

Optisch aktive Amine durch Lipase-katalysierte Methoxyacetylierung

Friedhelm Balkenhohl, Klaus Ditrich, Bernhard Hauer und Wolfgang Ladner

Ludwigshafen, BASF Aktiengesellschaft, Hauptlaboratorium

Eingegangen am 07. März 1997

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Ekkehard Winterfeldt zum 65. Geburtstag gewidmet

Optically Active Amines via Lipase-Catalyzed Methoxyacetylation

Abstract. Racemic amines can be efficiently resolved using ethylmethoxyacetate as acylating agent in a lipase-catalyzed reaction. The reaction of 1-phenylethylamine with ethylme-

thoxyacetate in the presence of a lipase from *Burkholderia plantarii* is presented. Excellent yields and selectivity and minimal amount of enzyme characterize this new process.

Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese [1] hat vor allem durch die Möglichkeit, auch in organischen Solventien arbeiten zu können, einen kräftigen Aufschwung erfahren [2]. Gerade Lipasen, die ja von der Natur für den Einsatz an Wasser/Öl-Grenzflächen maßgeschneidert wurden, verfügen über eine außerordentliche Stabilität und Aktivität in unpolaren organischen Lösungsmitteln. Die gute Verfügbarkeit, das breite Substratspektrum bei gleichzeitig hoher Selektivität und die einfache Handhabung dieser robusten Enzyme haben sie zu unverzichtbaren Katalysatoren in der enantioselektiven Synthese gemacht.

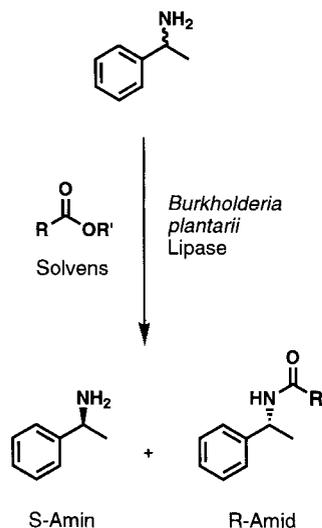
Während die Lipase-katalysierte Acylierung von Alkoholen [3] (z. B. mit Vinylestern [4], Anhydriden [5] oder Diketen [6]) inzwischen eine Standardmethode zur Herstellung enantiomerenreiner Alkohole ist, wurde die Umsetzung von Aminen oder anderer Nucleophile unter Lipasekatalyse bisher weniger intensiv untersucht. Nach Pionierarbeiten von Klibanov [7] haben vor allem Gotor *et al.* in einer Reihe von Arbeiten die Acylierung primärer Amine in Gegenwart von Lipasen studiert [8]. Dabei wurden unterschiedliche Amine, Ester und Lipasen (Schweinepankreas-Lipase, *Candida cylindracea* Lipase, *Pseudomonas cepacia* Lipase) verwendet, wobei sich schließlich Novozym 435, das kommerzielle Immobilisat einer Lipase aus *Candida antarctica*, als das geeigneteste Enzym erwies [9]. Um eine kinetische Racematspaltung chiraler Amine zu erreichen, wurde von Reetz *et al.* Ethylacetat als Acylier-

ungsmittel und Solvens eingesetzt. Auch sie verwendeten Novozym 435 [10] sowie eine als Sol-Gel-Material immobilisierte Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* [11] als Katalysator. Über den Einsatz von Benzylestern als Acylierungsmittel in Gegenwart einer kommerziellen *Pseudomonas cepacia* Lipase wurde kürzlich von Adamczyk *et al.* berichtet [12]. Sheldon *et al.* fanden schließlich vor einiger Zeit, daß unter Lipasekatalyse (wiederum aus *Candida antarctica*) auch Amidierungen mit Ammoniak möglich sind [13].

