

# **Charakterisierung eines industriellen Biokatalysators : Zur Substratspezifität der Glutaryl-Acylase**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Peter Grundmann  
aus Frankfurt am Main

Berichterstatter:                   Universitätsprofessor Dr. W.-D. Fessner

Mitberichterstatter:               Universitätsprofessor Dr. H. Kolmar

Tag der Einreichung:               20.06.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2006

Darmstadt 2006

Herrn Prof. Dr. W.-D. FESSNER danke ich herzlich für die abwechslungsreiche Themenstellung, für sein Großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für die gewährten wissenschaftlichen Freiräume sowie für seine Diskussionsbereitschaft und die Ermöglichung von Forschungsaufenthalten am *Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare* in Mailand.

#### **Tagungsbeiträge:**

P. GRUNDMANN, W.-D. FESSNER, Poster Presentation, *6<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Olomouc Tschechische Republik, **2003**, P100.

P. GRUNDMANN, W.-D. FESSNER, S. RIVA, Poster Presentation, *Franco-German Symposium : Bioconversions and organic synthesis*, Obernai Frankreich, **2004**, P24.

P. GRUNDMANN, W.-D. FESSNER, Poster Presentation, *2<sup>nd</sup> International Congress on Biocatalysis*, Hamburg, **2004**, P061.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. H. Kolmar für seine Tätigkeit als Mitberichterstatter

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern EDITH GRUNDMANN und WULF GRUNDMANN sowie meiner restlichen Familie für ihre stete Ermutigung und Unterstützung in allen Phasen meines Studiums.

Prof. Dr. S. RIVA und Dr. D. MONTI danke ich für die freundliche Aufnahme am ICRM Milano und die sehr guten Arbeitsbedingungen während meiner Aufenthalte.

Mein Dank gilt weiterhin den Kollegen die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben – insbesondere Dr. J. SCHOOREN und Dr. I. RIEMANN für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, Dr. M. WARWEL für angeregte Diskussionen, Dipl.-Ing. M. ADLER für die kompetente Hilfe bei Computerproblemen jeder Art und Dipl.-Ing. O. LUDWIK für die versierte Unterstützung bei der Überwindung der Kommunikationsbarrieren zwischen Mensch und Maschine.

Ebenso gilt mein Dank auch Frau Dipl.-Ing. N. SARGSYAN sowie STEFAN LANG und MARIA MONTERO, die im Rahmen von Vertiefungspraktika praktisch zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Il mio ringraziamento va a tutti voi del laboratorio Piano Rialzato al ICRM Milano. CRISTINA, ELENA, FRANCESCA, LARA, SARA, ANDREA e MATIA, tutte due volte che abbiamo lavorato insieme per me è stato meraviglio e indimenticabile.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	xiv
I. Einleitung.....	1
I.1. Chemie im Wandel.....	1
I.2. Enzyme – Von einfachen, komplexen Transformationen.....	5
I.3. Glutaryl-Acylase.....	13
II. Zielsetzung.....	18
III. Allgemeiner Teil.....	21
III.1. Aufklärung der Substrattoleranz.....	21
III.1.1. Variation des Acylrestes.....	21
III.1.1.1. Bestimmung eines geeigneten Assay-Systems.....	21
III.1.1.2. Synthese von Amidin.....	22
III.1.1.3. Synthese cyclischer Dicarbonsäureanhydride.....	24
III.1.1.4. Synthese von 3-substituierten Glutarsäuren.....	28
III.1.1.5. Synthese von Stickstoffanaloga der Glutarsäure.....	30
III.1.1.6. Synthese von <i>N</i> -Acyl- <i>p</i> -Nitroaniliden.....	32
III.1.1.7. Zusammenfassende Betrachtung.....	33
III.1.2. Variation der Aminokomponente.....	34
III.1.2.1. Synthese von aromatischen Glutarylmonoamiden.....	34
III.1.2.2. Synthese weiterer aromatischer $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuremonoamide.....	35
III.1.2.3. Synthese terminaler primärer aliphatischer Glutarylmonoamide.....	35
III.1.2.4. Synthese nicht-terminaler primärer aliphatischer Glutarylmonoamide.....	38
III.1.2.5. Synthese sekundärer Glutarylmonoamide.....	44
III.1.2.6. Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-Aminosäurederivaten.....	45
III.1.2.6.1. Synthese von $\beta$ -Aminosäurederivaten.....	45
III.1.2.6.2. Synthese von $\alpha$ -Aminosäurederivaten.....	50
III.1.2.6.3. Synthese von <i>N</i> -Acyl-7-aminocephalosporansäuren.....	56
III.1.2.7. Synthese von Glutarsäuremonoestern.....	57
III.1.2.8. Zusammenfassende Betrachtung.....	63
III.1.3. Qualitative Untersuchung der Substrattoleranz.....	64
III.1.3.1. Substrattoleranz der Glutaryl-Acylase bezüglich der Acylkomponente.....	64
III.1.3.2. Substrattoleranz der Glutaryl-Acylase bezüglich der Aminokomponente.....	67
III.1.3.2.1. Substrattoleranz von GA gegenüber Glutarylmiden.....	67
III.1.3.2.1.1. Aromatische Glutarylamide.....	68
III.1.3.2.1.2. Primäre aliphatische Glutarylamide.....	70
III.1.3.2.1.3. Sekundäre aliphatische Glutarylamide.....	72
III.1.3.2.1.4. <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäurederivate.....	73
III.1.3.2.1.5. <i>N</i> -Glutaryl- $\alpha$ -aminosäurederivate.....	75
III.1.3.2.2. Substrattoleranz der GA gegenüber Glutarsäureestern.....	76
III.1.3.3. Aktivitätsassay der PGA gegenüber <i>N</i> -Phenylacetyl-arylglycinen.....	78
III.1.3.4. Zusammenfassende Betrachtung.....	79
III.2. Bestimmung der Aktivität und Selektivität der Glutaryl-Acylase.....	80
III.2.1. Umsatzbestimmung mittels Titration.....	82
III.2.2. Umsatzbestimmung durch kolorimetrische Methoden.....	82
III.2.2.1. Umsatzbestimmung durch die Freisetzung von <i>p</i> -Nitroanilin.....	83
III.2.2.2. Umsatzbestimmung durch Fluoreszenzmessung.....	86
III.2.2.3. Umsatzbestimmung durch Azokupplung freigesetzter Phenole.....	87
III.2.3. Umsatz- und Selektivitätsbestimmung durch Kernresonanzspektroskopie.....	88
III.2.3.1. Vorgehensweise zur Umsatzbestimmung mittels Kernresonanzspektroskopie.....	90

III.2.3.2.	Bestimmung der Enantioselektivität der GA mittels Kernresonanzspektroskopie	92
III.2.3.2.1.	(-)-Chinin als CSA zur Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen.....	93
III.2.3.2.2.	Derivatisierung zu Diastereomeren mit (-)-Camphansäurechlorid.....	101
III.2.3.3.	Experimentelle Bestimmung von Umsatz und Enantioselektivität.....	104
III.2.4.	Umsatz- und Selektivitätsbestimmung durch chromatographische Methoden.....	105
III.2.4.1.	Vorgehensweise zur Umsatzbestimmung mittels HPLC.....	106
III.2.4.2.	Vorgehensweise zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse mittels HPLC	108
III.2.4.3.	Umsatzbestimmung der Hydrolyse verschiedener <i>N</i> -Acyl- <i>p</i> -nitroanilide.....	109
III.2.4.4.	Umsatz- und Selektivitätsbestimmung der Hydrolyse chiraler Glutarylamide... 111	
III.2.4.4.1.	Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-phenylethylamin.....	112
III.2.4.4.1.1.	pH-Abhängigkeit des Umsatzverlaufs.....	112
III.2.4.4.1.2.	Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0.....	112
III.2.4.4.1.3.	Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	114
III.2.4.4.2.	Untersuchung der Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinmethylester durch GA.....	115
III.2.4.4.3.	Untersuchung der Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester durch die GA.....	117
III.2.4.4.4.	Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinol.....	118
III.2.4.4.4.1.	Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0.....	118
III.2.4.4.4.2.	Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	119
III.2.4.4.5.	Untersuchung der Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin durch GA.....	121
III.2.4.4.6.	Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-Amphetamin	122
III.2.4.4.7.	Interpretation der ermittelten Enantioselektivität.....	123
III.2.4.5.	Kinetische Racematspaltung von Phenylglycinol.....	125
III.2.5.	Umsatzbestimmung der enzymatischen Synthese von Glutaryl-7-ACA.....	126
III.2.5.1.	Synthesepotential in organischen Lösungsmitteln.....	127
III.2.5.2.	Synthesepotential in wäßrigen Reaktionsmedien.....	130
III.2.6.	Zusammenfassende Betrachtung.....	131
III.3.	Vergleich der Glutaryl-Acylasen verschiedener Hersteller.....	133
III.3.1.	Bestimmung der Anfangshydrolysegeschwindigkeit verschiedener Substrate.....	134
III.3.1.1.	Hydrolyserate verschiedener <i>N</i> -Acyl-7-aminocephalosporansäurederivate.....	134
III.3.1.2.	Hydrolyserate enantiomerenreiner <i>N</i> -Glutaryl-amide.....	135
III.3.1.3.	Hydrolyserate racemischer <i>N</i> -Glutaryl-arylglycinmethylester.....	135
III.3.1.4.	Hydrolyserate racemischer <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -arylalaninderivate.....	135
III.3.1.5.	Hydrolyserate racemischer <i>N</i> -Glutaryl-amphetaminderivate.....	137
III.3.1.6.	Hydrolyserate von Aminoalkoholen.....	139
III.3.1.7.	Hydrolyserate von Glutarsäuremonoestern.....	139
III.3.1.8.	Hydrolyserate weiterer Glutarylamide.....	140
III.3.2.	Effekt von Methanol auf die Hydrolyse von Gl-7-ACA.....	140
III.3.3.	Interpretation der ermittelten Hydrolyseraten.....	141
IV.	Zusammenfassung und Ausblick.....	142
	<input checked="" type="checkbox"/> Substrattoleranz.....	142
	<input checked="" type="checkbox"/> Stereoselektivität.....	143
	<input checked="" type="checkbox"/> Synthesepotential.....	144
	<input checked="" type="checkbox"/> Präparative Nutzung in der asymmetrischen Synthese.....	145
	<input checked="" type="checkbox"/> Vergleich von Glutaryl-Acylasen verschiedener Hersteller.....	145
	<input checked="" type="checkbox"/> Identifizierung einer potentiell nützlichen Reaktionssequenz.....	145

V. Experimenteller Teil.....	146
V.1. Geräte und Reagenzien.....	146
V.2. Chemische Synthesen.....	150
V.2.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	150
AAV 1 zur Synthese Mono- $\alpha,\omega$ -dicarboxyl- <i>p</i> -nitroaniliden.....	150
AAV 2 zur Synthese von <i>N</i> -Glutarylaminen.....	150
AAV 3 zur Synthese von <i>N</i> -Glutarylaminen.....	150
AAV 4 zur Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-aniliden.....	150
AAV 5 zur Synthese 3-substituierter Glutarsäuren.....	151
AAV 6 zur Synthese von 1,5-Dicarbonsäureanhydriden.....	151
AAV 7 zur Synthese <i>N</i> -Acyl-7-aminocephalosporansäuren.....	151
AAV 8 zur Synthese von Aminosäuremethylestern.....	152
AAV 9 zur Reduktion von Aminosäuren mit Lithiumaluminiumhydrid.....	152
AAV 10 zur Synthese 1-Aryl-2-nitropropenen ( <i>Henry</i> -Reaktion).....	152
AAV 11 zur Synthese von 1-Aryl-2-amino-propanen.....	152
AAV 12 zur Synthese von 3-Amino-3-aryl-propionsäuren ( <i>Rodionow</i> -Reaktion)	
.....	153
AAV 13 zur Synthese von 3-Aryl-3-hydroxypropionsäureethylestern	
( <i>Reformatsky</i> -Reaktion).....	153
AAV 14 zur Synthese von 1-Aryl-3-butenolen ( <i>Lucas</i> -Reaktion).....	154
AAV 15 zur Synthese von (-)-Camphansäureamiden.....	154
AAV 16 zur Synthese von <i>N</i> -Acetyl-Arylglycinen.....	154
AAV 17 zur Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-Arylglycinen.....	155
AAV 18 zur Synthese von Glutaryl-monoestern.....	155
V.2.2. Synthesen.....	155
Synthese von Adipinsäureanhydrid (26).....	155
Synthese von Acetondicarbonsäureanhydrid (29).....	156
Synthese von <i>N,N</i> -Phthaloyl-glutaminsäureanhydrid (31).....	156
Synthese von 3-Chlorglutarsäureanhydrid (35).....	157
Synthese von Diglykolsäureanhydrid.....	157
Synthese von Thiodiglykolsäureanhydrid.....	157
Synthese von 2,4-Dimethylglutarsäureanhydrid.....	158
Synthese von 2,2-Dimethyl-glutarsäureanhydrid.....	158
Synthese von 3-Isobutyl-glutarsäureanhydrid.....	159
Synthese von 3-Benzyl-glutarsäureanhydrid.....	159
Synthese von 3-Propyl-glutarsäureanhydrid.....	159
Synthese von 3-Butyl-glutarsäureanhydrid.....	160
Synthese von 3-Phenyl-glutarsäureanhydrid.....	160
Synthese von 3-Chlor-glutarsäure (33).....	161
Synthese von 3-Hydroxyglutarsäuredimethylester (45).....	161
Synthese von 3- <i>O</i> -Acetyl-glutarsäuredimethylester (47).....	162
Synthese von 2,4-Dicyan-3-propyl-glutarsäurediamid (49).....	162
Synthese von 2,4-Dicyan-3-(2-methylpropyl)-glutarsäurediamid (51).....	163
Synthese von 2,4-Dicyan-3-butylglutarsäurediamid (50).....	163
Synthese von 2,4-Dicyan-3-benzylglutarsäurediamid (52).....	164
Synthese von 3-Propylglutarsäure (42).....	164
Synthese von 3-Butylglutarsäure (43).....	164
Synthese von 3-(2-Methylpropyl)-glutarsäure (40).....	165
Synthese von 3-Benzylglutarsäure (41).....	165
Synthese von <i>N</i> -Carbamoyl- $\beta$ -alanin (53).....	165

Synthese von <i>N</i> -Carbamoyl- $\beta$ -aminobuttersäure (57).....	166
Synthese von <i>N</i> -Carbamoyl- $\beta$ -phenylalanin (58).....	166
Synthese von 4-Azidobuttersäureethylester (61).....	167
Synthese von 4-Nitrobuttersäureethylester (60).....	167
Synthese von <i>N</i> -Butanoyl- <i>p</i> -nitroanilid (66).....	168
Synthese von <i>N</i> -Pentanoyl- <i>p</i> -nitroanilid (67).....	168
Synthese von <i>N</i> -Hexanoyl- <i>p</i> -nitroanilid (68).....	169
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>p</i> -nitroanilid (69).....	169
Synthese von <i>N</i> -Succinyl- <i>p</i> -nitroanilid (70).....	170
Synthese von <i>N</i> -Adipoyl- <i>p</i> -nitroanilid (71).....	170
Synthese von 5'-( <i>N,N'</i> -Phthaloyl)-glutaminsäure- <i>p</i> -nitroanilid (63).....	171
Synthese von <i>N</i> -(4'-Glutamyl)- <i>p</i> -nitroanilid (20).....	172
Synthese von <i>N</i> -Diglykoyl- <i>p</i> -nitroanilid (72).....	172
Synthese von <i>N</i> -Thiodiglykoyl- <i>p</i> -nitroanilid (73).....	173
Synthese von <i>N</i> -Iminodiacetyl- <i>p</i> -nitroanilid (65).....	173
Synthese von <i>N</i> -(3-Chlorglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (74).....	174
Synthese von <i>N</i> -(Hexafluorglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (75).....	174
Synthese von <i>N</i> -(3-Benzylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (76).....	175
Synthese von (2,4-Dimethylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (77).....	175
Synthese von 5-(2,2-Dimethylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (78).....	176
Synthese von (3,3-Dimethylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (79).....	176
Synthese von <i>N</i> -(3-Propylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (80).....	177
Synthese von <i>N</i> -(3-Butylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (81).....	177
Synthese von <i>N</i> -(4-Nitrobutyryl)- <i>p</i> -nitroanilid (82).....	178
Synthese von <i>N</i> -(3-Phenylglutaryl)- <i>p</i> -nitroanilid (76).....	178
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-anilid (85).....	179
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>m</i> -nitroanilid (86).....	179
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-amino-phthalhydrazid (87).....	180
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-methylanilid (88).....	180
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>p</i> -aminobenzonitril (89).....	181
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>p</i> -methoxyanilid (90).....	181
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-7-aminonaphthalin-1,3-disulfonsäure (91).....	182
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2,6-dimethylanilid (92).....	182
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>p</i> -aminobenzoessäure (93).....	183
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-7-amino-4-methylcumarin (94).....	183
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-aminonaphthyl-4-sulfonsäure (95).....	184
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-naphthylamin (96).....	184
Synthese von <i>N</i> -Succinyl-7-amino-4-methylcumarin (98).....	185
Synthese von <i>N</i> -( <i>N,N'</i> -Phthaloyl-5'-glutamyl)-7-amino-4-methylcumarin (99).....	185
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-4-aminoantipyrin (97).....	186
Synthese von <i>N</i> -( <i>N,N'</i> -Phthaloyl-5'-glutamyl)-4-aminoantipyrin (100).....	187
Synthese von <i>N</i> -Succinyl-4-aminoantipyrin (101).....	187
Synthese von <i>N</i> -Succinyl-3-amino-phthalhydrazid (102).....	188
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-methylamin (107).....	188
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-propylamin (103).....	189
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-hexylamin (104).....	189
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-capronsäure-6-ahmet(105).....	190
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-ethanol-2-amin (106).....	190
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-benzylamin (108).....	191
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-piperonylamid (109).....	191

Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-phenylethyl-1-amin (110).....	192
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-amino-1-phenylethanol (111).....	192
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-glucamin (112).....	193
Synthese von 2-(2-Azidoethyl)-1,3-dioxolan.....	193
Synthese von 2-(1,3-dioxolan-2-yl)-ethanamin (113).....	194
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-(1,3-dioxolan-2-yl)-ethanamin (118).....	194
Synthese von <i>O</i> -( <i>p</i> -Tosyl)-solketal (117).....	195
Synthese von DL-4-Azidomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan.....	196
Synthese von DL-4-aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (114).....	196
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-4-aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (119)	197
.....	197
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2,3-propandiol-amin (121).....	197
Synthese von (5'-( <i>N,N'</i> -Phthaloyl)-glutamyl)-D-4-aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (122).....	198
Synthese von <i>N,N</i> -Phthaloyl-1-amino-2-propanol.....	199
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-methyl-1,3-propandiol-2-amin (124).....	199
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(+)- <i>threo</i> -2-amino-1-phenyl-1,3-propandiol (125)...	200
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-butanol-2-amin (126).....	200
Synthese von 1,2-Epoxy-4-phenyl-3-buten (130).....	201
Synthese von 2-Azido-4-phenyl-3-butenol (131).....	202
Synthese von 2-Amino-4-phenyl-3-butenol (128).....	202
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-2-amino-4-phenyl-3-butenol (127).....	203
Synthese von <i>E</i> -2-Nitro-1-phenyl-propen (132).....	204
Synthese von <i>E</i> -1-(3-Pyridyl)-2-nitro-propen (133).....	205
Synthese von <i>E</i> -1-(4-Carboxyphenyl)-2-nitro-propen (134).....	205
Synthese von <i>E</i> -1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-nitro-propen (135).....	206
Synthese von <i>E</i> -1-(2-Hydroxyphenyl)-2-nitro-propen (136).....	206
Synthese von <i>E</i> -1-(4-Chlorphenyl)-2-nitro-propen (137).....	207
Synthese von <i>E</i> -1-(2-furanyl)-2-nitro-propen (138).....	207
Synthese von <i>E</i> -1-(2-thienyl)-2-nitro-propen (139).....	208
Synthese von <i>E</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitro-propen (140).....	208
Synthese von <i>E</i> -1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-nitro-propen (141).....	208
Synthese von <i>E</i> -1-(2-Chlorphenyl)-2-nitro-propen (142).....	209
Synthese von <i>E</i> -1-(4-Hydroxyphenyl)-2-nitro-propen (143).....	209
Synthese von <i>E</i> -1-(3,4-Benzodioxolyl)-2-nitro-propen (144).....	210
Synthese von <i>E</i> -1-(4-benzyloxyphenyl)-2-nitro-propen (145).....	210
Synthese von <i>E</i> -1-(1-Naphthyl)-2-nitro-propen (146).....	210
Synthese von <i>E</i> -1-(2,4-Dichlorphenyl)-2-nitro-propen (147).....	211
Synthese von 1-Phenyl-2-propylamin-Hydrochlorid (148).....	211
Synthese von 1-(2-Hydroxyphenyl)-2-propylamin (149).....	212
Synthese von 1-(2-Thienyl)-2-propylamin (150).....	212
Synthese von 1-(4-Chlorphenyl)-2-propylamin (151).....	213
Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-Propylamin (152).....	213
Synthese von 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propylamin (153).....	214
Synthese von 1-(2-Chlorphenyl)-2-propylamin (154).....	214
Synthese von 1-(3,4-Benzodioxolyl)-2-propylamin (155).....	215
Synthese von 1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-propylamin (156).....	215
Synthese von 1-(1-Naphthyl)-2-propylamin (157).....	216
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-phenyl-2-propylamin (158).....	216
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-hydroxyphenyl)-2-propylamin (159).....	217

Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-thienyl)-2-propylamin (160).....	217
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(4-chlorphenyl)-2-propylamin (161).....	218
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(4-methoxyphenyl)-2-propylamin (162).....	218
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propylamin (163).....	219
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2'-chlorphenyl)-2-propylamin (164).....	219
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(3,4-benzodioxolyl)-2-propylamin (165).....	220
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(4-benzyloxyphenyl)-2-propylamin (166).....	220
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(1-naphthyl)-2-propylamin (167).....	221
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-(±)-1-phenyl-ethylamin (168).....	221
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-( <i>R</i> )-1-phenyl-ethylamin (170).....	222
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-( <i>S</i> )-1-phenyl-ethylamin (169).....	223
Synthese von (4'-Hydroxy)-acetophenonoxim (179).....	223
Synthese von 1-(4-Hydroxyphenyl)-1-ethylamin (181).....	224
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(4-hydroxyphenyl)-1-ethylamin (171).....	224
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin (172).....	225
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-aminoindan (173).....	225
Synthese von 2-Acetonaphthon-oxim (178).....	226
Synthese von (±)-(2-Naphthyl)-ethylamin-Hydrochlorid (180).....	226
Synthese von 3-Acetylpyridin-oxim (177).....	227
Synthese von 2-Acetylthiophen-oxim (176).....	227
Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butan-oxim (174).....	228
Synthese von 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanamin (175).....	228
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-( <i>R</i> )-1-cyclohexyl-ethylamin (183).....	229
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-( <i>S</i> )-1-cyclohexyl-ethylamin (184).....	229
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-cyclohexylamin (182).....	230
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- <i>D</i> -glucosamin (185).....	230
Synthese von <i>N</i> -Acetyl- <i>N'</i> -glutaryl-piperazin (189).....	231
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-dicyclohexylamin (186).....	232
Synthese von 4- <i>N</i> -Glutaryl-1-methyl-piperazid (188).....	232
Synthese von <i>N</i> -Benzoyl- <i>N'</i> -glutaryl-piperazin (190).....	233
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-piperazid (187).....	233
Synthese von 2-(4-Nitrobenzyl)-1,3-dicyclohexyl-isoharnstoff.....	234
Synthese von <i>N</i> -(4-Nitrobenzyl)-piperidin-4-carbonsäure-(4-nitrobenzyl)-ester	234
Synthese von β-Phenylalanin (56).....	235
Synthese von 4'-Fluor-β-phenylalanin (195).....	236
Synthese von 3'-Fluor-β-phenylalanin (196).....	236
Synthese von 4'-Methyl-β-phenylalanin (197).....	237
Synthese von 3-(4-Pyridyl)-3-aminopropionsäure (198).....	237
Synthese von 3-(3-Pyridyl)-3-aminopropionsäure (199).....	238
Synthese von 3',4'-Dimethoxy-β-phenylalanin (200).....	238
Synthese von β-(3,4-Benzodioxolyl)-alanin (201).....	239
Synthese von 3-(2-Thienyl)-3-aminopropionsäure (202).....	239
Synthese von 4'-Chlor-β-phenylalanin (203).....	239
Synthese von 2'-Chlor-β-Phenylalanin (204).....	240
Synthese von 3'-Hydroxy-β-phenylalanin (205).....	240
Synthese von 4'-Nitro-β-phenylalanin (206).....	241
Synthese von 3-(3-Nitrophenyl)-3-aminopropionsäure (207).....	241
Synthese von 3-(2,4-Dimethoxyphenyl)-3-aminopropionsäure (208).....	242
Synthese von 2',3'-Dimethoxy-β-phenylalanin (209).....	242
Synthese von 3-(3-Thienyl)-3-amino-propionsäure (210).....	243

Synthese von 4'-Brom- $\beta$ -phenylalanin (211).....	243
Synthese von 3'-Brom- $\beta$ -phenylalanin (212).....	244
Synthese von 2'-Methoxy- $\beta$ -phenylalanin (213).....	244
Synthese von 4'-Methoxy- $\beta$ -phenylalanin (214).....	245
Synthese von 3-(3,4-Dichlorphenyl)-3-aminopropionsäure (215).....	245
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -phenylalanin (216).....	246
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-fluorphenyl)-3-aminopropionsäure (217).....	246
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3-fluorphenyl)-3-aminopropionsäure (218).....	247
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-methylphenyl)-3-aminopropionsäure (219).....	247
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-pyridyl)-3-aminopropionsäure (220).....	248
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3-pyridyl)-3-aminopropionsäure (221).....	248
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-aminopropionsäure (222) .....	249
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(2-thienyl)-3-aminopropionsäure (223).....	249
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-chlorphenyl)-3-aminopropionsäure (224).....	250
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(2-chlorphenyl)-3-aminopropionsäure (225).....	250
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-nitrophenyl)-3-aminopropionsäure (226).....	251
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3-nitrophenyl)-3-aminopropionsäure (227).....	251
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-aminopropionsäure (228) .....	251
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3-thienyl)-3-aminopropionsäure (229).....	252
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-bromphenyl)-3-aminopropionsäure (230).....	253
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(4-methoxyphenyl)-3-aminopropionsäure (233).....	253
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(3,4-dichlorphenyl)-3-aminopropionsäure (234).....	254
Synthese von DL- $\beta$ -Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (235).....	254
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL- $\beta$ -phenylalaninmethylester (239).....	255
Synthese von $\beta$ -Phenylalaninethylester (236).....	255
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninethylester (240).....	256
Synthese von $\beta$ -Phenylalaninethylthioester-Hydrochlorid (237).....	256
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninethylthioester (241).....	257
Synthese von 3-(2-Thienyl)-3-aminopropionsäure-methylester (238).....	257
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-(2-thienyl)-3-aminopropionsäure-methylester (242) .....	258
Synthese von Norbornan- $\beta$ -lactam (244).....	258
Synthese von 3-Amino-norbornan-2-carbonsäure-Hydrochlorid (245).....	259
Synthese von Indan-2- $\beta$ -lactam (249).....	259
Synthese von 1-Aminoindan-carbonsäuremethylester (250).....	260
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-Aminonorbornan-2-carbonsäure (251).....	260
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-1-Aminoindan-2-carbonsäuremethylester (252).....	261
Synthese <i>N</i> -Acetyl-DL-(4-hydroxyphenyl)-glycin (253).....	261
Synthese <i>N</i> -Acetyl-DL-(2-hydroxyphenyl)-glycin (254).....	262
Synthese von <i>N</i> -Acetyl-DL-(3,4-dihydroxyphenyl)-glycin (255).....	263
Synthese von <i>N</i> -Acetyl-DL-(2-thienyl)-glycin (256).....	263
Synthese von <i>N</i> -Acetyl-DL-(4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylphenyl)-glycin (257) .....	264
Synthese von <i>N</i> -Acetyl-DL-(3,4-Dimethoxyphenyl)-glycin (258).....	265
Synthese von DL- <i>p</i> -Hydroxyphenyl-glycin (259).....	265
Synthese von DL-(3,4-dihydroxyphenyl)-glycin (260).....	266
Synthese von DL-(2-Thienyl)-glycin (261).....	266
Synthese von (3,4-Dimethoxyphenyl)-glycin (262).....	267

Synthese von Phenylacetamid (263).....	267
Synthese von Glutarsäuremonoamid (264).....	268
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3',4'-dimethoxy-phenylglycin (266).....	268
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(3,4-dimethoxyphenyl)-glycin (269).....	269
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(2,4-dimethoxyphenyl)-glycin (270).....	270
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(2-thienyl)-glycin (271).....	270
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-glycin (272).....	271
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylphenyl)-glycin (273).....	271
Synthese <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(4-hydroxyphenyl)-glycin (274).....	272
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-glycin (275)...	272
Synthese von <i>N</i> -Phenylacetyl-DL-1-(2-hydroxynaphthyl)-glycin (276).....	273
Synthese von DL-Phenylglycinmethylester-Hydrochlorid (277).....	274
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-phenylglycinmethylester (283).....	274
Synthese von DL-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid (278).....	274
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-phenylalaninmethylester (284).....	275
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-alaninmethylester (372).....	275
Synthese von DL-(4-Hydroxyphenyl)-glycinmethylester (279).....	275
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-(4-Hydroxyphenyl)-glycinmethylester (285).....	276
Synthese von DL-(2-Thienyl)-glycinmethylester (280).....	276
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-(2-thienyl)-glycin-methylester (286).....	277
Synthese von DL-Methionin-Methylester (373).....	277
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-methioninmethylester (374).....	278
Synthese von DL-(3,4-Dimethoxyphenyl)-glycin-methylester (281).....	278
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-DL-(3,4-dimethoxyphenyl)-glycinmethylester (287)...	278
Synthese von DL-(3,4-Dihydroxyphenyl)-glycinmethylester (282).....	279
Synthese von Tetrahydrofurfurylchlorid (291).....	279
Synthese von 4-Pentenol (289).....	280
Synthese von 4-Pental (293).....	281
Synthese von (1-amino-5-pentenyl)-nitril (297).....	282
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-(1-amino-5-pentenyl)-nitril (298).....	282
Synthese von 4-Pentenyl-pivaloat.....	283
Synthese von 4,5-Dibrompentyl-pivaloat.....	283
Synthese von 4-Pentanol (292).....	284
Synthese von DL-Phenylglycinol (299).....	285
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinol (303).....	285
Synthese von DL-Methioninol (300).....	286
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-methioninol (304).....	286
Synthese von 3-Amino-3-phenyl-propanol (301).....	286
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-3-amino-3-phenyl-propanol (305).....	287
Synthese von DL-Phenylalaninol (302).....	287
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-phenylalaninol (306).....	288
Synthese von <i>N</i> -(3'-Chlor)-glutaryl-7-aminocephalosporansäure (311).....	288
Synthese von <i>N</i> -(3',3'-Dimethyl)-glutaryl-7-aminocephalosporansäure (308)....	289
Synthese von <i>N</i> -Thiodiglykoyl-7-aminocephalosporansäure (309).....	289
Synthese von <i>N</i> -Glutaryl-7-aminocephalosporansäure (18).....	290
Synthese von <i>N</i> -Succinyl-7-aminocephalosporansäure (307).....	290
Synthese von <i>N</i> -Diglykoyl-7-aminocephalosporansäure (310).....	291
Synthese von Glutarsäure-mono-(2,2,2)-trifluorethylester (313).....	291
Synthese von Glutarsäure-monomethylester (312).....	292

Synthese von Glutaryl-mono-1-phenylethylester (314).....	292
Synthese von ( $\pm$ )-4-Phenyl-2-butanol.....	293
Synthese von Glutaryl-mono-(4-phenyl)-2-butylester (315).....	293
Synthese von ( $\pm$ )-1-Phenyl-2-propanol (323).....	294
Synthese von Glutaryl-mono-2-(1-phenyl)-propylester (324).....	295
Synthese von Glutaryl-solketalester (316).....	295
Synthese von DL-Mandelsäuremethylester.....	296
Synthese von O-Glutaryl-p-nitrophenolat (320).....	296
Synthese von Glutarsäure-(6-brom-2-naphthyl)-monoester (318).....	297
Synthese von Mono-7-Hydroxycumarin-glutarylester (319).....	297
Synthese von Mono-Glutaryl-DL-Mandelsäuremethylester (317).....	298
Synthese von O-Glutaryl-p-nitrobenzylalkohol (321).....	298
Synthese von 4-Phenyl-3-hydroxybuttersäureethylester (327).....	299
Synthese von 3-Phenyl-3-hydroxypropionsäuremethylester (328).....	299
Synthese von 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäureethylester .....	300
Synthese von 3-(4-Fluorphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (329).....	300
Synthese von 3-(4-Chlorphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (330).....	301
Synthese von 3-(4-Bromphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (331).....	301
Synthese von 3-(4-Methoxyphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (332).....	301
Synthese von 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-propionsäureethylester (333)	
.....	302
Synthese von 2,2-Dimethyl-3-phenyl-3-hydroxypropionsäureethylester (334)..	302
Synthese von 3-(3-Pyridyl)-3-hydrox-propionsäureethylester (335).....	303
Synthese von 3-(4-Pyridyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (336).....	303
Synthese von 3-(2-Pyridyl)-3-hydroxypropionsäureethylester.....	303
Synthese von 3-(2-Furfuryl)-3-hydroxy-propionsäureethylester (337).....	304
Synthese von 3-(5-Hydroxymethylfuryl)-3-hydroxypropionsäureethylester	
(338).....	304
Synthese von 3-(2-(5-Acetyloxymethyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (339)	
.....	305
Synthese von 3-(2-Thienyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (340).....	305
Synthese von 3-(3-Thienyl)-3-hydroxypropionsäureethylester (341).....	306
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-phenyl-3-hydroxypropionsäureethylester (342)...	306
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-(4-fluorphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester	
(345).....	306
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-(4-chlorphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester	
(346).....	307
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-(4-bromphenyl)-3-hydroxypropionsäureethylester	
(347).....	307
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-(4-methoxyphenyl)-3-	
hydroxypropionsäureethylester (344).....	308
Synthese von 3-O-Glutaryl-3-phenyl-3-hydroxypropionsäuremethylester (343)	308
Synthese von 1,1-Diallylbenzylamin (349).....	309
Synthese von 3,3-Diallyl- $\beta$ -alaninamid (350).....	310
Synthese von 1-Phenyl-3-butenol (353).....	310
Synthese von 1-(4-Fluorphenyl)-3-butenol (354).....	311
Synthese von 1-(4-Chlorphenyl)-3-butenol (355).....	311
Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-3-butenol (356).....	311
Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-3-butenol (357).....	312
Synthese von 1-(2-Pyridyl)-3-butenol (358).....	312

Synthese von 1-(3-Pyridyl)-3-butenol (359).....	313
Synthese von 1-(2-Furanyl)-3-butenol (360).....	313
Synthese von 1-(5-Hydroxymethyl-2-furanyl)-3-butenol (361).....	314
Synthese von 1-(5-Acetyloxymethyl-2-furanyl)-3-butenol (362).....	314
Synthese von 1-(2-Thienyl)-3-butenol (363).....	315
Synthese von 1-(3-Thienyl)-3-butenol (364).....	315
Synthese von 1,3-Diallyl-indan-1,3-diol (365).....	316
Synthese von <i>O</i> -Glutaryl-(1-phenyl-3-butenol) (366).....	316
Synthese von <i>O</i> -Glutaryl-(1-(4-Fluorphenyl)-3-butenol) (367).....	317
Synthese von <i>O</i> -Glutaryl-(1-(4-Chlorphenyl)-3-butenol) (368).....	318
Synthese von <i>O</i> -Glutaryl-(1-(4-Bromphenyl)-3-butenol) (369).....	318
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-DL-phenylglycinmethylester (383).....	319
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-(±)1-phenylethyl-1-amin (382).....	320
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-( <i>R</i> )-1-phenylethyl-1-amin (382).....	321
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-( <i>S</i> )-1-phenylethyl-1-amin (382).....	322
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-1-aminoindan (385).....	322
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-(±)-2-amino-1-phenyl-ethanol (386).....	323
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-(±)-2-aminobutanol (387).....	324
Synthese von <i>N</i> -(-)-Camphanoyl-DL-β-Phenylalaninmethylester (384).....	324
V.3.Enzymatische Reaktionen.....	326
V.3.1.Qualitative Aktivitätsassays Glutaryl-Acylase.....	326
Aktivitätsassay <i>N</i> -Acyl- <i>p</i> -nitroanilide.....	326
Aktivitätsassay Glutarylamide.....	326
Aktivitätsassay Glutarsäuremonoester.....	326
V.3.2.Qualitative Aktivitätsassays Penicillin G-Acylase.....	326
Aktivitätsassay <i>N</i> -Phenylacetyl-arylglycine.....	327
V.3.3.Umsatzbestimmung mittels Freisetzung von <i>p</i> -Nitroanilin.....	327
V.3.3.1.Erstellung der Kalibrationskurven.....	327
V.3.3.2.Umsatzbestimmung der Hydrolyse von <i>N</i> -Acyl- <i>p</i> -nitroaniliden.....	328
V.3.4.Aktivitätsbestimmung durch Azokupplung freigesetzter Phenole.....	329
V.3.5.Umsatz- und Selektivitätsbestimmung durch Kernresonanzspektroskopie.....	329
Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-phenylethylamin (168):.....	329
Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-phenylglycinmethylester (283):.....	330
Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-β-phenylalaninmethylester (239):.....	330
V.3.6.Umsatz- und Selektivitätsbestimmung mittels HPLC.....	330
V.3.6.1.Umsatzbestimmung der Hydrolyse von <i>N</i> -Acyl- <i>p</i> -nitroaniliden durch die GA... 330	
Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl- <i>p</i> -nitroanilid (Gl-PNA) (69):.....	331
Hydrolyse von <i>N</i> -Succinyl- <i>p</i> -nitroanilid (Suc-PNA) (70):.....	331
Hydrolyse von <i>N</i> -Adipoyl- <i>p</i> -nitroanilid (Adp-PNA) (71):.....	331
Hydrolyse von <i>N</i> -Glutamyl- <i>p</i> -nitroanilid (Gm-PNA) (20):.....	332
V.3.6.2.Umsatz- und Selektivitätsbestimmung der Hydrolyse verschiedener chiraler Substrate durch die GA.....	332
V.3.6.2.1.Erstellung der Kalibrationskurven.....	333
V.3.6.2.1.1.Kalibrationskurve 1-Phenylethylamin und <i>N</i> -Glutaryl-1-phenylethylamin .....	334
V.3.6.2.1.2.Kalibrationskurve Phenylglycinmethylester und <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinmethylester.....	335
V.3.6.2.1.3.Kalibrationskurve β-Phenylalaninmethylester und <i>N</i> -Glutaryl-β-phenylalaninmethylester .....	336
V.3.6.2.1.4.Kalibrationskurve : Phenylglycinol und <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinol.....	337

