

Enzymatische Synthese

Durch Nutzen der Regioselektivität von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen zu β -Aminosäuren und β -Aminoalkoholen**

Jessica Rehdorf, Marko D. Mihovilovic und Uwe T. Bornscheuer*

Das Interesse an β -Aminosäuren nimmt wegen deren enormer Bedeutung als Bausteine für β -Peptide, Alkaloide, Terpenoide oder β -Lactamantibiotika ständig zu.^[1] Besonders β -Peptide haben aufgrund ihrer erhöhten Stabilität gegenüber proteolytischen Enzymen ein vielversprechendes Potenzial für die Entwicklung von Wirkstoffen, die nicht vom menschlichen Körper abgestoßen oder abgebaut werden. Folglich wurde ein breites Spektrum chemischer Methoden zu ihrer Synthese entwickelt, wobei die asymmetrische Synthese im Vordergrund stand.^[2] Allerdings verlaufen chemische Synthesen oft ohne die Vorteile enantioselektiver enzymatischer Reaktionen. Bislang wurde die kinetische Racematspaltung durch Enzyme, die entweder C-N-Bindungen (z.B. Acylasen,^[3] Amidasen^[4] oder Aminopeptidasen^[5]) oder C-O-Bindungen (z.B. hydrolytische Enzyme wie Lipasen^[6] oder Esterasen^[7]) hydrolysieren, als enzymatischer Weg zu hoch-enantiomerenreinen β -Aminosäuren untersucht. Außer durch Racematspaltung sind optisch reine β -Aminosäuren auch mithilfe von Aminomutasen aus α -Aminosäuren^[8] oder durch reduktive Aminierung von Ketonen mit β -Aminotransferasen^[9] zugänglich. Wir berichten hier über eine neue Möglichkeit, enantiomerenreine β -Aminosäuren unter milden Bedingungen enzymatisch herzustellen, und zwar durch den Einsatz von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen. Hierzu wurden racemische N-geschützte β -Aminoketone in einer kinetischen Racematspaltung in N-geschützte β -Aminosäureester überführt, die in einem zweiten Schritt in die optisch reinen N-geschützten β -Aminosäuren umgesetzt werden können. Als weiteres Produkt können N-geschützte β -Aminoalkohole gebildet werden.

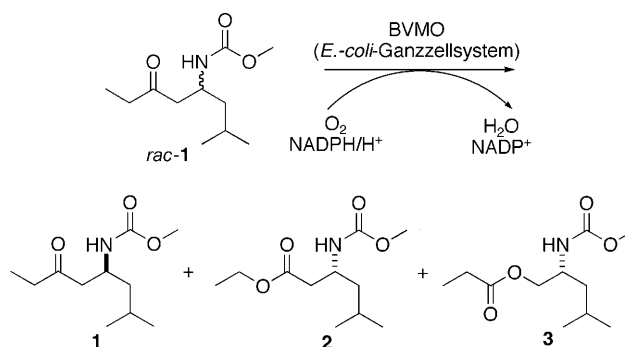
Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMOs, 1.14.13.x) sind Flavoenzyme und gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen. Sie setzen cyclische Ketone zu Lactonen und aromatische, lineare oder Aryl-Alkyl-Ketone zu Estern um, wobei sie molekularen Sauerstoff nutzen, anstelle von Persäuren, die üblicherweise im chemischen Pendant eingesetzt werden.^[10] Neben dem Flavin-Cofaktor benötigen sie NAD(P)H als Reduktionsäquivalent. Die hohe Regio-, Chemo- und Enantioselektivität von enzymvermittelten Baeyer-Villiger-Reaktionen stellt einen wertvollen Vorteil gegenüber der (Metall-)basierten Katalyse dar,^[11] die in chemischen Oxidationen verwendet wird. Bis vor kurzem wurden hauptsächlich cyclische und bicyclische Ketone in Asymmetrisierungen oder kinetischen Racematspaltungen durch BVMOs eingesetzt.^[12] In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass auch lineare aliphatische Ketone wie 4-Hydroxy-2-one und 5-Hydroxy-3-one von BVMOs als Substrate in einer kinetischen Racematspaltung akzeptiert werden.^[13] Über die Umsetzung von Aryl-Alkyl-Verbindungen mit einer Carbonylgruppe in der Seitenkette mithilfe von Arylketone transformierenden Enzymen gibt es bislang nur sehr wenige Berichte.^[14]