Im Rahmen unserer Arbeiten zum Einsatz von *Burkholderia plantarii* Lipase (vormals *Pseudomonas plantarii* bzw. *glumae*, DSM 6535) [14] als selektiver Acylierungskatalysator in der organische Synthese waren wir an der Herstellung optisch aktiver Amine interessiert. Homochirale Amine sind wichtige Zwischenprodukte und Hilfsreagentien in der technischen Synthese enantiomerenreiner Pharma- und Pflanzenschutzwirkstoffe. Die Möglichkeiten, sie mit biokatalytischen Methoden zu erzeugen, sind bislang auf die obigen Beispiele sowie einige weitere [15] beschränkt, eine breit einsetzbare und auch wirtschaftliche Methode ist aber nicht verfügbar. Bei den oben beschriebenen Lipase-katalysierten Racematspaltungen ist vor allem die eingesetzte Katalysatormenge, die stets in etwa der Substratmenge entspricht oder sie sogar deutlich überschreitet, für eine Anwendung im größeren Maßstab problematisch.

Wir haben deshalb vor einiger Zeit die enantioselektive Acylierung von *R/S*-1-Phenylethylamin in Gegen-

wart von *Burkholderia plantarii* Lipase untersucht und dabei vor allem den Einfluß des Acylierungsmittels auf die Reaktionsgeschwindigkeit studiert [16].



Schema 1

Dabei wurde ein rohes Enzympräparat, isoliert durch einfache Zellabtrennung am Ende der Fermentation und anschließende Lyophilisierung, mit einer Aktivität von 1000 U/mg (Tributylin) eingesetzt (Enzymgehalt: ca. 30%). Es zeigte sich sehr schnell, daß sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit, als auch die Selektivität der Reaktion dramatisch vom eingesetzten Acylierungsmittel abhängt. Nach einem breiten Screening unterschiedlichster Ester in verschiedenen unpolaren aprotischen Lösungsmitteln fanden wir, daß gerade Methoxyessigsäureester hervorragend geeignet sind, um Phenylethylamin effizient und mit hoher Selektivität in die Antipoden zu spalten. Das Acylierungsmittel wird im allgemeinen in äquimolaren Mengen eingesetzt, als Lösungsmittel haben sich Ether, wie z. B. *tert*-Butylmethylether (MTBE) bewährt.

Abbildung 1 zeigt den direkten Vergleich von Methoxyessigsäureethylester mit Buttersäureethylester, ein in der Verseifung ideales Substrat für diese Lipase. Setzt man 10 Gewichtsprozent des Rohenzym bezogen auf die eingesetzte Menge des racemischen Amins ein, so kann die Reaktion mit Methoxyessigsäureethylester bereits nach 24 Stunden durch einfaches Abfiltrieren des heterogenen Katalysators abgebrochen werden (Umsatz ca. 50%). Mit Buttersäureethylester erreicht man in der gleichen Zeit nur einen Umsatz von 6%. Vergleicht man die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten miteinander, so ergibt sich daraus ein Faktor von mehr als 100. Die Produkte sind leicht durch Destillation oder Extraktion voneinander trennbar. Amin und Amid fallen mit Ausbeuten von jeweils über 45% an, der Enantiomerenüber-