V.3.6.2.1.5. Kalibrationskurve 1-(2-Naphthyl)-ethylamin und <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin.....	338
V.3.6.2.2. Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-phenylethylamin (168) durch GA .....	339
V.3.6.2.2.1. Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-phenylethylamin.....	339
V.3.6.2.2.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0.....	339
V.3.6.2.2.3. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	340
V.3.6.2.3. Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinmethylester (283)...	340
V.3.6.2.3.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	341
V.3.6.2.3.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0, Kosolvens Methanol 10% (v/v).....	341
V.3.6.2.4. Enzymatischen Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester (239) .....	341
V.3.6.2.4.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	342
V.3.6.2.4.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0, Kosolvens Methanol 10% (v/v).....	342
V.3.6.2.5. Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-phenylglycinol (303).....	342
V.3.6.2.5.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0.....	343
V.3.6.2.5.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	343
V.3.6.2.5.3. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0, Kosolvens Methanol 10% (v/v).....	343
V.3.6.2.6. Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin (172)..	344
V.3.6.2.6.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0.....	344
V.3.6.2.6.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0, Kosolvens Methanol 10% (v/v).....	344
V.3.6.2.7. Enzymatische Hydrolyse von <i>N</i> -Glutaryl-Amphetamin (158).....	344
V.3.6.2.7.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0, Kosolvens Methanol 10% (v/v).....	345
V.3.6.3. Umsatzbestimmung der enzymatischen Synthese von Gl-7-ACA (18) in organischen Lösungsmitteln.....	345
V.3.6.4. Umsatzbestimmung der enzymatischen Synthese von Gl-7-ACA (18) in Wasser .....	346
V.3.7. Kinetische Racematspaltung von Phenylglycinol.....	347
V.3.8. Bestimmung der relativen Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse unterschiedlicher Substrate durch verschiedene Glutaryl-Acylasen.....	347
V.3.8.1. Hydrolysen im rein wäßrigen Medium.....	349
V.3.8.2. Hydrolysen im wäßrigen Medium unter Methanolzusatz.....	358
V.3.8.3. Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeit von Glutaryl-7-ACA mit und ohne Methanolzusatz.....	360
VI. Verzeichnisse.....	361
VI.1. Literaturverzeichnis.....	361
VI.2. Abbildungsverzeichnis.....	375
VI.3. Tabellenverzeichnis.....	378

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat	Gm-	Glutamyl-
6-APA	6-Aminopenicillanic Acid	h	Stunde
7-ACA	7-Aminocephalosporanic Acid	HACA	Deacetyl-7-aminocephalosporanic Acid
7-ADCA	7-Aminodeacetoxycephalosporanic Acid	HMBC	heteronuclear multiple-bond CH correlation
AAR	Anisaldehyd-Reagenz	HPLC	High performance liquid chromatography
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	Hz	Hertz
Abb.	Abbildung	<i>i. Vak.</i>	im Vakuum
ACV	Aminoadipinsäure-Cystein-Valin-Tripeptid	IPN	Isopenicillin N
Adp-	Adipoyl-	<i>J</i>	Kopplungskonstante
AGA	Amino G Acid	k	Geschwindigkeitskonstante
AMC	7-Amino-4-methylcumarin	konz.	konzentriert
AMF	Amphetamin	LAH	Lithiumaluminiumhydrid
Äq.	Äquivalente	Lfm.	Laufmittel
AS	Aminosäure	Lsg.	Lösung
AU	absorbance units	m	Multipllett (Spektrenzuordnung)
Ausb.	Ausbeute	Me-	Methyl-
b	breit (Spektrenzuordnung)	min	Minute
BKG	Bromkresolgrün-Reagenz	MJ	Megajoule
BPAME	$\beta$ -Phenylalaninmethylester	MS	Massenspektrometrie
BPO	Dibenzoylperoxid	Naphth	1-(2-Naphthyl)-ethylamin
CAL-B	<i>Candida Antarctica</i> Lipase B	NHD	Ninhydrin-Reagenz
COSY	correlation spectroscopy	NMR	nuclear magnetic resonance
CPC	Cephalosporin C	NOESY	nuclear <i>Overhauser</i> effect spectroscopy
CSA	Chiral Solvating Agent	<i>Ntn</i>	<i>N</i> -terminal nucleophile
CSI	<i>N</i> -Chlorsulfonyl-isocyanat	PEA	1-Phenylethylamin
d	Dublett (Spektrenzuordnung)	PGA	Penicillin G-Acylase
d	Tag	PGCME	Phenylglycinmethylester
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	PGOL	Phenylglycinol
$\delta$	chemische Verschiebung	pH	Wasserstoffionen-Exponent
DEPT	distortionless enhancement polarisation by transfer	PNA	<i>p</i> -Nitroanilin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	ppm	parts per million
DMSO	Dimethylsulfoxid	q	Quartett (Spektrenzuordnung)
<i>E. coli</i>		quin.	Quintett (Spektrenzuordnung)
<i>ee</i>	enantiomeric excess	<i>R<sub>f</sub></i>	Rückhaltefaktor
EI	Elektronenstoß-Ionisation	RP	reversed phase
ESI	Elektrospray-Ionisation	s	Singulett (Spektrenzuordnung)
Et-	Ethyl-	Schmp.	Schmelzpunkt
GA	Glutaryl-Acylase	Suc	Succinyl-
GC	Gaschromatographie	t	Triplett (Spektrenzuordnung)
Gl-	Glutaryl-	THF	Tetrahydrofuran

### I. Einleitung

#### I.1. Chemie im Wandel

„... in der konjunkturabhängigen Chemie liegt keine Zukunft mehr.“ Mit diesen Worten faßte der damalige Vorstandsvorsitzende *J. Dormann* 1998 die Zerschlagung der *Hoechst AG* zusammen [1] und setzte damit ein Fanal für eine Entwicklung die seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts zunehmend an Dynamik gewonnen hat. Der Wandel der *Hoechst AG* von einem Unternehmen der „Teerfarbenindustrie“ [2], einem der weltweit führenden Chemie- und Pharma-Unternehmen zum „Worldleader in Life-Science“ [3], ist mittlerweile Geschichte, ebenso das ihn durchlaufende Unternehmen. Die fortschreitende Integration biotechnologischer Verfahren in die Verbundproduktion der chemischen Industrie, die Substitution mehrerer chemischer durch einen einzigen biologischen Verfahrensschritt, stellt die Abkehr von einem Quasi-Dogma dar, welches seit dem Wandel von der Alchemie zur exakten Wissenschaft das Selbstverständnis der Chemie mitbestimmte. Hierzu trägt auch die zunehmende Interdisziplinarität und die Notwendigkeit der gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Rechtfertigung des eigenen Handelns bei. Die allgemeine und fachliche Diskussion spricht von Wellen der Biotechnologie, von roter, grüner oder weißer Biotechnologie [4], beschreibt damit in wohlklingenden Worten jedoch nur Ansätze, die seit langem bekannt [5] und nicht nur zur „Verwertung des Wertlosen“ [6] praktikabel sind.

Seit *Wöhlers* Synthese von „organischem“ Harnstoff aus „anorganischem“ Ammoniumcyanat, als der Widerlegung der noch von *Goethe* heftig propagierten Idee der *vis vitalis*, etablierte sich die schon fast dogmatische Überzeugung, daß dem Chemiker in seiner synthetischen Schaffenskraft keine Grenzen gesetzt seien. *Carl Bosch* konstatierte 1920: „Es gibt keinen Naturstoff, der sich nicht einmal synthetisch gewinnen ließe.“ [7].

Diese Überzeugung wurde in Deutschland und darüber hinaus genährt durch die mannigfaltigen Synthese-Erfolge, welche, induziert durch gesellschaftliche und politische Fakten, den Ersatz natürlicher Ressourcen durch Produkte mit oftmals verbesserten Eigenschaften ermöglichten. Angefangen bei den Farbstoffen Alizarin und Indigo, über Therapeutika wie Aspirin, Salvarsan oder die Sulfonamide, bis hin zu Ammoniak, Methanol, synthetischem Kautschuk oder Treibstoff als Produkten der chemischen Hochdrucksynthese, wurden komplexere Verbindungen ausgehend von der minimalen Rohstoffbasis Kohle zugänglich [8]. Biotechnologische Produktionsverfahren für Grundchemikalien mit ihrer agrarbasierten Rohstoffbasis wurden oftmals trotz ihrer technischen Etablierung verdrängt, wie die Ethanolgewinnung aus Stärke bzw. den Sulfitablaugen der Zellstoffproduktion [6], oder die von Butanol und Aceton aus Gärungsprozessen [9], oder nahmen eine Nischenposition ein, wie etwa die Milchsäureproduktion.

## I. Einleitung

---

Dennoch blieb die Dominanz der organisch-chemischen Synthese nicht unangezweifelt. Im akademischen Raum waren anfangs *Liebig* [10] und *Pasteur* die jeweiligen Speerspitzen der disputierenden Lager. Streitpunkt war vor allem die Natur der alkoholischen Gärung, vom Menschen mit Hingabe seit Jahrtausenden genutzt, wissenschaftlich betrachtet jedoch Neuland. Im Laufe der Jahre sah sich *Liebig* gezwungen, trotz seiner in der Chemie nahezu papalen Autorität, seinen ursprünglichen Standpunkt der *generatio spontanea*, zu korrigieren und der biologisch-vitalistischen Position *Pasteurs* anzunähern [11],[12]. Dieser etablierte durch systematische Untersuchungen auch der Wein-, Milch-, Essig- und Buttersäuregärung den Gärungsprozeß als Lebensäußerung von Mikroorganismen. *Liebig* erklärte nun den Gärprozeß durch die Einwirkung von chemischen Fermenten, welche die Zellen in ihrem Inneren bereitstellen. Damit gelang es ihm zwar nicht, verlorenes Terrain zurück zu gewinnen, er spornte aber weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen an. *Buchner* gelang es 1897 mit der Isolierung der Zymase aus Hefe, die vorher so gegensätzlichen Positionen zu vereinen [13],[14]. Die alkoholische Gärung wurde als chemischer Prozeß identifiziert, katalysiert durch Zymase. Sie war aber zugleich als Stoffwechselfunktion die Lebensäußerung von Mikroben.

Buchners Entdeckung führte jedoch zunächst nicht zur systematischen Erforschung der mikrobiologischen Stoffwechselvorgänge, sondern zur Herausbildung der Spezialdisziplin Enzymchemie, unter dem Dach der organischen Chemie. *Delbrück* [5] definiert das Betätigungsfeld der neuen Disziplin mit folgenden Worten: „Es sind also enzymatische Kräfte, welche in den Mikroorganismen thätig sind, und für den Industriellen kommt es nun darauf an diese Kraftquellen zur Entwicklung zu bringen. ... Nicht der Pilz ist das Wirkende, sondern die Enzyme, welche er erzeugt.“

Somit blieb der biologischen Technologie die Teilhabe an der industriellen chemischen Genese lange versagt. Allenfalls in Nischen, in der pharmazeutischen Produktion, oder in Umwandlungen, welche rein chemisch nicht zu bewerkstelligen waren, konnte sie sich als „methodisches Hilfsmittel“ [15] etablieren. Prominente Beispiele für dieses „Mauerblümchendasein“ sind die Produktion von Vitamin C (**1**) nach dem *Reichstein-Grüssner*-Verfahren [16], oder die Produktion von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika [17].

Ein Teilschritt der Ascorbinsäuresynthese ist die regioselektive Oxidation von D-Sorbit (**2**) zu L-Sorbose (**3**) durch *Acetobacter suboxydans*, welche chemisch nur durch äußerst aufwendige Schutzgruppenoperationen zu erreichen ist.

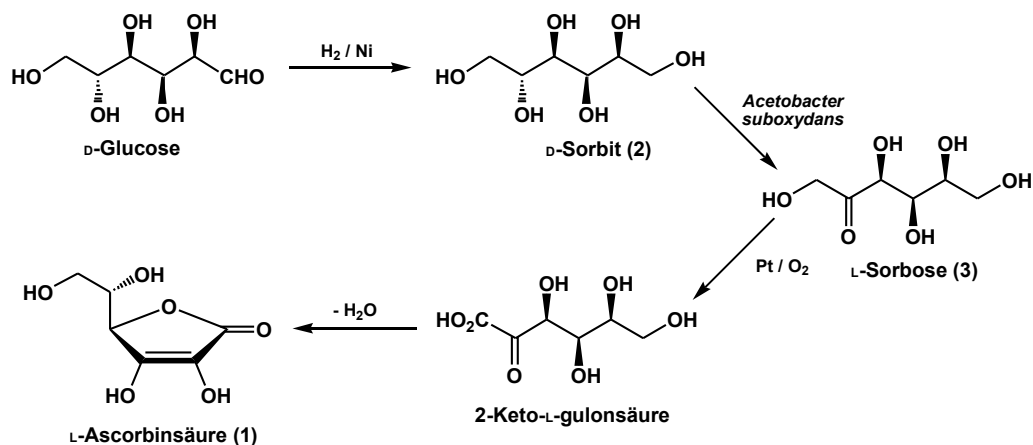
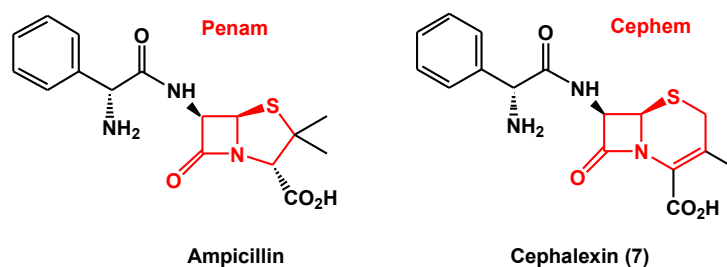


Abb. 1. Modifiziertes Reichstein-Grüssner Verfahren

Semisynthetische  $\beta$ -Lactam-Antibiotika besitzen ein Penam- oder Cephem-Grundgerüst, welches biosynthetisch durch die Kupplung von L-Cystein (4), L-Valin (5) und L- $\alpha$ -Amino adipinsäure (6) und weitere stereoselektive Umsetzungen erzeugt wird.

Abb. 2.  $\beta$ -Lactamantibiotika

Die chemische Synthese wäre, wenn überhaupt, nur unter erheblichem Aufwand möglich, die Gewinnung der pharmakophoren Grundkörper erfolgt deshalb fermentativ, die Umwandlung zum applizierten Wirkstoff jedoch in mehreren chemischen Verfahrensschritten. Beide angesprochenen Verfahren wurden in jüngerer Zeit durch rein biotechnologische Verfahren weitestgehend verdrängt.

Mitentscheidend für die rein chemische Wahrnehmung von Vitalprozessen war auch die schiere Unkenntnis intrazellulärer Abläufe und ihrer Ursachen. Zwar erkannte *Mendel* schon in den 1860er Jahren die grundlegenden Gesetzmäßigkeiten der Vererbung [18], jedoch blieben diese weitgehend unbekannt oder wurden als „Erbsenzählerei“ eines mährischen Mönches abgetan. Es dauerte noch Jahrzehnte, bis sich aus dem bis dahin eher mystischen Begriff des Erbguts eine wissenschaftlich fundierte Genetik entwickelte. Wurde lange Zeit den Enzymen, jenen höchst komplexen biologischen Makromolekülen, mangels besseren Wissens die Funktion als Träger der Erbinformation zugeschrieben, so änderte sich diese Betrachtungsweise innerhalb von nur wenigen Jahren. Mit der Entwicklung einer molekularen Genetik gelang es letztendlich, die seit *Liebig*s und *Pasteur*s Zeiten anhaltende Kontroverse zu beenden. Die stetig wachsende Einsicht in die das

## I. Einleitung

---

Leben bestimmenden Prinzipien führte seit den 1980er zur Etablierung einer Vielzahl von „omics“-Disziplinen [19], welche weit über das Terrain der Mikrobiologie oder Chemie hinausreichen. So ist die genaue Kenntnis der Stoffwechselrouten biologischer Systeme, ihrer Interdependenz und Variationsbreite Voraussetzung für die mögliche Implementierung in chemische Produktionsprozesse. Mit molekularbiologischen Mitteln ist es oftmals möglich, den Metabolismus von Mikroorganismen derart umzustrukturieren, daß die Zielprodukte in ungeahntem Ausmaß erzeugt werden. Die so geschaffenen „Designerbugs“ eröffnen die Möglichkeit, sich mit „intelligenteren Produkten“ den Herausforderungen der zunehmenden Globalisierung erfolgreich zu stellen. Somit erhält *Meldons* Feststellung von 1886 einen aktuellen Bezug: „Die Stärke unserer Konkurrenten liegt in ihren Laboratorien und nicht – wie hier - auf den Börsen!“ [20]. Um es mit *Mephistos* Worten zu sagen : „Am Ende hängen wir doch ab von Kreaturen die wir machten.“ [21] Aus den ehemals „methodischen Hilfsmitteln“ werden Bausteine eines Gesamtkonzeptes, welches eine materielle Unbeschwertheit bei zunehmender Lebensqualität sichern soll.