Wir haben nun untersucht, ob lineare aliphatische Ketone mit einem Aminosubstituenten in β -Stellung als Substrate von BVMOs akzeptiert werden. Interessanterweise beobachteten wir, dass bestimmte BVMOs den Sauerstoff am sterisch weniger gehinderten Kohlenstoffatom einfügen und folglich der regioisomere Ester **2** gebildet wird, der nach Hydrolyse zur β -Aminosäure führt (Schema 1). Der Einbau des Sauerstoffatoms am höher substituierten Kohlenstoffzentrum führt zur Bildung des „normalen“ Esters **3**, der nach Hydrolyse einen β -Aminoalkohol ergibt. Normalerweise kann die Regiochemie des Sauerstoffeinbaus vorhergesagt

[*] Dr. J. Rehdorf, Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie, Abteilung Biotechnologie & Enzymkatalyse
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-80066
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de
Prof. Dr. M. D. Mihovilovic
Institut für Angewandte Synthesechemie
Technische Universität Wien
Getreidemarkt 9/163-OC, 1060 Wien (Österreich)

[**] Wir danken der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU, AZ 80006/871) für ein Stipendium an J. R. und dem Österreichischen Wissenschaftsfonds FWF (Projekt Nr. 18945) sowie Dr. Qiong Cheng und Dr. Pierre Rouviere (DuPont USA) und Dr. Jan B. van Beilen (früher ETH Zürich, jetzt Universität de Lausanne, Schweiz) für die Bereitstellung rekombinanter Expressionssysteme für die BVMO-Experimente.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000511> zu finden.



Schema 1. BVMO-katalysierte kinetische Racematspaltung des aliphatischen N-geschützten β -Aminoketons **1** in einem *E. coli*-Ganzellsystem. Details zu den verwendeten BVMOs befinden sich im Text und in den Hintergrundinformationen.

werden, da das Kohlenstoffatom, das die positive Ladung am besten stabilisieren kann, bevorzugt wandert.^[15] Standardreaktionsbedingungen hinsichtlich Temperatur, Substratkonzentration, Lösungsmittel und verwendeter Persäure können die Regioselektivität der chemischen Baeyer-Villiger-Oxidation beeinflussen. Neben den elektronischen Einflüssen wirken sich auch sterische Einflüsse am Substrat auf die Energieunterschiede im Übergangszustand aus.^[16] Dennoch ist die chemische Synthese des „abnormalen“ Esters **2** immer noch eine Herausforderung, was den Vorteil der Realisierung einer BVMO-katalysierten Ketonoxidation unterstreicht.

Aus einer Sammlung von 16 BVMOs unterschiedlichen bakteriellen Ursprungs waren vier Enzyme (Cyclododecanon-Monooxygenase aus *Rhodococcus ruber* SC1 (CDMO), Cyclohexanon-Monooxygenasen aus *Arthrobacter* sp. (CHMO_{Arthro}), aus *Brachymonas* sp. (CHMO_{Brachy}) und aus *Xanthobacter* sp. ZL5 (CHMO_{Xantho})) aktiv gegenüber dem 5-Amino-3-on **1** und zeigten hohe Enantioselectivitäten. Vorversuche in 24er-Mikrotiterplatten ergaben, dass alle vier Enzyme den Sauerstoff auf beiden Seiten der Ketonfunktion einfügen können (Tabelle 1) und somit den Zugang zu beiden Baeyer-Villiger-Estern ermöglichen, was bei einer chemischen Oxidation unter Einsatz von Persäuren oder Wasserstoffperoxid unwahrscheinlich ist. Während CHMO_{Arthro}, CHMO_{Brachy} und CHMO_{Xantho} beide Regioisomere **2** und **3** mit hohen Enantiomerenüberschüssen (>99% ee) bildeten, war die Enantioselectivität von CDMO bei **3** eher niedrig (*E* = 10), obwohl sie bei **2** sehr hoch war (*E* > 200). Sehr wichtig ist hier aber, dass CDMO im Unterschied zu den anderen drei Enzymen das (+)-Enantiomer von **1** oxidierte und so das (+)-Enantiomer des „abnormalen“ Esters **2** lieferte. Folglich führte die Biotransformation von *rac*-**1** mit CHMO_{Arthro} oder CDMO zum (–)-**2**- bzw. (+)-**2**-Produkt, die beide mit hoher optischer Reinheit erhalten wurden. Interessanterweise wurden die ungeschützten β-Aminoketone von keiner der BVMOs umgesetzt (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 1: Ergebnisse der kinetischen Racematspaltung von **1** mit verschiedenen BVMOs.^[a]