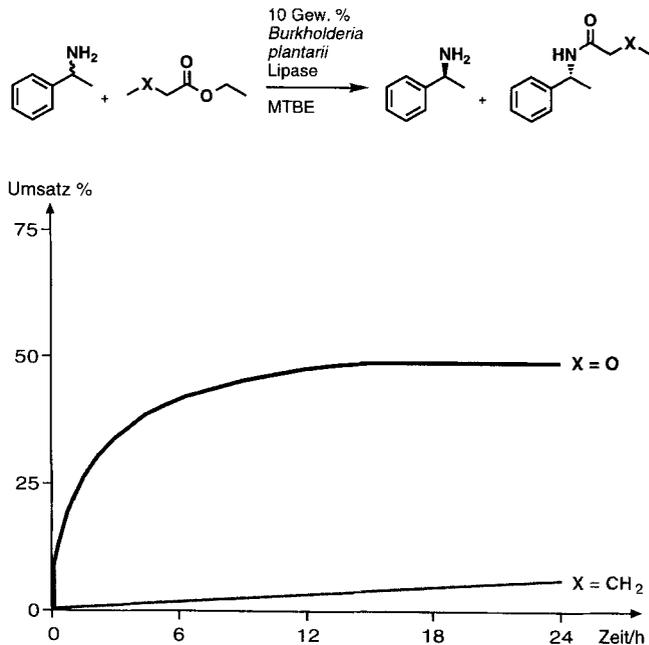
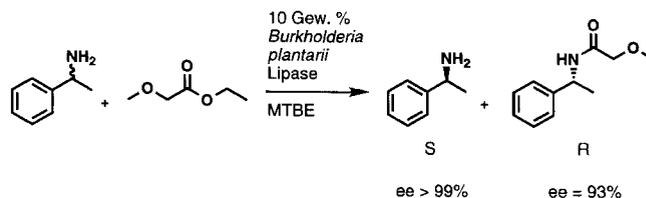


Abb. 1 Vergleich der Kinetiken von Methoxyessigsäureethylester mit Buttersäureethylester in der Lipase-katalysierten Amidierung

schuß beträgt >99% für das zurückbleibende *S*-Amin und 93% für das gebildete *R*-Amid, aus dem durch basische Hydrolyse das *R*-Amin freigesetzt werden kann.



Schema 2

Natürlich kann durch Abbruch der Reaktion bei einem Umsatz von unter 50% auch das Amid mit einer höheren Enantiomerenreinheit gewonnen werden. Als Ursache für den aktivierenden Effekt der Methoxygruppe vermuten wir die erhöhte Carbonyllaktivität, die durch den elektronegativen Substituenten in der α -Position hervorgerufen wird. Auch Chloressigsäureester sind hochaktiv, führen aber zu nichtkatalysierten Nebenreaktionen (Substitution des Chlorids). Trotz der erhöhten Carbonyllaktivität im Falle des Methoxyessigsäureesters findet eine unkatalysierte und damit unspezifische Acylierung unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht statt, was für die Entwicklung eines robusten Verfahrens auf Basis dieser Reaktion von großer Bedeutung ist.

Verwendet man statt des Rohenzym ein durch Extraktion, Ultrafiltration und Chromatographie gereinigtes Enzym (Gehalt über 90%), so ist die Reaktion erstaunlicherweise dramatisch verlangsamt. Durch Auflösen des Enzyms in Wasser, Zusatz oberflächenaktiver Substanzen (bevorzugt Fettsäuren oder ihre Salze) und erneute Entwässerung läßt sich das reine Enzym aber in eine für die Synthese in organischen Solventien hochaktive Form überführen (Aktivierung um den Faktor 1000 und mehr!) [17]. Auch andere hochreine Lipasen aus dem Handel, die in wäßriger Lösung hohe Verseifungsaktivität zeigen, aber um Zehnerpotenzen schlechtere Acylierungsaktivitäten in organischen Solventien aufweisen, können auf diese Art und Weise aktiviert werden. Weiterhin kann die *Burkholderia plantarii* Lipase auch in immobilisierter Form in die oben beschriebene Reaktion eingesetzt werden (z. B. auf Amberlite XAD 7), was ebenfalls mit einer Aktivierung einhergeht und die Rückführung des Katalysators erheblich vereinfacht. Nach zehnfachem Wiedereinsatz eines solchen Präparates fanden wir über 80% der ursprünglichen Aktivität.