## I.2. Enzyme – Von einfachen, komplexen Transformationen

Enzyme sind die Basis jeglicher metabolischer Vorgänge in lebenden Systemen [22]. Als Einzelenzym oder in Enzymkomplexen bewirken sie Umsetzung einer Vielzahl chemischer Komponenten, welche für die Erhaltung und den Fortgang des Lebens unerlässlich sind. Spätestens seit Buchners Entdeckung der zellfreien Gärung, „das man die Gährwirkung der Hefe loszulösen vermag von ihrem Leben“ [5], ist bekannt, daß viele Enzyme ihre spezifische Wirkung auch in isolierter Form in nicht-biologischen Systemen, entfalten können. Die Entwicklung immer leistungsfähiger Methoden der Proteinaufreinigung führt dazu, daß mittlerweile Abertausende von Enzymen isoliert und charakterisiert worden sind. Vor allem in Verbindung mit mikrobiellen Überexpressionssystemen ermöglicht dies die kommerzielle Verfügbarkeit Hunderter von Enzymen und deren *in vitro* Verwendung.

Aus präparativ-chemischer Sicht reicht das Spektrum der Transformationen dabei von einfachen hydrolytischen Reaktionen über Redox-Reaktionen [23], Halogenierungen [24] und C-C-Verknüpfungen [25],[26] bis hin zu *Diels-Alder*-Reaktionen [27]. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die bei der Umsetzung des Substrats durchlaufenen Reaktionsstadien weitaus komplexer sind, als die chemische Nettogleichung vermuten läßt. Allen Biotransformationen ist jedoch eine meist hohe Chemo-, Regio- oder Enantioselektivität zu eigen. Dies wurde bereits von *Emil Fischer* erkannt und führte zur Formulierung des „Schloss und Schlüssel“-Prinzips [28].

Am Beispiel des  $\alpha$ -Chymotrypsins, einer Serin-Protease, welche die Hydrolyse der Amidbindung bevorzugt aromatischer Aminosäuren katalysiert, lassen sich die Schritte einer vermeintlich einfachen Reaktion exemplarisch darstellen [29].

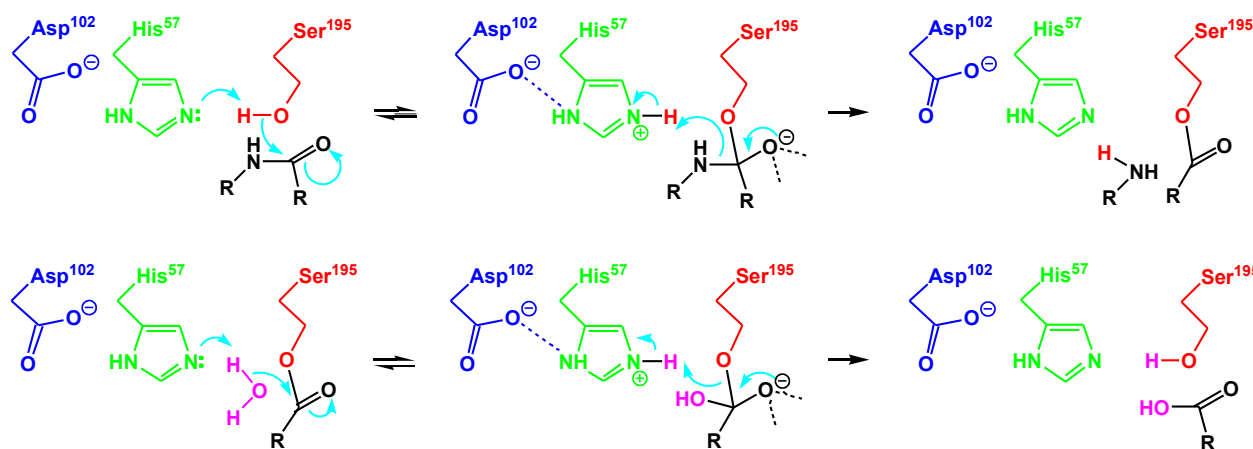


Abb. 3. Katalysemechanismus des  $\alpha$ -Chymotrypsins

Neben der Interaktion des Substrats mit der katalytischen Triade aus Asparaginsäure, Histidin und

## I. Einleitung

---

Serin sind noch weitere elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat des Enzyms für die Reaktion entscheidend. Der Imidazolteil des Histidins bewirkt eine allgemeine Säure-Base-Katalyse, die Hydroxylfunktion des Serins eine nucleophile Katalyse, das Carboxylat des Asparagins eine Ladungsstabilisierung und das Peptidrückgrat schließlich eine Stabilisierung der aus der zu hydrolysierenden Amidfunktion intermediär gebildeten tetraedrischen Zwischenstufe im „Oxyanionenloch“.

Die Klassifizierung von Enzymen erfolgt durch die Zuteilung zweier Namen und eines vierstelligen Codes. Der Trivialname steht zumeist im Zusammenhang mit der katalysierten Reaktion, der zweite, systematische, Name verweist auf Substrat und Reaktionstyp. Der EC-Code der *Enzyme Commission* der *International Union of Biochemistry* erfasst systematisch die Eigenschaften der betrachteten Enzyme [30]. Die Unterteilung erfolgt in sechs Hauptklassen, welche sich weiter in Unter- und Unter-Unterklassen aufteilen lassen. Enzyme gleicher EC-Klassifizierung können jedoch aufgrund ihres unterschiedlichen biologischen Ursprungs gravierende Unterschiede aufweisen [31].

**Tab. 1.** Enzymklassen und Funktionen

<b>Enzymklasse</b>	<b>Funktion</b>
1. Oxidoreduktasen	Oxidation und Reduktion
2. Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen
3. Hydrolasen	Hydrolysereaktionen
4. Lyasen	Eliminierung/Addition von kleinen Molekülen aus/an Doppelbindungen
5. Isomerasen	Isomerisierungen
6. Ligasen	Bildung kovalenter Bindungen gekoppelt mit ATP-Spaltung

Die Anwendungsbreite von Biokatalysatoren im Labor reicht dabei von einem Reaktionsschritt mit isolierten Enzymen bis zur fermentativen *de novo*-Synthese von komplexen Molekülen. Demnach lassen sich biotechnologische Umsetzungen prinzipiell in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen sind dies Reaktionen mit isolierten Enzymen, zum anderen die Verwendung ganzer Zellen um die gewünschte Transformation zu erzielen [32].

Die Verwendung isolierter Enzyme hat die Vorteile einer apparativ einfacheren Reaktionsführung, der einfacheren Aufarbeitung und einer durch höhere Konzentrationstoleranz bedingten gesteigerten Produktivität. Ganze Zellen benötigen hingegen kein externes Recycling von Kofaktoren [33].

Für die Synthese im präparativen Maßstab von Bedeutung sind heute vor allem die Hydrolasen,

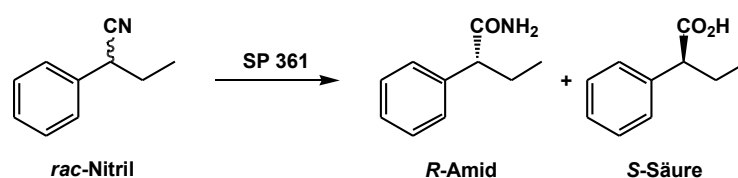
welche bei circa 65% aller enzymkatalysierten Reaktionen Verwendung finden. Ihnen folgen die Oxidoreduktasen mit circa 25% und die Lyasen mit 5% der bekannten Umsetzungen [30]. Für Biotransformationen im kommerziell-technischen Maßstab ergibt sich eine ähnliche Verteilung, wobei die Bedeutung der Transferasen jedoch exponierter ist, die Anwendung entspricht etwa Hydrolasen 50%, Oxidoreduktasen 20%, Transferasen 10% und Lyasen 8% [34].

Selbst im Bereich der großtechnischen Produktion von Chemikalien konnten sich Hydrolasen mittlerweile etablieren, so etwa in der Hydrolyse von Acrylnitril zu Acrylamid. Das u.a. von *Degussa* und *Mitsubishi Rayon* (vormals *Nitto*) verwendete Verfahren stützt sich dabei auf immobilisierte Nitrilhydratasen, welche bei erhöhten Volumenausbeuten, geringerem Energiebedarf und reduzierten Abfallmengen eine bessere Produktqualität durch Vermeidung unerwünschter Polymerisation bietet [35],[36].

**Tab. 2.** Vergleich der Hydrolyseverfahren zur Acrylamidproduktion, Quelle [36]

Parameter	Chemische Hydrolyse	Enzymatische Hydrolyse
Reaktionstemperatur [°C]	70	0-15
Ausbeute [%]	70-80	100
Acrylamid-Konzentration [%]	30	48-50
Produktaufkonzentrierung	notwendig	entfällt
Energiebedarf [MJ / kg Acrylamid]	1.9	0.4
CO <sub>2</sub> -Produktion [kg CO <sub>2</sub> / kg Acrylamid]	1.5	0.3

Neben der beachtlichen Toleranz bezüglich der Konzentration des Substrats zeigen die Nitrilhydratasen im Zusammenspiel mit Amidasen auch eine bemerkenswerte Selektivität bei der Umsetzung von Nitrilen. So beobachtete *Turner* bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Arylnitrilen mit *Rhodococcus* SP 361 eine vom Substitutionsmuster am Aromaten abhängige Enantioselektivität [37]. Weist die Hydratase für den unsubstituierten Aromaten keinerlei Enantioselektivität auf, so hydrolysiert eine Amidase subsequent das *S*-Enantiomer zur Carbonsäure.



**Abb. 4.** *S*-selektive Hydrolyse von Nitrilen

Durch Einführung einer *tert.*-Butyl-Gruppierung in *para*-Position des Aromaten und Verkürzung der Alkylkette verändert sich die Substratstruktur derart, daß die Hydratase nunmehr eine Präferenz für das *R*-Enantiomer aufweist.

## I. Einleitung

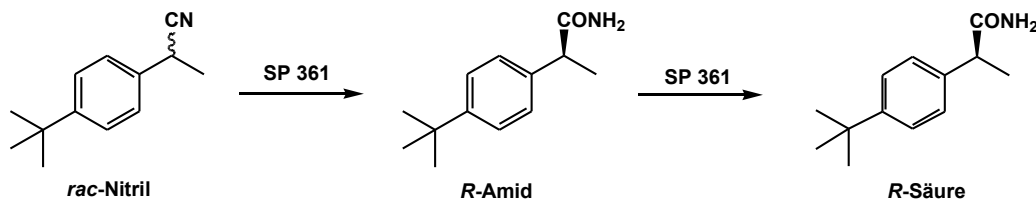


Abb. 5. R-selektive Hydrolyse von Nitrilen

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Nitrilhydratase aus *Brevibacterium* R312 die enantiotopen Nitrilfunktionen in 3-substituierten, prochiralen Glutaryldinitrilen zu differenzieren vermag [38].

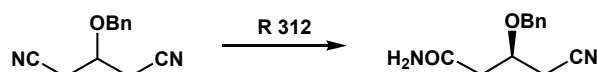


Abb. 6. Differenzierung prochiraler Dinitrile

*Meth-Cohn* zeigte, daß die Hydrolyse von substituierten Benzonnitrilen zu den entsprechenden Benzoesäureamiden durch *Rhodococcus* AJ270 durchweg glatt verläuft, daß aber *ortho*-substituierte Substrate anschließend nur sehr langsam vom Amid in die jeweiligen Benzoesäuren überführt werden [39],[40].

Für die Produktion von Feinchemikalien und Pharmaka bieten Nitrilhydratase / Amidase-Systeme interessante Optionen. So ist es z.B. möglich D-Phenylglycinnitril (8) in einer „Eintopf“-Reaktion zum Amid (9) zu hydratisieren und dieses subsequent als Donor in der enzymatischen Acylierung von 7-Aminodesacetoxycephalosporinsäure (10) (7-ADCA) zum Antibiotikum *Cephalexin* (7) zu verwenden [41],[42].

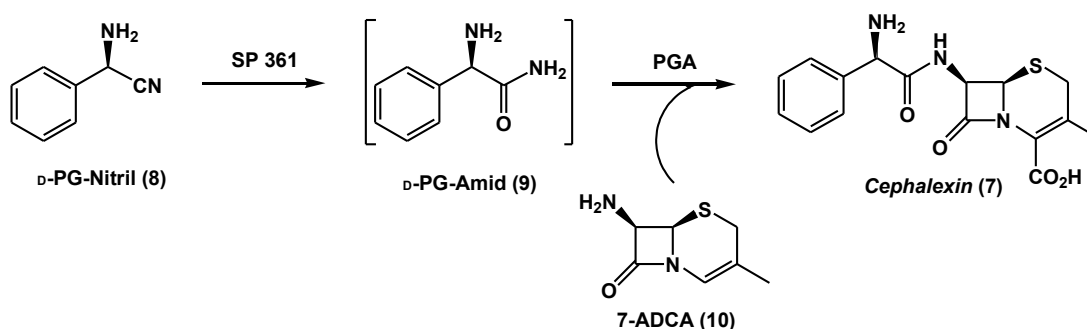


Abb. 7. Eintopf-Synthese von *Cephalexin*

Penicillin G-Acylase (PGA) ist ein weiteres Mitglied der Enzymklasse der Hydrolasen, welches technische Verwendung findet, aber auch in der präparativen Synthese genutzt wird. Sie spaltet zum einen unter milden Bedingungen die Phenylacetylgruppe aus fermentativ gewonnenem Penicillin G ab, zum anderen katalysiert sie, wie weiter oben bereits gezeigt, unter ebenso schonenden Bedingungen die Acylierung von verschiedenen Aminopenam- und Aminocephem-Grundkörpern

[43].

Während die PGA nur eine begrenzte Toleranz gegenüber strukturellen Variationen der Acylkomponente aufweist, so akzeptiert sie andererseits ein breites Spektrum von Amino- und sogar Hydroxylkomponenten [44].

Als Acylkomponenten werden neben der Phenylacetylgruppe nur *p*-Hydroxyphenylacetyl-, Phenylglyciny-, *p*-Hydroxy-phenylglyciny- und Pyridylacetylreste hochselektiv erkannt [45].

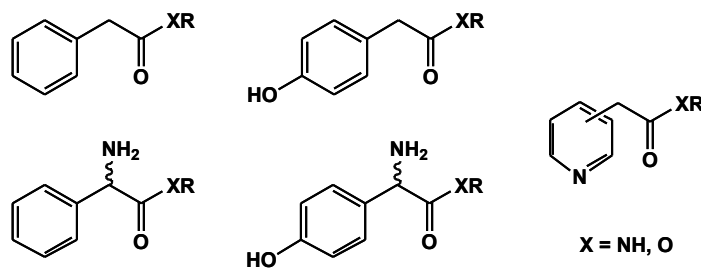


Abb. 8. Von der PGA akzeptierte Acylreste

Die breite Substrattoleranz bezüglich der Aminkomponente eröffnet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen lassen sich mittels der PGA Racemate von Aminen, Aminosäuren, Aminoalkoholen u.a. spalten [46]-[48].

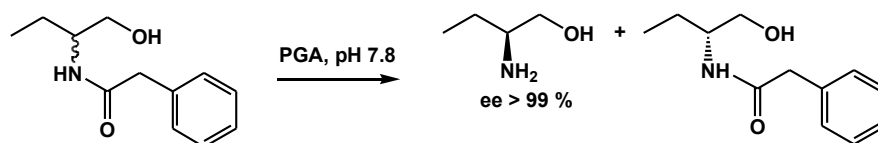


Abb. 9. Racematspaltung mittels PGA

Zum anderen ergibt sich die Möglichkeit, die PGA zur Synthese von entsprechenden Amiden und Peptiden zu verwenden [49].

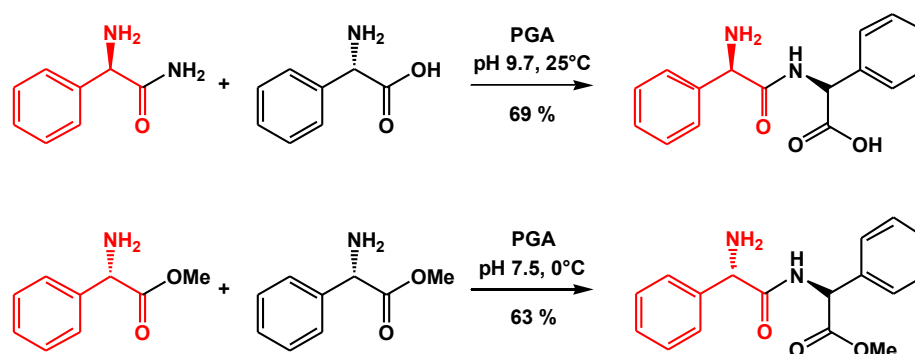


Abb. 10. Peptidsynthese mit PGA

Des Weiteren eignet sich die Phenylacetyl-Gruppe aufgrund der milden Abspaltungsbedingungen als Schutzgruppe in verschiedenen Synthesefeldern [50], z.B. zur Konstruktion von „Safety Catch“-Linkern [51].

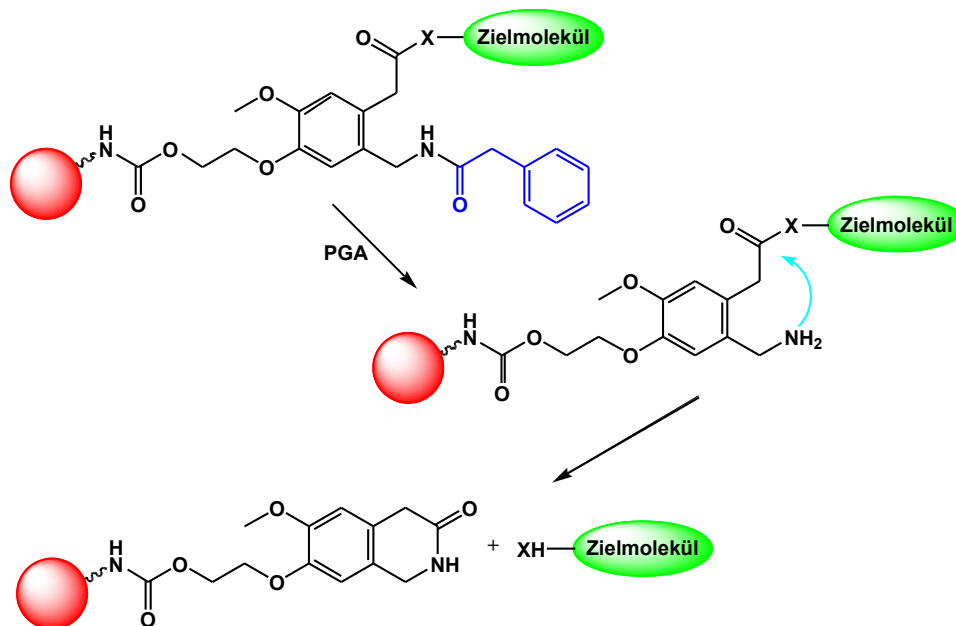


Abb. 11. Schutzgruppenoperation mit der PGA

Vorteilhaft für die Ausnutzung des Synthesepotentials von Hydrolasen ist die Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, da Substrate und Acyldonoren oftmals nur eine bescheidene Löslichkeit im rein wässrigen Milieu aufweisen. Unter den Aminohydrolasen sind die Proteasen Subtilisin und  $\alpha$ -Chymotrypsin als freie Enzyme in rein organischen Solventien aktiv [52],[53]. Freie PGA zeigt keine Aktivität in rein organischen Medien, während Lösungsmittel-Wasser Systeme zu einer Verminderung der Aktivität führen, aber auch die Enantioselektivität der Umsetzung beeinflussen[46],[54]-[56]. Immobilisierte PGA-Präparationen hingegen sind in verschiedenen organischen Lösungsmittelsystemen aktiv [57]-[59].