| Produkt | BVMO | Umsatz [%] ^[b] | ee _p [%] ^[c] | <i>E</i> ^[d] | RA [%] ^[e] |
|----------|------------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 2 | CDMO | 12 | > 99 (+) ^[f] | > 200 | 42 |
| | CHMO _{Arthro} | 24 | > 99 (–) ^[f] | > 200 | 37 |
| | CHMO _{Brachy} | 7 | > 99 (–) ^[f] | > 200 | 66 |
| | CHMO _{Xantho} | 13 | > 99 (–) ^[f] | > 200 | 42 |
| 3 | CDMO | 12 | 81 | 10 | 58 |
| | CHMO _{Arthro} | 24 | > 99 | > 200 | 63 |
| | CHMO _{Brachy} | 7 | > 99 | > 200 | 34 |
| | CHMO _{Xantho} | 13 | > 99 | > 200 | 58 |

[a] Die Reaktionen wurden bei 24 °C in 24er-Mikrotiterplatten mit ganzen *E. coli*-Zellen durchgeführt, die die gewünschte BVMO überexprimieren, nach 24 h gestoppt und durch GC-Analyse an chiraler Phase analysiert. [b] Der Gesamtumsatz des Substrats wurde aus den ee_s- (Enantiomerenüberschuss Substrat) und ee_p-Werten (Enantiomerenüberschuss Produkt) berechnet. [c] Die ee_p-Werte wurden durch GC-Analyse bestimmt und nach Chen et al. berechnet.^[17] [d] Die Enantioselectivitäten wurden durch Anpassung der GC-Daten^[18] aus den ee_s- und ee_p-Werten berechnet. [e] Prozentualer Anteil des Regioisomers **2** bzw. **3** gemäß GC-Daten. [f] Das Vorzeichen der optischen Drehung ist in Klammern angegeben. Weitere Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Die Umwandlung von *rac*-**1** in (+)-**2** mit CDMO als Biokatalysator in Schikane-Kolben (0.35 mmol Substrat) ergab einen konstanten Anstieg der Produktmenge innerhalb von 96 h (Abbildung 1), während Reaktionen in 24er-Mi-

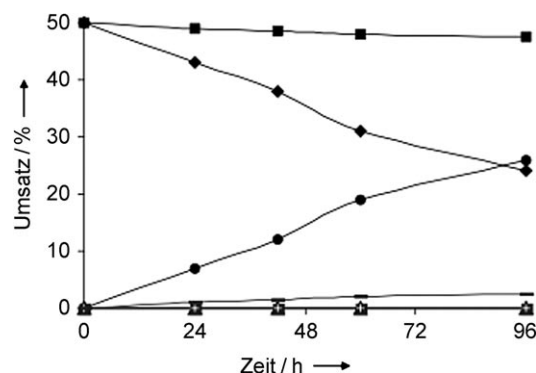
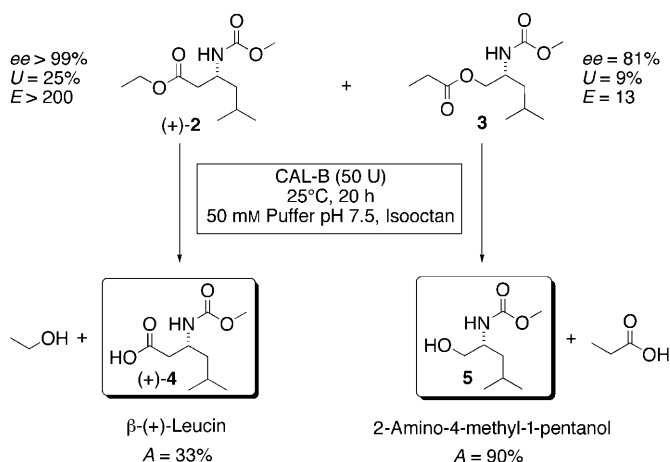