Schließlich haben wir noch kommerzielle Lipasen als Katalysatoren für die Methoxyacetylierung von Aminen überprüft (*Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindracea*). In allen Fällen bestätigte sich der aktivierende Effekt der Methoxygruppe. Die Reaktion mit Methoxyessigsäureethylester ist stets erheblich schneller und selektiver als mit anderen Estern. Wir haben die Reaktion inzwischen auch auf viele andere primäre Amine (substituierte Arylalkylamine, Amphetaminderivate, Aminoalkohole und -derivate etc.) übertragen und immer bemerkenswert hohe Selektivitäten bei quantitativen Ausbeuten gefunden. Selbst bei 2-Aminobutan unterscheiden sich die beiden Enantiomere in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit mit Methoxyessigsäureethylester noch immer um den Faktor 8. Wir erwarten, daß sich diese Reaktion aufgrund der einfachen Durchführbarkeit in Standardapparaturen sowie der großen Anwendungsbreite als eine Standardmethode zur Racematspaltung von primären Aminen im Labormaßstab etablieren wird, vergleichbar mit der Lipase-katalysierten Acylierung von Alkoholen mit Vinylestern. Ein technisches Verfahren wird zur Zeit ausgearbeitet.

Wir danken unseren Kollegen Drs. H. Rettenmaier und K. H. Strube für die Bereitstellung der verschiedenen Lipasepräparaten. Weiterhin gilt unser Dank T. Kohl, M. Kiefer und S. Volkmer für die Durchführung der Versuche.

Beschreibung der Versuche

Racematspaltung von 1-Phenylethylamin

20 g (165 mmol) 1-Phenylethylamin und 19.5 g (165 mmol) Methoxyessigsäureethylester werden in 200 ml *tert.*-Butylme-

thylether (MTBE) gelöst. Nach Zusatz von 2 g *Burkholderia plantarii* Lipase (Rohenzym, Aktivität 1000 U/mg, Tributyrin) rührt man die resultierende Suspension bis zum Erreichen des gewünschten Umsatzes, der gaschromatographisch oder durch Drehwertmessung bestimmt wird (24 h, 52%). Anschließend trennt man die Lipase durch Filtration ab und engt die verbleibende Lösung ein. Der Rückstand wird mit 1N Salzsäure aufgenommen und das Amid mit MTBE extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und Einengen im Ölpumpenvakuum liefert 15,5 g (Ausbeute 48%) des *R*-Amids (93% *ee* nach GC): weiße Kristalle; *F.* 63 °C; Drehwert: 86,5° (*c*=5 in Dioxan). – ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ 1.55 (3H, d, 7.0), 3.4 (3H, s), 3.83 und 3.95 (2H, AB-System, 15), 5.2 (1H, quin, 7), 6.80 (1H, brs), 7.1–7.2 (5H, m). Nach Freisetzung des Amins mit Natronlauge (pH = 10) wird auch dieses mit MTBE extrahiert und die resultierende Lösung getrocknet und eingengt. Man erhält 9,2 g (Ausbeute 46%) des *S*-Amins (> 99% *ee*): farblose Flüssigkeit; Drehwert: –39,5° (in Substanz); alle weiteren Daten sind literaturbekannt.