Aus Untersuchungen zur Hydrolyse verschiedener Substrate wurde ein Model der aktiven Enzymtasche der PGA entwickelt[46],[60]-[62]. Die Tasche gliedert sich in drei Regionen ( $\rho_1$ ,  $\rho_2$ ,  $\rho_3$ ) welche unterschiedliche Affinitäten für chemische Strukturen aufweisen. Die Region  $\rho_1$  ist spezifisch für Phenylacetyl-derivate, nicht jedoch für stereogene Informationen am  $\alpha$ -Kohlenstoff. In Region  $\rho_3$  binden bevorzugt hydrophile oder anionische Strukturen, was sich durch die hohe Enantioselektivität bei der Hydrolyse von  $\alpha$ -Aminosäurederivaten und  $\alpha$ -Aminoalkoholen äußert; zusätzlich weist sie eine leichte Präferenz für aromatische Strukturen auf. Region  $\rho_2$  hingegen ist wenig spezifisch.

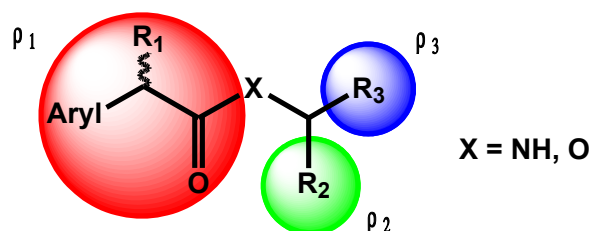


Abb. 12. Modell der Enzymtasche von PGA

Die experimentell ermittelten variierenden Selektivitäten [46] von zwei Penicillin G-Acylasen aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen wurden mittels Homologie-Modelling untersucht [31]. Der Vergleich der Penicillin G-Acylasen aus *E. coli* und *Alcaligenes faecalis* demonstriert eine Sequenzübereinstimmung von 47% und eine Aminosäureähnlichkeit von 67%. Weiter zeigt sich, daß die  $\alpha$ -Kette und der Kernbereich des Proteins hoch konservative Strukturelemente darstellen. Jedoch führt der Austausch nur einer Aminosäure in den jeweiligen Regionen des aktiven Zentrums zu signifikanten Veränderungen in der Selektivität bezüglich der Substrate. Der Austausch Phe $\beta$ 71Pro resultiert in einer Aufweitung der Region  $\rho_2$  und damit zu einer breiteren Substrattoleranz bezüglich der Aminkomponente. Die räumliche Ausdehnung von Region  $\rho_3$  wird durch den Wechsel Thr $\beta$ 384Pro verkleinert, dies führt zu einer Erhöhung der Enantioselektivität. Zusätzlich beeinflusst der Austausch Ser $\beta$ 67Ala in Region  $\rho_1$  die Affinität gegenüber der Acylkomponente.

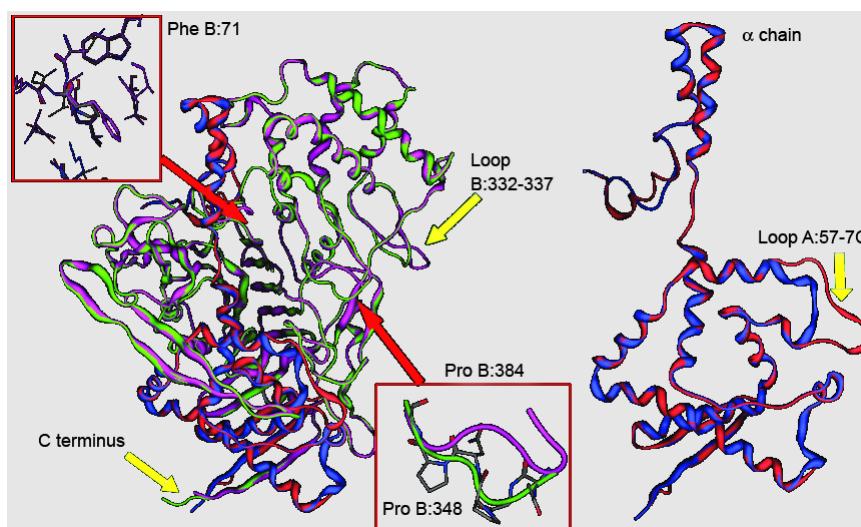


Abb. 13. Homologiemodelling der PGA aus *Alcaligenes faecalis*, Quelle [31]

Biokatalysatoren stellen interessante Werkzeuge zur Durchführung verschiedenster chemischer Transformationen dar. Unter den isolierten Enzymen sind die Hydrolasen für Umsetzungen im präparativen Maßstab interessant, vor allem Lipasen und Proteasen. Dies liegt zum einen an ihrer guten Verfügbarkeit, da sie technisch u.a. in Wasch- und Reinigungsmitteln Verwendung finden,

## **I. Einleitung**

---

oder z.B. aus Schlachtabfälle leicht isoliert werden können. Zum anderen sind sie wie andere Standard-Chemikalien einfach zu handhaben und unter unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen einsetzbar.

Prozeßenzyme wie die PGA bilden eine weitere Gruppe von potentiell interessanten Katalysatoren, da sie bereits Optimierungsverfahren bezüglich Stabilität und Umsatz durchlaufen haben. Jedoch ist die Breite der Anwendungsmöglichkeiten oft noch weniger gut untersucht.

Aufgrund patentrechtlicher Restriktionen unterscheiden sich die in ansonst nahezu identischen Biotechnologieprozessen verwendeten Enzyme von Hersteller zu Hersteller bezüglich ihres Ursprungs und ihrer Spezifität. Dies verbreitert somit die Palette der verfügbaren Werkzeuge zur Durchführung einer bestimmten Synthese.

### I.3. Glutaryl-Acylase

Die Produktion von  $\beta$ -Lactamantibiotika, welche im Jahr 2000 bei ungefähr 45000 t und einem Gesamtumsatz von circa 15 Mrd. US\$ lag, ist das prominenteste Beispiel der biotechnologischen Herstellung von Feinchemikalien [63],[64]. Sie repräsentiert zugleich am deutlichsten den anhaltenden Technologiewechsel in der Fertigung von biologisch aktiven Molekülen. War in der industriellen Produktion den Mikroorganismen anfangs nur die Aufgabe der Fermentation von Ausgangsstoffen zugedacht [17], so bedient man sich heute in fast allen Synthesestadien der Hilfe von Biokatalysatoren [65],[66].

Der Biosyntheseweg der hauptsächlich produzierten Antibiotikavorstufen Penicillin G und Cephalosporin C (11) (CPC) ist anfangs für alle  $\beta$ -Lactamproduzenten identisch, verzweigt sich aber später [43],[67].

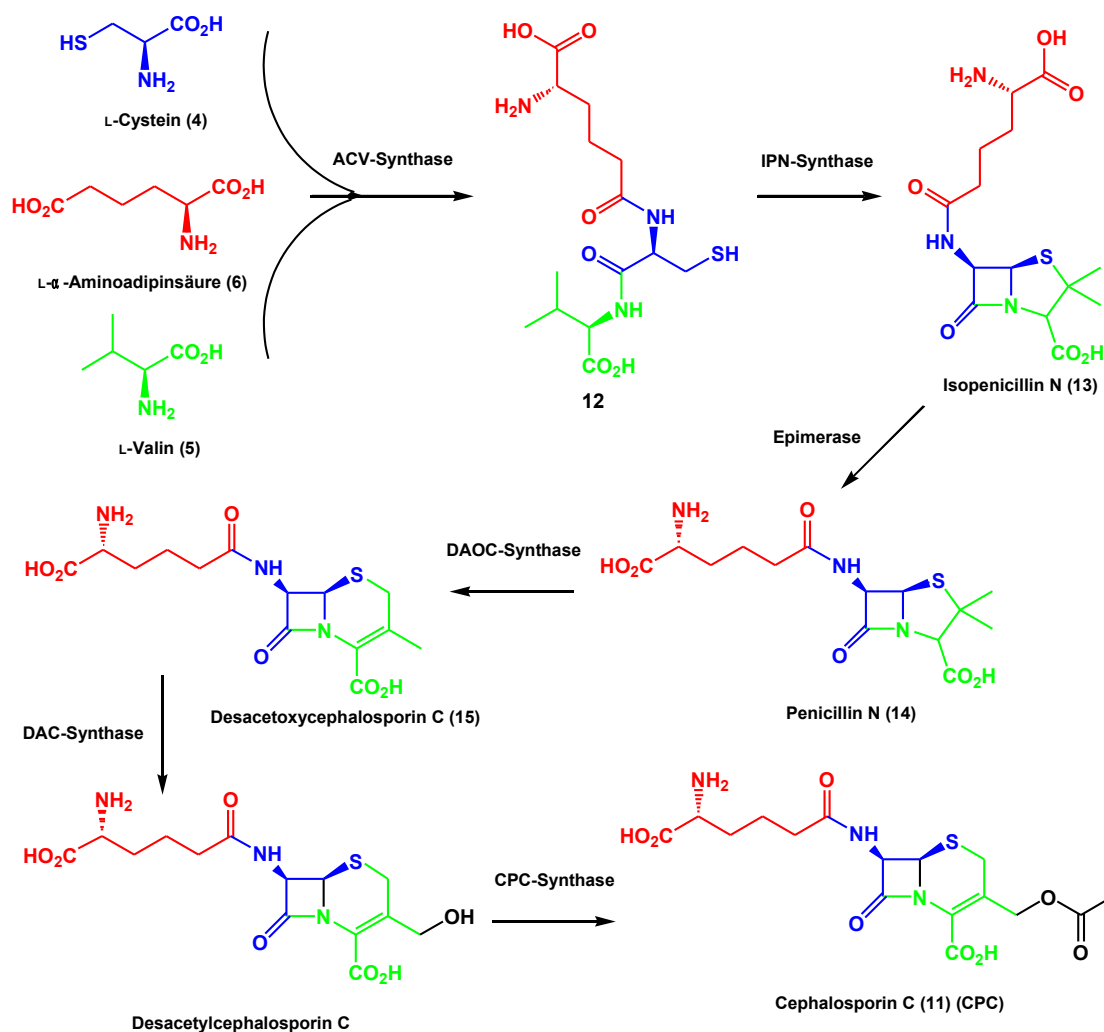


Abb. 14. Ausschnitt aus dem Biosyntheseweg der  $\beta$ -Lactamantibiotika

Wie bereits erwähnt wird aus den Aminosäuren L-Cystein (**4**), L-Valin (**5**) und L- $\alpha$ -Aminoadipinsäure (**6**) ein Tripeptid (**12**) synthetisiert. Die hierfür verantwortliche ACV-Synthase

## I. Einleitung

ist ein multifunktionales Enzym, welches zusätzlich noch die Isomerisierung von L- zu D-Valin bewirkt. Die subsequente Cyclisierung zum  $\beta$ -Lactam/Thiazolidin-Ringsystem des Isopenicillin N (13) erfolgt durch die IPN-Synthetase, eine Dioxygenase. An diesem Punkt verzweigt sich die Biosynthese und führt in zwei weiteren Schritten zum Penicillin G, bzw. in 4 Schritten zum Cephalosporin C. Bei Letzterem tritt intermediär durch Einwirken einer Expandase auf Penicillin N (14) die acylierte 7-Aminodesacetoxycephalosporinsäure (15) (7-ADCA) auf, welche neben 6-Aminopenicillinsäure (16) (6-APA) und 7-Aminocephalosporansäure (17) (7-ACA) das dritte wichtige Edukt für die Synthesen von semisynthetischen  $\beta$ -Lactamantibiotika darstellt [68],[69].

Der Deacylierungsschritt zu den gewünschten Edukten erfolgte bis vor wenigen Jahren ausnahmslos mit aufwendigen chemischen Schritten, wie Schutzgruppenoperationen mit Siliziumorganika und Aktivierung der Amidfunktion mit Phosphorpentachlorid oder Nitrosylchlorid, welche mit hohen Aufwendungen für Entsorgung und Energiebedarf, bedingt durch die Notwendigkeit niedriger Reaktionstemperaturen, verbunden waren [66],[70],[71]. So entstehen bei der Produktion einer Tonne 7-ACA aus CPC 31 Tonnen deponiepflichtige Nebenprodukte [65].

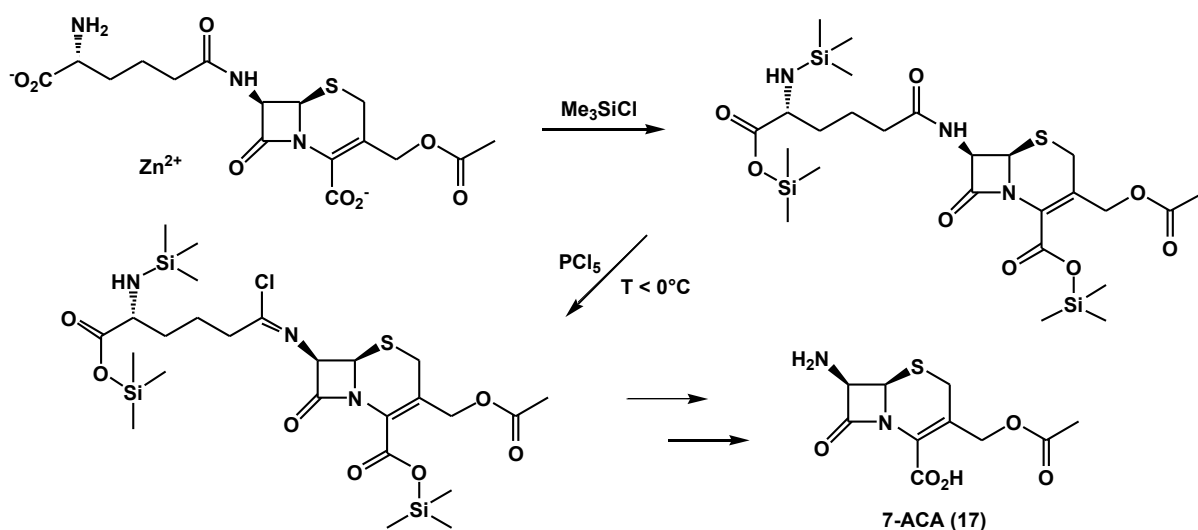


Abb. 15. Chemische Deacylierung von CPC

Die chemischen Routen zu den entsprechenden  $\beta$ -Lactamgrundkörpern wurden jedoch mittlerweile nahezu vollständig durch biotechnologische Prozesse verdrängt. Wie bereits erwähnt, deacyliert die PGA das Penicillin G zu 6-APA. Die Gewinnung von 7-ACA (17) erfolgt ebenfalls enzymatisch mittels eines zweistufigen Verfahrens.

Zuerst wird die D- $\alpha$ -Aminoadipoylseitenkette von CPC durch eine D-Aminosäureoxidase in das entsprechende  $\alpha$ -Ketoamid-derivat überführt [72],[73]. Dabei wird ebenfalls Wasserstoffperoxid gebildet, welches zur spontanen Decarboxylierung der  $\alpha$ -Ketosäure zu N-Glutaryl-7-aminocephalosporansäure (18) (GI-7-ACA) beiträgt. Der entstandene Glutarylrest wird mittels einer

Acylase hydrolytisch abgespalten [74].

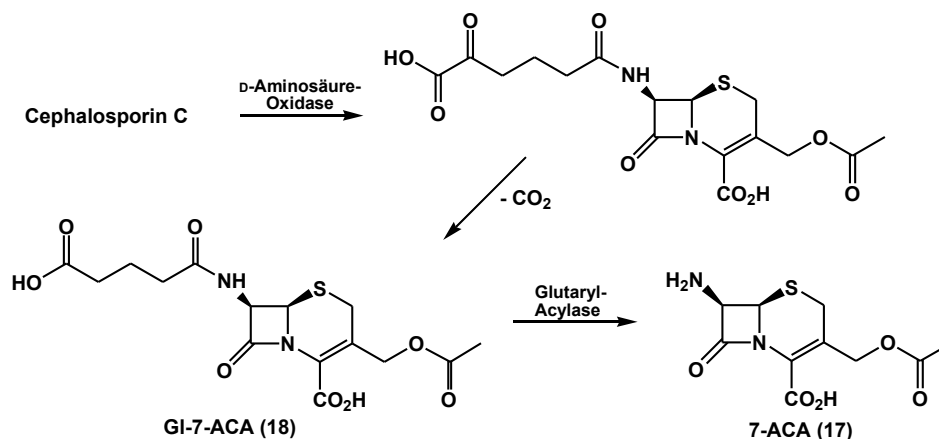


Abb. 16. Enzymatische Deacylierung von CPC

Die im zweiten Reaktionsschritt verwendeten Glutaryl-Acylasen werden, ebenso wie die PGA, der Familie der *Ntn*-Hydrolasen zugeordnet [76],[77]. Diese zeichnen sich durch Serin, Threonin oder Cystein als katalytisches Nucleophil am *N*-Terminus des Proteins und eine ungewöhnliche Faltung des aktiven Zentrums aus. Die aus enzymologischer Sicht vorgenommene, substratbezogene Unterteilung in Cephalosporin C-Acylasen und Glutaryl-Acylasen ist wenig sinnvoll, da erstere GI-7-ACA (18) ebenfalls als Substrat akzeptieren und dieses sogar schneller als CPC (11) umsetzen [78]. Zudem ist die physiologische Rolle dieser Acylasen (analog der PGA) noch ungeklärt und die tatsächlichen natürlichen Substrate daher unbekannt. Eine alternative Klassifizierung wurde von Wang anhand der Genstruktur, Molekülmasse und Enzymeigenschaften vorgeschlagen [78]. Diese führt zu fünf Unterklassen von Cephalosporin-Acylasen und erlaubt auch die Eingliederung von Acylasen, deren Gensequenz bisher unbekannt ist. Innerhalb einer Unterklasse beträgt die Homologie der Aminosäuresequenzen mehr als 90% und die Enzymeigenschaften sind sehr ähnlich. In diesem Klassifizierungssystem stellen Glutaryl-Acylasen eine Untergruppe der Cephalosporin-Acylasen dar. Ein Vergleich der Kristallstrukturen verschiedener Glutaryl-Acylasen mit der PGA zeigt eine große Übereinstimmung der Struktur des aktiven Zentrums, der Sequenzidentität und Aminosäureähnlichkeit [75]. Aus den erhaltenen Strukturdaten der Enzyme ergibt sich eine hohe Selektivität für die Glutaryl-Seitenkette, welche in einer lochartigen Vertiefung innerhalb der Enzymtasche gebunden wird [79]. Die Selektivität wird durch eine starke Wechselwirkung der terminalen Carboxylfunktion mit einem