Abbildung 1. Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von *rac*-**1** zu **2** oder **3** bei 24 °C mit ganzen *E. coli*-Zellen, die die CDMO aus *Rhodococcus ruber* SC1 überexprimieren. ■: (–)-**1**, ♦: (+)-**1**, ●: (+)-**2**, ▲: (–)-**2**, +: (+)-**3**, –: (–)-**3**.

krotiterplatten keinen Umsatz über 12% ergaben (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung durch die vergrößerte Oberfläche und bessere Schüttelbedingungen in Kombination mit einer besseren Substratverteilung zurückgeführt. Vorteilhaft für die Synthese der β-Aminosäuren war, dass sich das Verhältnis zwischen „normalem“ und „abnormalem“ Ester von 1:1 in 24er-Mikrotiterplatten zu 1:4 in Schikane-Kolben veränderte. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die CHMO-katalysierte Oxidation von racemischem Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on beschrieben, bei der eine höhere Substratkonzentration zur verstärkten Bildung des „abnormalen“ Esters führte. Dies wurde mit der allosterischen Bindung eines Substratmoleküls und damit einhergehender sterischer Hinderung begründet.^[19] Dieser allosterische Effekt wurde kürzlich in der gerichteten Evolution einer Phenylacetone-Monooxygenase genutzt, um Mutanten zu generieren, die verschiedene 2- und 4-substituierte Cyclohexanoderivate umsetzen können.^[20]

Nach Isolierung und Aufreinigung der Produkte der Baeyer-Villiger-Reaktion aus den Schüttelkolbenexperimenten wurden die Ester mit *Candida-antarctica*-Lipase B (CAL-B) hydrolysiert. Dies ergab N-geschütztes β-Leucin und N-geschütztes 2-Amino-4-methyl-1-pentanol (Schema 2), das prinzipiell weiter zu α-Leucin oxidiert werden kann. Da die Esterhydrolyse ohne Konformationsänderung erfolgt, haben die Produkte die gleiche Konfiguration wie die entsprechenden Ester. Überraschenderweise beobachteten wir 30 h nach Substratzugabe auch eine spontane Autohydrolyse von **3** mit gleichzeitiger Bildung von **5**. Da *E. coli* keine eigenen hydrolytischen Enzyme wie Esterasen oder Lipasen exprimiert, nehmen wir an, dass ein Absinken des pH-Werts durch den Zellmetabolismus die Ursache für die Esterspaltung ist. Allerdings wurde diese Autohydrolyse beim „abnormalen“ Ester nicht beobachtet.



Schema 2. Eine Lipase-katalysierte Hydrolyse der Baeyer-Villiger-Ester führt zur Bildung der N-geschützten β-Aminosäure **4** und des N-geschützten β-Aminoalkohols **5** (*U*: Umsatz; *A*: Ausbeute, bezogen auf den Methylester, der durch Umsetzung der β-Aminosäure mit Methanol und TMS/Diazomethan erhalten wurde).