Literatur

- [1] L. Poppe, L. Novák, Selective Biocatalysis, VCH, Weinheim (1992); C.–H. Wong, G. M. Whitesides, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Elsevier, Oxford (1994); K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg (1995); K. Drauz, H. Waldmann (Hrsg.), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis - A Comprehensive Handbook, VCH, Weinheim (1995); S. M. Roberts, N. J. Turner, A. J. Willetts, M. K. Turner, Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms, Cambridge University Press, Cambridge (1995)
- [2] A. L. Gutman, M. Shapira, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **52** (1995) 87
- [3] Übersichten: K. Faber, S. Riva, Synthesis **1992**, 895; E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, Enzyme Microb. Technol. **15** (1993) 367; J.–M. Fang, C.–H. Wong, Synlett **1994**, 393
- [4] M. Dagueil–Castaing, B. de Jeso, S. Drouillard, B. Maillard, Tetrahedron Lett. **28** (1987) 953; Y.–F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.–H. Wong, J. Am. Chem. Soc. **110** (1988) 7200; K. Laumen, D. Breitgoff, M. P. Schneider, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1988**, 1459
- [5] D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, J. Org. Chem. **53** (1988) 5531; A. L. Gutman, D. Brenner, A. Boltanski, Tetrahedron: Asymmetry **4** (1993) 839
- [6] F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Schnell, U. Pressler, H. R. Staudenmaier, DE-A 43 29 293 (31.08. 93); Chem. Abstr. **122** (1995), 212267; G. E. Jeromin, V. Welsch, Tetrahedron Lett. **36** (1995) 6663; K. Suginaka, Y. Hayashi, Y. Yamamoto, Tetrahedron: Asymmetry **7** (1996) 1153
- [7] A. Zaks, A. M. Klivanov, Proc. Natl. Acad. Sci. **82** (1985) 3192; A. M. Klivanov, Acc. Chem. Res. **23** (1990) 114
- [8] V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, Tetrahedron: Asymmetry **8** (1997) 37; S. Puertas, F. Rebolledo, V.

- Gotor, J. *Org. Chem.* **61** (1996) 6024 und dort zit. Lit.
- [9] M. J. García, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **3** (1992) 1519; M. J. García, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993) 2199; V. Gotor, E. Menéndez, Z. Mouloungui, A. Gaset, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2453; M. Quiros, V. M. Sánchez, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993) 1105; S. Puertas, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **49** (1993) 4007
- [10] M. T. Reetz, C. Dreisbach, *Chimia* **48** (1994) 570; kürzlich wurde von diesen Autoren auch über die erste dynamische kinetische Racematspaltung chiraler Amine berichtet: M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **50** (1996) 668
- [11] K.-E. Jaeger, K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46** (1996) 99
- [12] M. Adamczyk, J. Grote, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 7913
- [13] M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1831; M. C. de Zoete, A. C. Kock-van Dalen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biocatalysis* **10** (1994) 307
- [14] R. Braatz, R. Kurth, E. Menkel-Conen, H. Rettenmaier, T. Friedrich, T. Subkowski, WO 9300924 A1 (23.06.92): *Chem. Abstr.* **118** (1993) 175893
- [15] Protease-katalysierte Acylierung: H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 3094; A. L. Gutman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak, J. Sterling, *Biotech. Bioeng.* **49** (1992) 760; S. Takayama, W. J. Moree, C.-H. Wong; *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 6287; Lipase-katalysierte Amidspaltung: H. Smidt, A. Fischer, P. Fischer, R. D. Schmid, *Biotechnology Techniques* **10** (1996) 335; Lipase katalysierte Spaltung von Oxalesteramiden: D. T. Chapman, D. H. G. Crout, M. Mahmoudian, D. I. C. Scopes, P. W. Smith, *J. Chem. Soc., Chem Commun.* **1996**, 2415; Transaminase: D. I. Sterling, in *Chirality in Industry*, Hrsg. A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby, J. Wiley & Sons, Chichester **1992**, 209
- [16] F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler, DE-A 43 32 738 (25.09.93): *Chem. Abstr.* **122** (1995) 289035
- [17] Die so erhaltenen Enzympräparate besitzen Acylierungsaktivitäten, wie sie in der Literatur bislang nicht bekannt sind: F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler, H. Rettenmaier, G. Adam, DE-A 43 44 211 (23.12.93): *Chem. Abstr.* **123** (1995) 137435; ähnliche Resultate wurden kürzlich mit hochreinen, quervernetzten Enzymkristallen (CLECs) beschrieben: N. Khalaf, C. P. Goverdhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y.-F. Wang, A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 5494

Korrespondenzanschrift:
Dr. F. Balkenhohl
BASF Aktiengesellschaft
Hauptlaboratorium
ZHF/G - A30
D-67056 Ludwigshafen