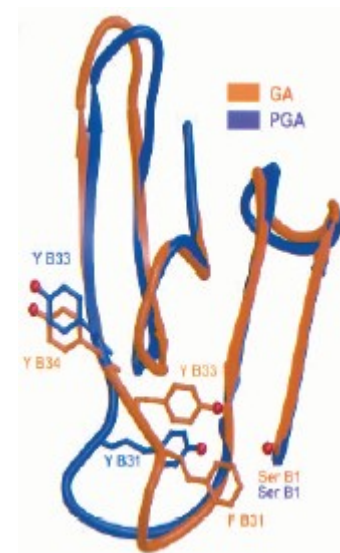


Abb. 17. Vergleich der aktiven Zentren von PGA und GA, Quelle [75]

## I. Einleitung

Arginin- und Thyrosinrest am Ende der Vertiefung, sowie hydrophoben Wechselwirkungen mit den Methylengruppen des Glutarylrestes bewirkt. Dies erklärt zugleich die geringe Enzymaktivität der natürlich vorkommenden Proteine gegenüber CPC (11), welche maximal 4% der Aktivität gegenüber Gl-7-ACA (18) beträgt [80]. Zum einen ist die  $\alpha$ -Aminoalkylkette eine Methylengruppierung länger, zum anderen trägt sie eine zwitterionische Kopfgruppe, die in einer verminderten Wechselwirkung mit dem Arginin- und dem Thyrosinrest resultiert und ebenfalls die hydrophoben Beiträge reduziert. Die Region des aktiven Zentrums, in welcher die Aminokomponente 7-ACA gebunden wird, ist wenig selektiv. Hydrophobe Wechselwirkungen des Enzyms bestehen mit den Molekülpositionen 4,5,6 und 8. Hydrophile Wechselwirkungen finden zwischen einem Argininrest und der Acetoxygruppe in Position 3 statt. Die Carboxylgruppe in Position 1 ist dem Solvens zugewandt. Die unterschiedlichen Selektivitäten der Enzymtaschenregionen lassen sich anschaulich durch die Ausdehnung der beteiligten Proteinoberfläche verdeutlichen. Belegt der Glutarylrest insgesamt  $606 \text{ \AA}^2$  Oberfläche, so bedeckt der Cephemkörper nur  $100 \text{ \AA}^2$ . Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes bewirkt keine nennenswerte Änderung der Proteinkonformation und entspricht damit dem Interaktionsmodell nach Fischer [28]. Der Katalysemechanismus der Glutaryl-Acylase ähnelt dem anderer Serin-Proteasen, jedoch nimmt der terminale Serinrest zwei Aufgaben wahr. Die Hydroxylgruppe fungiert als

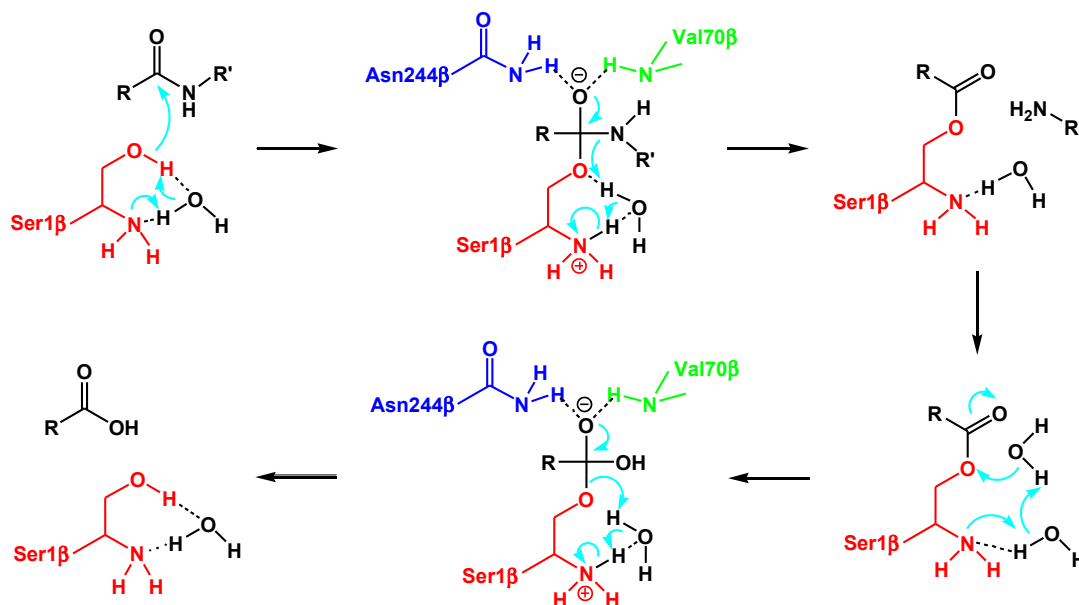
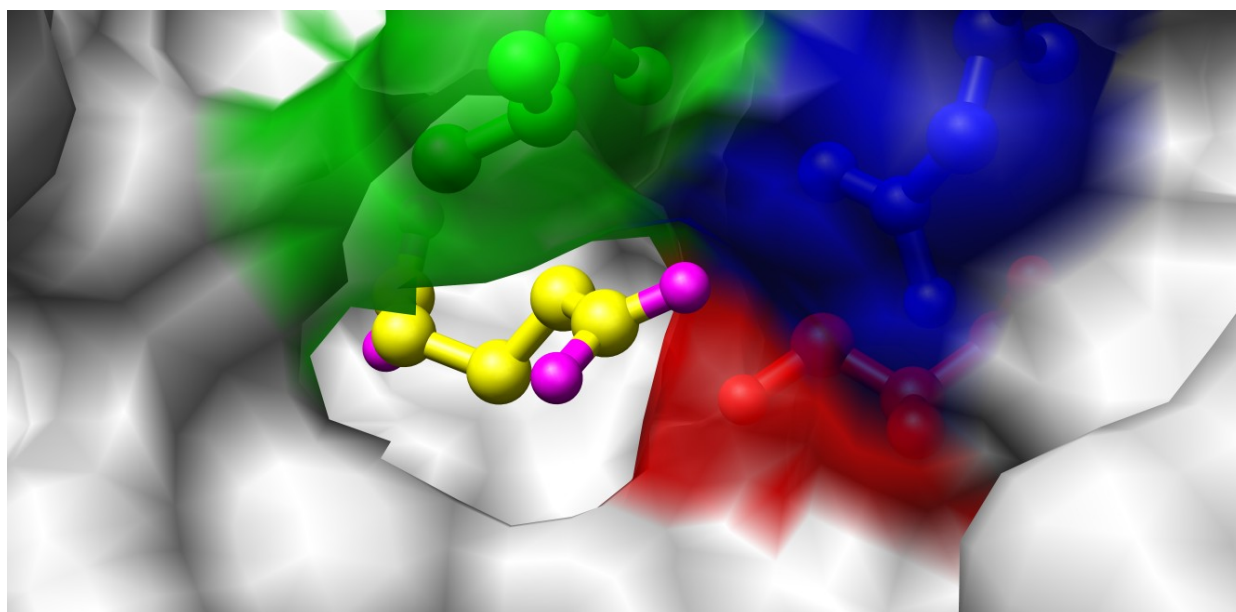


Abb. 18. Katalysemechanismus von GA nach [76]

Nucleophil, die Aminofunktion als Base. Asparagin und Valin stabilisieren die tetraedrischen Zwischenstufen in einem Oxyanionenloch. Somit sind an der Katalyse zwar primär drei Aminosäuren beteiligt, aufgrund der Funktionsteilung läßt sich aber statt von einer Triade besser von zwei katalytischen Dyaden sprechen [75],[81].

Das Gros der Publikationen zum Themenkomplex Cephalosporin/Glutaryl-Acylasen befasst sich mit der Identifizierung und Sequenzierung neuer Mikrobenstämme mit entsprechender Acylase-Aktivität, sowie der gezielten Evolution von Proteinen mit verbesserter CPC-Akzeptanz [82]-[98].



**Abb. 19.** Katalytische Dyaden SER(rot),VAL(grün)/ASN(blau) und Glutarsäure (gelb/magenta) in Enzymtasche von GA aus *Pseudomonas diminuta* KAC-1

Umfangreiche Untersuchungen liegen auch zur Verbesserung der Enzymstabilität und Aktivität unter Prozeßbedingungen vor, diese betreffen vornehmlich den Immobilisationsmodus [99]-[105]. Wenig Beachtung fand bisher die Substrattoleranz und Selektivität der Glutaryl-Acylasen, sowie eine Verwendung unter präparativ-synthetischen Aspekten [106],[107]. Aus Screeningexperimenten ist bekannt, daß neben 7-ACA und 7-ADCA auch *p*-Nitroanilin und 7-Amino-4-methylcumarin als Aminokomponenten erkannt werden [108]. Derivate aromatischer *L*-Aminosäuren lassen sich enzymatisch zu den entsprechenden *N*-Glutarylkomponenten umsetzen [109]. Hierfür ist aber das Vorliegen der freien endständigen Carboxylfunktion zwingend erforderlich. Als von der Glutaryl-Acylase akzeptierte Acylkomponenten wurden Adipoyl- und Glutamoylreste identifiziert, die allerdings langsamer als die jeweiligen Glutaryl-derivate umgesetzt werden. Parallel zu den Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation untersuchte *Riva* ebenfalls die Substratspezifität von GA [110]-[112]. Neben Derivaten weniger  $\alpha$ -Aminosäuren wurden einige aliphatische Glutaryl-amide und Glutarylmonoester als Substrate der GA erkannt. Die verwendete Glutaryl-Acylase zeigt eine bestimmte Enantioselektivität bei der Hydrolyse racemischer *N*-Glutaryl-amide.

Gemeinsam ist den genannten Arbeiten zur präparativ-synthetischen Applikation, daß sie die kommerziell genutzte Glutaryl-Acylase der *Recordati S.p.A.* verwenden.

### II. Zielsetzung

Die biotechnologische Produktion von 7-Aminocephalosporansäure im industriellen Maßstab [113] basiert auf der Oxidation von CPC (**11**) durch eine D-Aminosäureoxidase und anschließende Deacylierung von Gl-7-ACA (**18**) durch Glutaryl-Acylase. Letzteres Prozeßenzym ist in gereinigter und stabilisierter, sowie in immobilisierter Form gut verfügbar. Aus der strukturellen Verwandtschaft zwischen Penicillin G-Acylase und GA eröffnet sich die Frage, ob die GA ein vergleichbar breites Anwendungsspektrum wie die PGA aufweist.

Lipase-katalysierte stereoselektive Umsetzungen von chiralen Aminen [114] wurden zwar im technischen Umfeld realisiert, jedoch ist das Repertoire der Methoden für Reaktionen im Labormaßstab begrenzt. Neben den Lipasen [115],[116] findet vor allem die auf Proteasen basierende „Esterase“-Methode Verwendung [117]. Unter den Acylasen fanden bisher nur die Amino-Acylase I [118] und die PGA [45]-[49],[57]-[62] häufiger ihren Weg in asymmetrische Umsetzungen. Ein Vergleich der von PGA und GA umgesetzten Acylreste zeigt, daß vom präparativ-synthetischen Standpunkt aus der Glutarylrest drei Vorteile gegenüber dem Phenylacetylrest aufweist:

1. Die terminale Carboxylfunktion erhöht die Hydrophilie des Acylrestes, während im gleichen Zuge die Lipophilie von nur drei Methylengruppen gegenüber dem größeren Benzylrest abnimmt.
2. Die Einführung des Glutarylrestes kann atomökonomisch über das entsprechende Anhydrid erfolgen, im einfachsten Fall entfällt die Verwendung einer Hilfsbase.
3. Auf die Stoffmenge bezogen ergibt sich ein Preisvorteil von 25-30% bei der Verwendung von Glutarsäureanhydrid gegenüber Phenylacetylchlorid.

Eine erfolgreiche Anwendung von Enzymen auf chemische Transformationen erfordert die Kenntnis verschiedener Reaktionsparameter. Zum Einen ist dies die Breite der Substrattoleranz und besonders favorisierter Struktur motive, zum Anderen hat das Reaktionsmedium einen entscheidenden Einfluß auf die Qualität und Quantität biokatalytischer Umsetzungen [119],[120].

Für die Glutaryl-Acylase existiert eine Reihe von Studien, welche die Untersuchung der Reaktionsparameter der industriellen Verwendung d.h. der selektiven Spaltung von Gl-7-ACA, zum Thema haben [99]-[105]. Zum Themenkomplex des präparativ-synthetischen Potentials der GA existierten jedoch zu Beginn der Studien im Rahmen dieser Arbeit keinerlei publizierte Untersuchungen.

Um die mögliche Anwendungsbreite der GA auf präparativ-synthetische Herausforderungen zu

ermitteln, erfolgte ein detailliertes Studium der durch die GA katalysierten enzymatischen Umsetzungen. Die für die Untersuchungen verwendete GA ist ein Produkt der Fa. *Roche*.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der folgenden Aspekte:

- die Breite der Substrattoleranz
- die Ermittlung der Stereoselektivität der GA
- die präparative Nutzung in der asymmetrischen Synthese
- der Vergleich von Glutaryl-Acylasen verschiedener Hersteller

Die Ermittlung der Breite der Substrattoleranz gliedert sich in zwei Aufgabenfelder:

- Strukturelle Variation der Acylkomponente
- Strukturelle Variation der Aminokomponente

Aus der strukturellen Variation der Acylkomponente ergeben sich die Anforderungen, welche für eine Bindung in der Enzymuntertasche nötig sind, und jene Faktoren, die den Erkennungsprozeß negativ beeinflussen. Die Kristallstruktur der GA aus *Pseudomonas diminuta* KAC-1 identifiziert die Glutaryl-Bindetasche dieses Proteins als eine lochartige Vertiefung [76],[79]. Im Falle einer weitgehenden Übereinstimmung der Tertiärstruktur dieses Enzyms und der von *Roche* produzierten GA sollte die Modifikation einzelner Glieder der Glutarylkette mit unterschiedlichen Substituenten oder der Ersatz durch Heteroatome einen starken Effekt auf die Enzymaktivität haben.

Die Untersuchung der strukturellen Variationsbreite der Aminokomponente ergibt Aufschluß über die Verwendbarkeit der GA in präparativ-synthetischen Reaktionen. Dabei berücksichtigt werden eine Vielzahl von Faktoren, wie etwa die absolute Konfiguration bei chiralen Edukten, aromatische oder aliphatische Substituenten, die Polarität und Größe der Aminokomponente oder ihrer Unterstrukturen, sowie der Einfluß weiterer Funktionalitäten in der Aminokomponente.

Neben der qualitativen Untersuchung der enzymatischen Aktivität und Selektivität ist deren Quantifizierung von zentraler Bedeutung für die Ermittlung des präparativ-synthetischen Potentials der GA. Die Etablierung analytischer Verfahren zur Bestimmung von Umsatz und Enantioselektivität der GA-katalysierten Reaktionen stellt aufgrund der Ambivalenz von Edukt und Produkten und den physiko-chemischen Eigenschaften der Glutarsäure eine besondere Herausforderung dar. Diese ergibt sich aus der Vorgabe, die Zielinformation direkt aus dem untersuchten System ohne signifikante Veränderung, wie etwa einer Derivatisierung, zu gewinnen. Die an der Umsetzung beteiligten Komponenten stellen in ihrer Funktionalität komplementäre Carbonsäuren und Amine dar, welche zur Ausbildung von Ionenpaaren tendieren, die im Rahmen einer Analyse separiert werden müssen. Glutarsäure als Dicarbonsäure beteiligt sich im wäßrigen

## II. Zielsetzung

---

Medium an komplexen Protonierungsgleichgewichten und verfügt zudem über keine ausreichend gut detektierbaren Chromophore.

Der Einfluß des Reaktionsmediums auf enzymatische Umsetzungen läßt sich grob auf zwei Faktoren reduzieren. Zum Einen ist dies der pH-Wert, der den Ionisationsstatus des Enzyms bestimmt und zum Anderen der Effekt, den organische Lösungsmittel auf das Reaktionssystem ausüben. Trotz des im Vergleich eher hydrophilen Charakters des Glutarylrestes kann bei bestimmten Substraten wegen ihrer begrenzten Löslichkeit im rein wäßrigen Medium die Verwendung von Kosolventien nicht völlig vermieden werden. Beide Faktoren bestimmen maßgeblich die Aktivität und Selektivität der enzymatischen Umsetzung.

Neben der Aufklärung der Substrattoleranz, der Aktivität und Selektivität der GA ist der Vergleich der Glutaryl-Acylasen verschiedener Hersteller ein weiterer interessanter Aspekt bei der Ermittlung des präparativ-synthetischen Potentials dieser Enzymklasse. Am Beispiel verschiedener Formen der PGA [31],[46] und verschiedenen kommerziell erhältlichen *Pseudomonas cepacia*-Lipasen [121] zeigt sich, daß Enzyme gleicher „Funktionalität“, aber unterschiedlichen Ursprungs stark voneinander abweichende Eigenschaften aufweisen können. Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. S. Riva vom ICRM Milano sollten daher auch vergleichende Studien an den industriell genutzten Glutaryl-Acylasen von *Roche* und der *Recordati S.p.A.* durchgeführt werden.

### **III. Allgemeiner Teil**

#### **III.1. Aufklärung der Substrattoleranz**

Als Hydrolase katalysiert Glutaryl-Acylase die Hydrolyse bzw. Knüpfung von Amidbindungen. Technische Verwendung findet sie in der Produktion von 7-Aminocephalosporansäure aus Glutaryl-7-amidocephalosporansäure. Da die tatsächliche biologische Funktion der Cephalosporin- bzw. Glutaryl-Acylasen bis dato noch ungeklärt ist, kann eine Untersuchung der Bandbreite der akzeptierten Substrate möglicherweise Hinweise auf jene Stoffwechselvorgänge liefern, an denen diese Enzyme beteiligt sind. Der struktur-verwandten Penicillin G-Acylase wird beispielsweise eine Rolle in der Metabolisierung von Molekülen mit aromatischen Funktionen als Kohlenstofflieferanten zugeschrieben [77],[122]. Glutarsäure tritt andererseits intermediär bei der bakteriellen Metabolisierung von Pyridin auf [123].

Die Erkundung der Substrattoleranz beinhaltet zwei Teilaspekte, zum einen die Aufklärung der strukturellen Variationsbreite des Acylrestes, zum anderen die der Aminokomponente..