Durch den Zugang zu wertvollen Synthesebausteinen, die üblicherweise nicht durch eine Baeyer-Villiger-Oxidation erhalten werden, belegen diese Untersuchungen die breite Anwendbarkeit von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen in der Synthesechemie. In der Tat zeigt die kinetische Racematspaltung von β-Aminoketonen, dass der Einbau von Sauerstoff in eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung eine effiziente Methode ist, die zu fünf chemisch unterschiedlichen Produkten führen kann, welche sich zudem in ihrer Konfiguration unterscheiden. In Kombination mit der Regioselektivität von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen können so wertvolle optisch aktive Bausteine für die pharmazeutische Industrie synthetisiert werden. Zusätzlich ist die Bildung des „abnormalen“ Baeyer-Villiger-Esters und somit der Zugang zu β-Aminosäuren von besonderer Bedeutung, da übliche chemische Methoden dies nur schwer ermöglichen. Wir konnten mit vier verschiedenen Enzymen die regioisomeren Baeyer-Villiger-Ester in enantiokomplementärer Form herstellen, was den Zugang zu beiden β-Aminosäure-Antipoden erlaubt. Folglich bietet die enzymatische Baeyer-Villiger-Reaktion einen neuen Zugang zu β-Aminosäuren, der eine vielseitige und nützliche Alternative zu bereits beschriebenen enzymatischen Verfahren ist.^[3–8]

Eingegangen am 28. Januar 2010

Online veröffentlicht am 7. Mai 2010

Stichwörter: Baeyer-Villiger-Monooxygenasen · β-Aminosäuren · Enzymkatalyse · Kinetische Racematspaltung · Regioselektivität

- [1] E. Juaristi, V. A. Soloshonok, *Enantioselective Synthesis of β-Amino Acids*, 2. Aufl., Wiley-VCH, New York, **2005**.

- [2] a) E. Juaristi, H. López-Riuz, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 983–1004; b) S. Abele, D. Seebach, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1–15; c) F. Fülöp, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181–2204; d) M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991–8035; e) G. Lelais, D. Seebach, *Biopolymers* **2004**, *76*, 206–243.
- [3] H. Gröger, H. Trauthwein, S. Buchholz, K. Drauz, C. Sacherer, S. Godfrin, H. Werner, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1977–1978.
- [4] a) V. A. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1601–1610; b) D. Li, S. Cheng, D. Wei, Y. Ren, D. Zhang, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1825–1830.
- [5] T. Heck, D. Seebach, S. Osswald, M. K. J. ter Wiel, H.-P. E. Kohler, B. Geueke, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1558–1561.
- [6] a) S. Gedey, A. Liljebblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105–110; b) S. Gedey, A. Liljebblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. T. Kanerva, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 565–570.
- [7] A. Liljebblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831–5854.
- [8] a) P. A. Frey, O. T. Magnusson, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2129–2148; b) B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildemann, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 338–344; c) W. Szymanski, B. Wu, B. Weiner, S. de Wildemann, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9152–9157.
- [9] A. Banerjee, M. Chase, R. A. Clayton, B. Landis, US-Patent, WO2005005633, **2005**.
- [10] A. Baeyer, V. Villiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625–3633.
- [11] a) G. Strukul, A. Varagnolo, F. Pinna, *J. Mol. Catal. A* **1997**, *117*, 413–423; b) C. Bolm, G. Schlinghoff, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1247–1248.
- [12] a) J. Rehdorf, U. T. Bornscheuer in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioremediation, and Cell Technology*, Vol. 1 (Hrsg.: M. Flickinger), Wiley, New York, **2009** (DOI: 10.1002/9780470054581.eib451); b) M. D. Mihovilovic, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 1265–1287.
- [13] a) J. Rehdorf, A. Lengar, U. T. Bornscheuer, M. D. Mihovilovic, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3739–3743; b) A. Kirschner, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7161–7163; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7004–7006.
- [14] a) C. Rodriguez, G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1338–1344; b) K. Geitner, A. Kirschner, J. Rehdorf, M. Schmidt, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 892–895.
- [15] R. Noyori, T. Sato, H. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2569–2576.
- [16] P. Hamley, A. B. Holmes, D. R. Marshall, J. W. M. MacKinnon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1793–1801.
- [17] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [18] K. Faber, H. Hönig, A. Klewein, Kostenloses Shareware-Programm („Selectivity-1.0“) zur Berechnung der Enantioselektivität. Verfügbar auf der Website der Autoren: <ftp://borgcl85.kfunigraz.ac.at/pub/enantio/>.
- [19] F. Zambianchi, P. Pasta, G. Ottolina, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J. M. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3653–3657.
- [20] S. Wu, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2775–2780.