die wegen Substrathemmung erforderlich ist, eine Endkonzentration von 93 g L^{-1} ($> 99.5\% ee$, $96.6\% de$) an **17** erreicht und konnten zugleich die Enzymmenge auf 2% (wt/wt) reduzieren. Zusätzlich haben Wong et al. kürzlich die durch die DERA-S238D-Mutante katalysierte Umsetzung von 3-Azidopropionaldehyd mit zwei Molekülen Acetaldehyd veröffentlicht.^[21d] Damit ist der Atorvastatin-Seitenketten-Baustein **18** über eine direkte chemoenzymatische Fünfstufen-synthese ausgehend von preiswerten Grundstoffen zugänglich.

Diese Beispiele zeigen, dass moderne enzymatische Umsetzungen ein außerordentlich hohes Niveau erreicht haben, was sie zu wertvollen und konkurrenzfähigen Methoden für die chemische und pharmazeutische Industrie macht. Offensichtlich werden Biokatalysatoren „erwachsen“, was ihre Akzeptanz bei Chemikern angeht. Biokatalytische Strategien ermöglichen innovative Lösungen für Probleme wie gekreuzte Aldoladditionen, die regio- und stereoselektive Reduktion von 1,3-Diketonen, die stereoselektive Bildung von 1,3-Diolen oder problematische Desymmetrisierungen prochiraler Verbindungen. Dies wird auch einen Einfluss auf die Entwicklung und Aufklärung nichtenzymatischer Reaktionen und nicht zuletzt auf die Ausbildung von Studenten der Chemie, Pharmazie und Biologie haben.

Online veröffentlicht am 9. Dezember 2004

- [1] Entsprechend der Anatomisch-therapeutisch-chemischen (ATC)-Klassifikation der WHO wird den Internationalen Freinamen (international nonproprietary names, INN) der so genannten „Statine“ die Endung „-vastatin“ zugeordnet.
- [2] Herz-Kreislauferkrankungen wie Herzinfarkte sind in den westlichen Industrienationen die häufigsten Erkrankungen mit Todesfolge; a) J. A. Tobert, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 517–526; b) H. Stark, *Pharm. Unserer Zeit* **2003**, *32*, 464–470; c) D. Manns, *Pharm. Unserer Zeit* **1999**, *28*, 147–152.
- [3] B. D. Roth, *Prog. Med. Chem.* **2002**, *42*, 1–22.
- [4] a) J. Quirk, M. Thornton, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 769–770; b) C. I. Carswell, G. L. Plosker, B. Jarvis, *Drugs* **2002**, *62*, 2075–2085; c) M. Watanabe, H. Koike, T. Ishiba, T. Okada, S. Seo, K. Hirai, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 437–444.
- [5] Cerivastatin, vermarktet von Bayer, wurde 2001 vom Markt genommen, da Fälle von Rhabdomolyse (starker Muskeltoxizität) auftraten.
- [6] Fluvastatin wird als Racemat vertrieben.
- [7] a) Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1713–1718; b) N. Kizaki, Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 590–595; c) M. Kataoka, L. P. S. Rohani, K. Yamamoto, M. Wada, H. Kawabata, K. Kita, H. Yanase, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 699–703.
- [8] a) M. Ernst, B. Kaup, M. Müller, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, DOI: 10.1007/s00253-004-1765-5; b) T. Endo, S. Kizumi, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 521–526.
- [9] a) A. J. Blacker, R. A. Holt, C. D. Reeve (Avecia Pharmaceuticals), WO 01/85975, **2001**; b) C. D. Reeve (Avecia Pharmaceuticals), WO 97/00968, **1997**.
- [10] N. Kizaki, Y. Yamada, Y. Yasohara, A. Nishiyama, M. Miyazaki, M. Mitsuda, T. Kondo, N. Ueyama, K. Inoue (Kaneka), WO 00/08011, **2000**.
- [11] a) R. N. Patel, A. Banerjee, C. G. McNamee, D. Brzozowski, R. L. Hanson, L. J. Szarka, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014–1021; b) R. N. Patel, C. G. McNamee, A. Banerjee, L. J. Szarka (Squibb & Sons, Inc.), Eur. Pat. Appl. EP 569,998, **1993** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 52826q].
- [12] F.-C. Huang, L. F. H. Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Amigo, C. J. Sih, E. Caspi, C. R. Eck, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 4144–4145.
- [13] R. Öhrlein, G. Baisch, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 713–715.
- [14] Siehe auch S. J. C. Taylor, R. C. Brown, P. A. Keene, I. N. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2163–2168.
- [15] a) G. DeSantis, K. Wong, B. Farwell, K. Chatman, Z. Zhu, G. Tomlinson, H. Huang, X. Tan, L. Bibbs, P. Chen, K. Kretz, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476–11477; b) G. DeSantis, Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024–9025; c) S. J. Maddrell, N. J. Turner, A. Kerridge, A. J. Willetts, J. Crosby, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6001–6004.
- [16] a) N. Kasai, T. Suzuki, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 437–455; b) T. Suzuki, H. Idogaki, N. Kasai, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *24*, 13–20.
- [17] T. Nakamura, T. Nagasawa, F. Yu, I. Watanabe, H. Yamada, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11821–11826.
- [18] E. J. de Vries, D. B. Janssen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 414–420.
- [19] S. C. Davis, J. H. Grate, D. R. Gray, J. M. Gruber, G. W. Huisman, S. K. Ma, L. M. Newman, R. Sheldon, L. A. Wang (Codexis), WO 2004/015132.
- [20] a) J. G. T. Kerkels, D. Mink, S. Panke, F. A. M. Lommen, D. Heemskerk (DSM), WO 03/006656; b) J. M. H. H. Kooistra, H. J. M. Zeegers, D. Mink, J. M. C. A. Mulders (DSM), WO 02/06266; c) M. Wubbolds, *Screening and biocatalyst development for custom manufacturing of fine chemicals*, Biocat, Barcelona, Spanien, **2003**.
- [21] a) H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8422–8423; b) C.-H. Wong, E. Garcia-Junceda, L. Chen, O. Blanco, H. J. M. Gijsen, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3333–3339; c) G. DeSantis, J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 43–52; d) J. Liu, C.-C. Hsu, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2439–2441.
- [22] W. A. Greenberg, A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. Huang, P. Chen, M. J. Burk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5788–5793.