##### **III.1.1. Variation des Acylrestes**

###### **III.1.1.1. Bestimmung eines geeigneten Assay-Systems**

Die qualitative Detektion der Hydrolyseaktivität von Glutaryl-Acylase erfordert ein geeignetes Testsystem. Hierfür kann auf kontinuierliche oder diskontinuierliche Methoden zurückgegriffen werden. Letztere erfordern Probenahmen und anschließende Derivatisierung der während der Hydrolyse gebildeten Produkte [124]-[126]. Kontinuierliche Methoden beruhen in der Regel auf der hydrolytischen Freisetzung und spektrometrischen Detektion von Chromogenen. Aus Screening-Experimenten zur Identifikation von Mikroorganismen mit GA-Aktivität sind bereits geeignete Substrat-Systeme bekannt, welche eine qualitative und quantitative Aktivitätsbestimmung ermöglichen [108]. Diese beruhen auf kolorimetrischen Verfahren, einschließlich der Fluoreszenz [127]-[129].

Beispielsweise findet *p*-Nitroanilin (**19**) (PNA) zur Aktivitätsbestimmung von  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase Verwendung. In *N*-acylierter Form weist es in Lösung ein Absorptionsmaximum bei ca. 315 nm auf, im sichtbaren Spektrum wird kaum Absorption beobachtet. Freies *p*-Nitroanilin bildet dagegen gelbe Lösungen und absorbiert sehr stark zwischen 350 und 420 nm. Das verwendete Substrat 5-Glutamyl-*p*-nitroanilid (**20**) ist in wenigen Reaktionsschritten aus dem entsprechenden Anilin und *N*-geschütztem Glutaminsäureanhydrid (**21**) zugänglich [130],[131].

Die fluoreszenzaktive Verbindung 7-Amino-4-methylcumarin (**22**) (AMC) findet in verschiedenen

### III. Allgemeiner Teil

---

Assay-Systemen [132] Verwendung, u.a. zur Detektion von PGA-Aktivität [128],[129]. In Methanol beträgt die Anregungswellenlänge 351 nm, die Emission erfolgt bei 430 nm; in wäßrigen Assay-Systemen liegen diese Werte bei 365-383 und 440-455 nm. *N*-Acylierte Derivate von AMC weisen keine nennenswerten Fluoreszenzeigenschaften auf.

Trotz der fluoreszenzbedingten wesentlich geringeren Nachweisgrenze von AMC (22), wurde im Folgenden auf PNA (19) als Standard-Chromophor für die qualitative Bestimmung der Hydrolyseaktivität zurückgegriffen. Zum Einen läßt sich die Freisetzung von PNA (19) leicht dünnschichtchromatographisch nachweisen, zum Anderen ist AMC (22) um den Faktor 2400 teurer und bedarf eines Fluoreszenzspektrophotometers für quantitative Messungen.

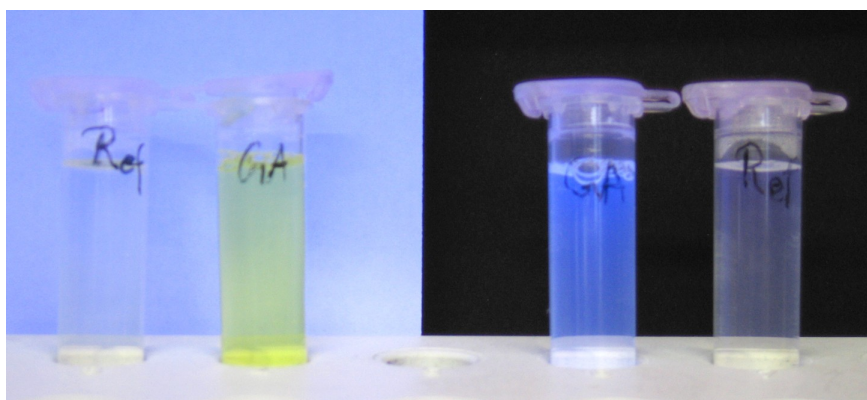


Abb. 20. Hydrolyse von GI-PNA und GI-AMC

#### III.1.1.2. Synthese von Amiden

Zur Knüpfung von Amidbindungen steht eine Vielzahl von chemisch-synthetischen Methoden zur Verfügung. Nach *Dieckmann* kann die Synthese von Amiden direkt aus den entsprechenden Säuren und Aminen durch Kondensation in Gegenwart von Lewisäuren wie Zinkchlorid bei 160-180°C erfolgen [133]. Eine Alternative hierzu ist die destillative Entfernung des Wassers als Azeotrop. Jedoch bedingt dies relativ lange Reaktionszeiten und immer noch vergleichsweise hohe Temperaturen.

Die Verwendung eines mehrfachen Überschuß an Carbonsäureestern als Acyldonoren zur Amidsynthese führt wegen der besseren Abgangsgruppeneigenschaften von Alkoholaten im allgemeinen zu einer Steigerung der Ausbeute. Am leichtesten reagieren acylierte Phenole und *N*-Hydroxysuccinimidester, wogegen einfache Alkylester wenig reaktiv sind [48]. Die Aminolyse von Carbonsäureestern verläuft im allgemeinen basenkatalysiert [134], wobei ein zweites Molekül Amin, Hydroxid oder Wasser als Base fungiert, und kann durch Cyanid-Katalyse unter schonenden Bedingungen bewerkstelligt werden [135]. Unter sauren Bedingungen ist eine Aminolyse von

Estern ebenfalls möglich [136]. Protonendonoren beschleunigen sowohl in basischen wie sauren Medien die Loslösung der Abgangsgruppe [137].

Die Acylierung von Aminen unter Verwendung von Carbonsäureamiden ist eine Austauschreaktion, welche meist mit dem Ammoniumsalz des zu acylierenden Amins erfolgt [138],[139]. Der Austausch kann in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am Stickstoff zwei mechanistisch konkurrierenden Pfaden folgen, dem „Isocyanat“- oder Eliminierungs-Additions-Mechanismus, bzw. dem Carbonyl-Additions-Mechanismus [140]. Breitere Anwendung findet diese Methode zur Synthese von *N*-alkylierten Harnstoffen, die als Herbizide Verwendung finden.

Unter besonders milden Bedingungen können Amide durch Zuhilfenahme von *N,N'*-bisubstituierten Carbodiimiden synthetisiert werden [141]. Die umzusetzende Carbonsäure wird durch Bildung ihres Isoharnstoffesters gegenüber Nucleophilen aktiviert. Dieser reagiert entweder direkt mit dem zu kuppelnden Amin oder mit einem weiteren Molekül Carbonsäure unter Ausbildung des entsprechenden Anhydrids, welches nachfolgend mit dem Amin abreagiert. Treibende Kraft der Reaktionssequenz ist die formale Addition von Wasser an das Carbodiimid, welche zum *N,N'*-disubstituierten Harnstoff führt. Neben dem klassischen Dicyclohexylcarbodiimid (**23**) (DCC) haben sich eine Vielzahl weiterer Carbodiimid-Kupplungsreagenzien etabliert, weil die vollständige Abtrennung des *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs oft sehr aufwendig ist.

Eine Aktivierung von Carbonsäuren ist ebenfalls durch ihre Überführung in Acyloxyborane, Thio- oder Silylester möglich [142],[143].

Standardmäßig wird die Acylierung von Aminen jedoch mit Carbonsäurechloriden oder Anhydriden in Gegenwart von Hilfsbasen durchgeführt. Chlorid und Carboxylate sind sehr gute Abgangsgruppen, weshalb die entsprechenden Acylierungen in der Regel mit hohen Ausbeuten verlaufen. Die zugesetzten Basen fangen zum einen freigesetzten Chlorwasserstoff bzw. die entsprechende Carbonsäure ab, zum anderen katalysieren sie die Aufweitung der Bindung zwischen Carbonylkohlenstoff und Abgangsgruppe.

Die besondere Herausforderung der Synthese der Monoamiden von  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren liegt in der selektiven Umsetzung nur einer der Carboxylfunktionen bzw. deren Derivate. Der Acyldonor kann im Rahmen chemischer Synthesen zwar in hohem Überschuß eingesetzt werden, um unter den jeweils gegebenen Bedingungen eine Reaktion beider Carboxylfunktionen/derivate eines Moleküls statistisch zu minimieren, jedoch ist dies wenig vorteilhaft für die Reaktionsökonomie und erfordert gegebenenfalls die aufwendige Abtrennung der Überschußkomponente. Besonders bei den reaktiveren Carbonsäurederivaten läßt sich zudem die Bildung von Diamiden nicht vollständig unterdrücken.

### III. Allgemeiner Teil

---

Zur gezielten Monoumsetzung von  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren muß eine der Carboxylfunktionen bzw. deren Derivate in eine weniger reaktive Form überführt werden. Für gesättigte Homologe mit einer Kettenlänge von 4-6 Kohlenstoffatomen ist dies in einfacher Form durch die Verwendung der cyclischen Anhydride möglich, welche bequem zugänglich sind. Eine allgemeine Strategie stellt die selektive Hydrolyse der entsprechenden Diester bzw. die gezielte Monoveresterung einer der beiden Carboxylfunktionen dar. Beispielsweise sind die Monomethylester der gesättigten Dicarbonsäuren von 2-12 Kohlenstoffatomen Kettenlänge durch Umesterung einer äquimolaren Mischung von Säure und dem entsprechenden Dimethylester gut zugänglich.

Neben der gezielten chemischen Synthese durch Hydrolyse oder Veresterung bieten sich auch enzymatische Verfahren zur Herstellung von Dicarbonsäuremonoestern an. So akzeptiert etwa Schweineleberesterase (PLE) ein breites Spektrum von Dicarbonsäurederivaten und setzt diese regioselektiv um. Auch einige Lipasen, wie CAL-B, Amano PS oder Chirazyme L-1 und Proteasen wie Chymotrypsin katalysieren die selektive Umsetzung von Diestern [144]-[147]. Diese Methodik ist besonders hilfreich, wenn das Kohlenstoffrückgrat ein oder mehrere stereogene Zentren aufweist. Sie ermöglicht so etwa die quantitative Desymmetrisierung von Weinsäureestern oder von prochiralen 3-substituierten Glutarsäuren, die Vorstufen verschiedener pharmazeutischer Wirkstoffe sind [148]-[151]. Für den Fall daß die Aminokomponente vom Enzym als Acylakzeptor erkannt wird, sind die entsprechenden Amide mit dieser Methodik gegebenenfalls sogar direkt zugänglich. Die freigesetzte Carboxylfunktion kann dann weiter zum entsprechenden Amid umgesetzt werden, etwa durch Überführung in das jeweilige Acylchlorid oder durch Umsetzung mit einem Kupplungsreagenz.

Für die Amidsynthesen im Rahmen dieser Arbeit wurde weitestgehend auf die cyclischen Anhydride als Acyldonoren zurückgegriffen, da mit ihnen die Zielstrukturen meist in nur einem Reaktionsschritt zugänglich und eine Aufarbeitung der Reaktion mit einfachen Methoden wie Extraktion und Umkristallisation durchführbar sind.

Im Falle der  $C_4$ - $C_6$ -Monocarbonsäuren wurden diese als das entsprechende Acylchlorid in die Reaktionssequenz eingesetzt. Als Hilfsbase fand überwiegend Triethylamin Verwendung, da es sich durch saure Extraktion gut abtrennen läßt und die gebildeten Triethylammoniumsalze sich in bestimmten Reaktionsmedien direkt als Feststoff abscheiden.

#### **III.1.1.3. Synthese cyclischer Dicarbonsäureanhydride**

Die Synthese der kommerziell verfügbaren cyclischen Anhydride von  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren erfolgte durch Dehydratisierung unter Ringschluß. Die Wahl des wasserentziehenden Agens ist dabei von

der chemischen Struktur der zu cyclisierenden Säure abhängig. Acetanhydrid als kostengünstigstes Dehydrierungsreagenz eignet sich besonders zur Cyclisierung von thermisch stabilen Dicarbonsäuren, wie Bernstein-, Glutar- und Adipinsäure (**24**) [152] oder zur Synthese von Anhydriden, welche sich aus dem Reaktionsmedium leicht isolieren lassen [153],[130]. In Anlehnung an die Amidsynthese können die Anhydride von Derivaten der Glutarsäure (**25**) auch durch Dehydratisierung mit DCC (**23**) gewonnen werden. Durch einen intramolekularen Angriff, gefolgt von der Ausbildung eines Sechsrings, ist diese Reaktion besonders vorteilhaft und führt in hohen Ausbeuten zu den Zielprodukten [150].

Während Bernstein- und Glutarsäure durch Dehydratisierung mit Acetanhydrid direkt in die cyclischen Anhydride übergehen, erfolgt bei Adipinsäure (**24**) zunächst eine Polymerisierung zum linearen Polyanhydrid. Aus diesem kann das Monomer (**26**) durch Pyrolyse und destillative Abtrennung im Hochvakuum in Ausbeuten von 57-67% erhalten werden [152].

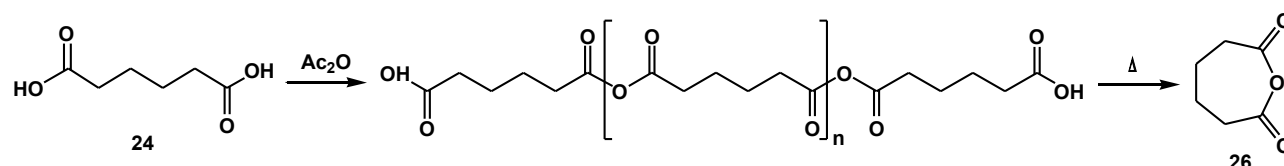


Abb. 21. Synthese von Adipinsäureanhydrid

In Übereinstimmung mit den Literaturwerten konnte Adipinsäureanhydrid in 59% Ausbeute als Feststoff isoliert werden.

Das Anhydrid der Acetondicarbonsäure (**27**) kann durch Behandeln mit Acetanhydrid bei niedrigen Temperaturen erhalten werden. Es entsteht jedoch nur als Zwischenprodukt aus der Tricarbonylverbindung, da wegen der hohen CH-Acidität der  $\alpha$ - und  $\alpha'$ -Methylengruppen mit fortschreitendem Reaktionsverlauf eine Acylierung dieser Positionen erfolgt, welche zum 3-Acetyl- und 3,5-Diacetyl-tetrahydropyran-2,4,6-trion (**28**) führt. Abweichend von den Literaturangaben (57%) konnte Acetondicarbonsäureanhydrid (**29**) nur in einer Ausbeute von 42% isoliert werden [153].

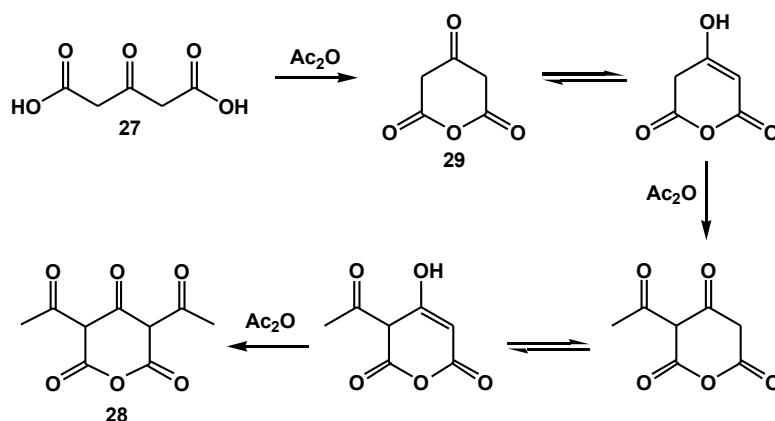


Abb. 22. Cyclisierung von Acetondicarbonsäure

Die Dehydratisierung von Glutaminsäure (30) zum entsprechenden Anhydrid ist aufgrund der Reaktivität der freien Aminofunktion nicht möglich, stattdessen werden Glutaminsäurepolymere erhalten. Über den Umweg einer Maskierung der Aminofunktion ist die Bildung des cyclischen Anhydrids jedoch möglich. Bei den meisten *N*-Acyl-Schutzgruppen, mit Ausnahme der Benzyloxycarbonyl-Gruppe, tritt im Verlauf der Dehydratisierung mit Acetanhydrid eine Racemisierung des stereogenen Zentrums an C-2 auf. Diese ist auf die Bildung eines fünfgliedrigen Oxazolons zurückzuführen, welches der Tautomerie unterliegt. Durch den Angriff der terminalen Carboxylfunktion wird das Oxazolone gespalten und es kommt zur Ausbildung des thermodynamisch günstigeren Endprodukts.

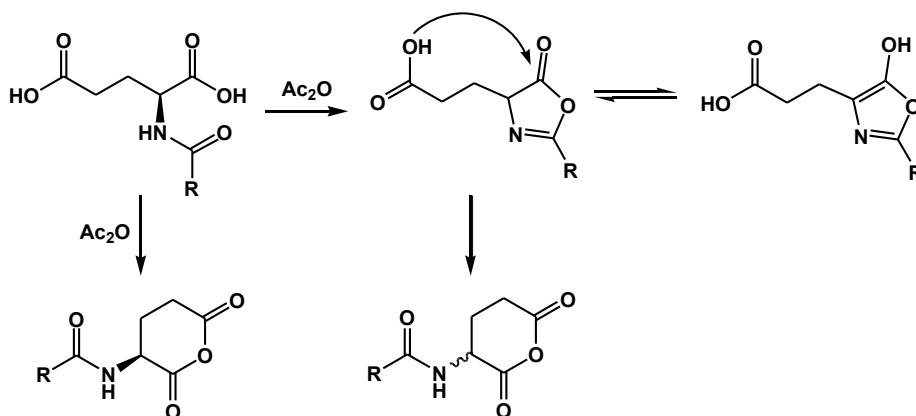
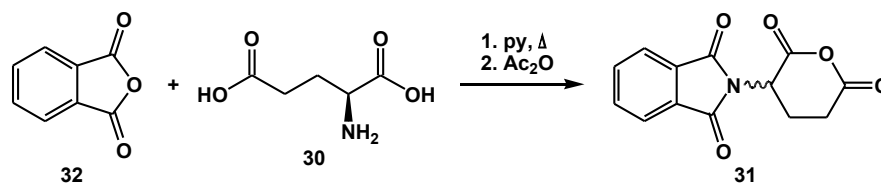


Abb. 23. Cyclisierung von *N*-Acyl-glutaminsäure

Das Anhydrid der Glutaminsäure konnte in Form der *N,N*-Phthaloyl-geschützten Verbindung (31) synthetisiert werden. Die Einführung der Schutzgruppe erfolgt durch Erhitzen von Phthalsäureanhydrid (32) und *L*-Glutaminsäure (30) in Pyridin als Lösungsmittel. Das Rohprodukt wird zur anschließenden Cyclisierung in Acetanhydrid aufgenommen und kurzzeitig unter Rückfluß erhitzt [130]. *N,N*-Phthaloyl-*DL*-Glutaminsäureanhydrid (31) konnte in gegenüber der Literatur (74%) leicht erhöhter Ausbeute von 81% isoliert werden.

Abb. 24. Synthese von *N,N*-Phthaloyl-glutaminsäureanhydrid

Versuche zur Cyclisierung von 3-Chlorglutarsäure (**33**) mit Acetanhydrid scheiterten zunächst. Aus der Umsetzung bei 0°C konnte nur Edukt isoliert werden, während kurzzeitiges Erhitzen zu einem undefinierten Produktgemisch führte. Als alternativer Zugang zum entsprechenden Anhydrid wurde die radikalische Chlorierung von Glutarsäureanhydrid (**34**) mit Sulfurylchlorid durchgeführt. Die in der Literatur beschriebene hochselektive Chlorierung in  $\beta$ -Position konnte nicht reproduziert werden [154]. Zwar enthielten die isolierten Produktgemische 3-Chlorglutarsäureanhydrid (**35**) als Hauptkomponente, jedoch konnte diese nicht von den unsymmetrischen und höherhalogenierten Nebenprodukten abgetrennt werden. Auch durch Variation der Reaktionsparameter Temperatur, Zeit, Lösungsmittel oder Radikalstarter konnte die Selektivität der Chlorierung nicht gesteigert werden.

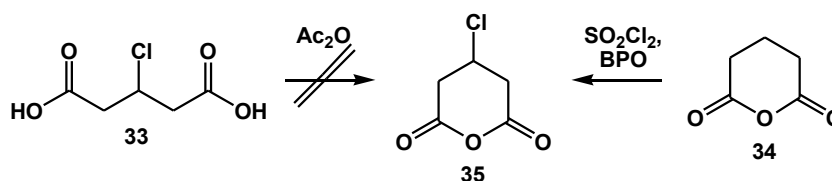


Abb. 25. Synthese von 3-Chlorglutarsäureanhydrid

In reiner Form konnte cyclisches 3-Chlorglutarsäureanhydrid (**35**) erst durch Dehydratisierung mit DCC (**23**) in Ethylacetat als Lösungsmittel bei 0°C in einer Ausbeute von 89% erhalten werden [150]. Der sich bildende Dicyclohexylharnstoff fällt aus der Reaktionslösung aus und kann leicht durch Filtration entfernt werden.

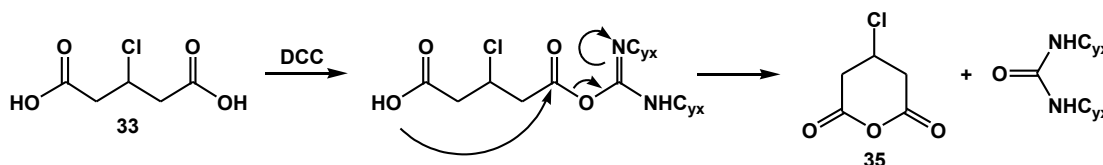


Abb.26. Alternative Synthese von 3-Chlorglutarsäureanhydrid

Nach dem selben Verfahren konnten durch DCC-vermittelte Cyclisierungen die Anhydride weiterer Glutarsäurederivate in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 3. Synthese von Glutarsäureanhydridderivaten

Dicarbonsäure	Struktur	Ausbeute an Anhydrid [%]	Dicarbonsäure	Struktur	Ausbeute an Anhydrid [%]
Diglykolsäure		99	3-Benzylglutarsäure		83
Thiodiglykolsäure		95	3-Propylglutarsäure		51
2,4-Dimethylglutarsäure		99	3-Butylglutarsäure		82
2,2-Dimethylglutarsäure		91	3-Phenylglutarsäure		99
3-Isobutylglutarsäure		86	/	/	/

#### III.1.1.4. Synthese von 3-substituierten Glutarsäuren

Je nach Art des Substituenten bieten sich verschiedene Routen zur Synthese 3-substituierter Glutarsäuren. Zum einen sind diese durch Modifikationen vorhandener 1,5-Dicarbonsäuren zugänglich, zum anderen durch *de novo* Synthese der substituierten Glutarsäure.

Durch thermisch initiierte radikalische Chlorierung mit Sulfurylchlorid wurde zunächst 3-Chlorglutarsäure (**33**) in einer Ausbeute von 43% (Lit. 35%) gewonnen [155].

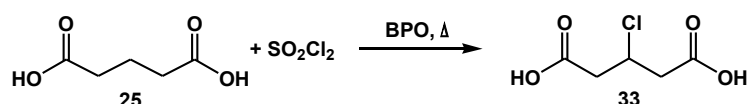


Abb. 27. Selektive Chlorierung von Glutarsäure

Durch alkalische Hydrolyse gelangt man von der 3-Chlor- zur 3-Hydroxyglutarsäure, welche allerdings auch aus Acetondicarbonsäure über Reduktion der Ketofunktion mittels Natriumamalgam zugänglich ist [156]. Da eine anschließende Derivatisierung der erzeugten Hydroxylgruppe durch die freien Carboxylfunktionen eventuell negativ beeinflusst wird, erfolgte die Synthese der 3-Hydroxyglutarsäure in Form ihres Dimethylesters (**45**). Dieser wurde mit einer Gesamtausbeute von 73% (Lit. 83%) aus Acetondicarbonsäuredimethylester (**46**) durch Reduktion mit Natriumborhydrid gewonnen [148]. Die entsprechende Acetoxyverbindung (**47**) wurde mit Acetanhydrid in Pyridin in 56% Ausbeute (Lit. 86%) erzeugt.

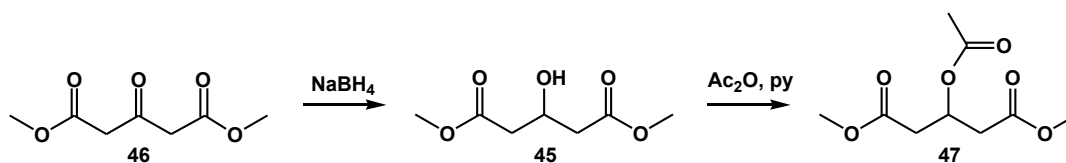


Abb. 28. Synthese von 3-Hydroxyglutarsäuredimethylester

Die Herstellung von 3-alkylierten Glutarsäuren ist durch direkte Alkylierung oder Modifikation von entsprechenden  $\beta$ -derivatisierten 1,5-Dicarbonsäuren nicht möglich.

Bei der Umsetzung aliphatischer Aldehyde mit Malonsäure nach *Knoevenagel* und thermischer Decarboxylierung entstehen 3-Alkyl-1,5-dicarbonsäuren als Nebenprodukte. Die Aldoladdition und anschließende Kondensation führt zur Ausbildung eines Michael-Systems, an welches sich ein weiteres Molekül der CH-aciden Komponente addieren kann [157].

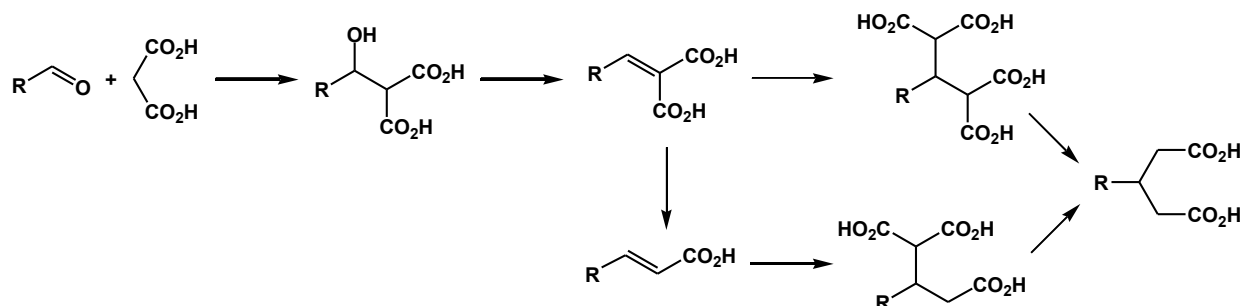


Abb. 29. Knoevenagel-Reaktion

Durch eine Erhöhung der CH-Acidität der Methylenkomponente wird eine doppelte Steigerung der Reaktivität bewirkt, zum einen bezüglich der nucleophilen Addition, zum anderen wächst auch der Akzeptorcharakter des *Michael*-Systems. So führt die Umsetzung aliphatischer Aldehyde mit zwei Äquivalenten Cyanacetamid unter Basenkatalyse zur Ausbildung von 3-Alkyl-2,4-dicyanoglutarsäurediamiden, welche durch saure Hydrolyse in die entsprechenden 3-Alkylglutarsäuren überführt werden können [158]-[161].

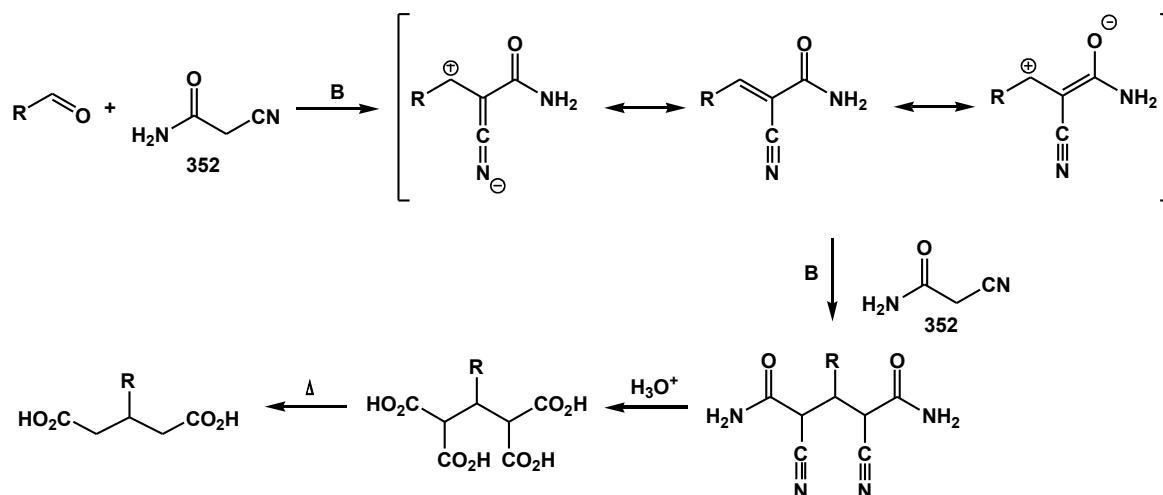
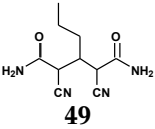
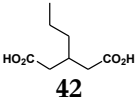
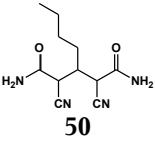
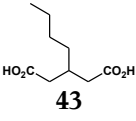
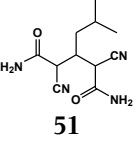
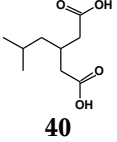
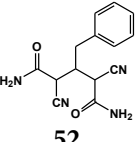
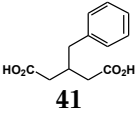


Abb.30. Gekoppelte Aldol- / Michael-Reaktion

### III. Allgemeiner Teil

Ausgehend von Butyraldehyd, Valeraldehyd, *iso*-Valeraldehyd und Phenylacetaldehyd konnten die jeweiligen 3-substituierten 2,4-Dicyan-glutardiamide in befriedigenden bis guten Ausbeuten erhalten werden. Die Aldehyde wurden unter kräftigem Rühren zu einer gesättigten Lösung von Cyanacetamid (352) gegeben und die Reaktionssequenz durch Zugabe von Kaliumhydroxid gestartet. Die Rohprodukte fallen als Wachs oder viskoser Sirup an und wurden vor der Weiterverarbeitung massenspektrometrisch identifiziert. Hydrolyse und Decarboxylierung zum Endprodukt wurden durch mehrstündiges Erhitzen in konzentrierter Salzsäure erreicht. Die erzielten Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt.

Tab. 4. Synthese von 3-Alkylglutarsäuren

Aldehyd	3-Alkyl-2,4-dicyan-glutarsäurediamid	Ausbeute [%]	Dicarbonsäure	Ausbeute [%]
Butyraldehyd	 49	55	 42	83
Valeraldehyd	 50	69	 43	86
<i>iso</i> -Valeraldehyd	 51	71	 40	91
Phenylacetaldehyd (322)	 52	73	 41	92

#### III.1.1.5. Synthese von Stickstoffanaloga der Glutarsäure

Durch Austausch von Kohlenstoffatomen der Hauptkette von Glutarsäure und deren Derivaten mit Stickstoff gelangt man zu den entsprechenden Isosteren. Aufgrund der ungeklärten natürlichen Funktion der Glutaryl-Acylasen stellt die Synthese und Umsetzung von Stickstoffanaloga der Glutarsäure einen interessanten Beitrag zur Aufklärung der Substratspezifität dieser Enzymfamilie dar. So tritt *N*-Carbamoyl- $\beta$ -alanin (53) u.a. als Intermediat im Katabolismus von Pyrimidinen auf [162].

Die Carbamoylierung von Aminofunktionen wird durch einfaches Zusammengeben der Aminokomponente und Kaliumcyanat und Erhitzen in Wasser, sowie anschließende Einstellung

eines sauren pH-Wertes von 3.0 erreicht. Aus dem Cyanat bildet sich *in situ* die korrespondierende Säure, an welche sich das Amin nucleophil addiert. Aus dem entstandenen Zwitterion bildet sich durch tautomere Umlagerung die *N*-Carbamoyl-Verbindung aus [163],[164].

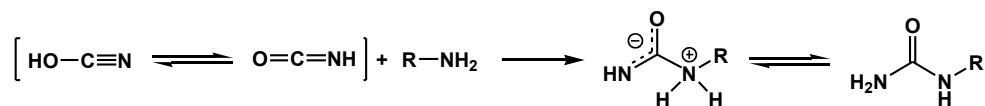


Abb. 31. Carbamoylierung von Aminen

Die Carbamoylierung von  $\beta$ -Alanin (**54**),  $\beta$ -Aminobuttersäure (**55**) und  $\beta$ -Phenylalanin (**56**) verlief in durchweg guten Ausbeuten von 73%, 76% und 83%. Die Produktisolierung erfolgte durch partielles Einengen der Reaktionslösung.

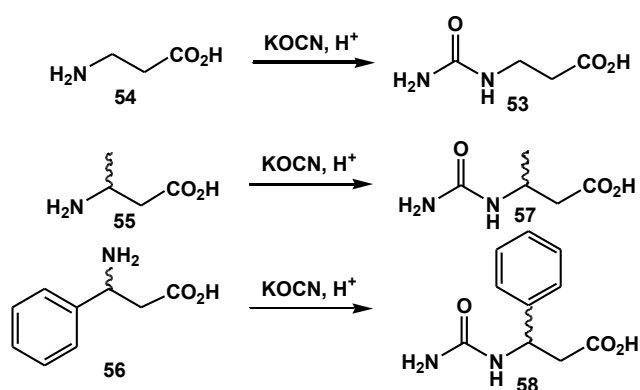


Abb. 32. Synthese *N*-Carbamoyl- $\beta$ -Aminosäuren

Der Austausch eines Carboxylkohlenstoffs der Glutarsäure gegen Stickstoff führt zur isoelektronischen 4-Nitrobuttersäure [165]. Diese ist aus 4-Brombuttersäureethylester (**59**) zugänglich. Eine direkte Substitution mit Silbernitrit [166] liefert jedoch Gemische aus *O*- und *N*-alkylierten Verbindungen, die nur mit erheblichem Aufwand voneinander getrennt werden können. Durch den Austausch des Brom- gegen einen Azidsubstituenten und zwei weitere Reaktionsschritte ist die Nitroverbindung (**60**) jedoch in isomerenreiner Form erhältlich. Die Azidoverbindung (**61**) wird zunächst in einer Staudingerreaktion mit Triphenylphosphan zum Phosphanimin (**62**) umgesetzt, welches nach Behandlung mit drei Äquivalenten Ozon zum Ethylester der gewünschten Nitroverbindung (**60**) zerfällt [167].

### III. Allgemeiner Teil

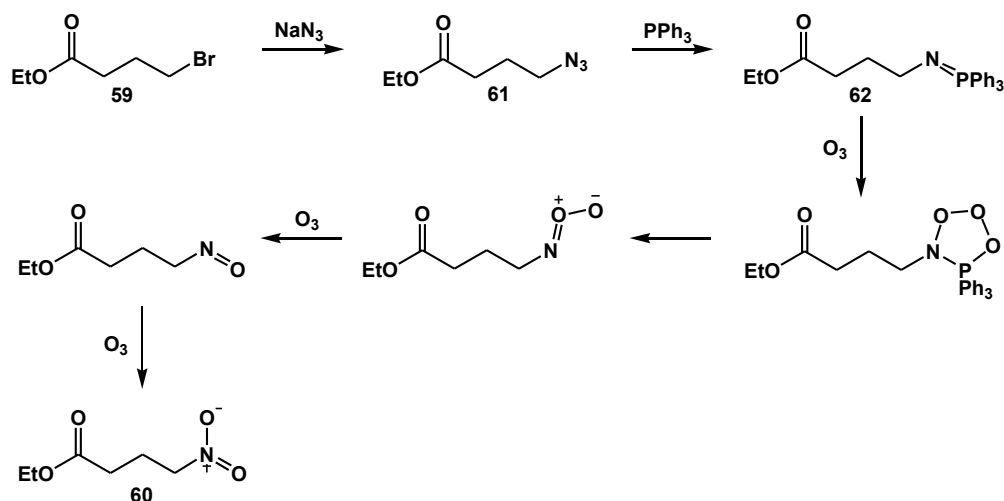


Abb. 33. Synthese 4-Nitrobuttersäureethylester

Die Substitution zum 4-Azidobuttersäureethylester (**61**) lieferte 84% Ausbeute. Die nachfolgende Staudingerreaktion zum Phospanimin (**62**) verlief unter lebhafter Stickstoffentwicklung; die Reaktionslösung wurde anschließend ohne Aufarbeitung der Ozonolyse unterworfen. Der Ethylester der Nitrobuttersäure konnte so in einer Ausbeute von 56% isoliert werden.

#### III.1.1.6. Synthese von *N*-Acyl-*p*-Nitroaniliden

Die Synthese der *N*-Acyl-*p*-nitroanilide der Monocarbonsäuren erfolgte durch Umsetzung des entsprechenden Carbonsäurechlorids mit *p*-Nitroanilin (**19**). Der freigesetzte Chlorwasserstoff wurde mit Triethylamin abgefangen. Die Amide der Butter-, Valerian- und Capronsäure konnten in guten bis sehr guten Ausbeuten isoliert werden. Das Chlorid der 4-Nitrobuttersäure wurde durch Verseifung des 4-Nitrobuttersäureethylesters (**60**) und anschließende Umsetzung mit Thionylchlorid / DMF gewonnen und ohne Aufarbeitung mit *p*-Nitroanilin (**19**) umgesetzt.

Die Monoanilide der  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren sind durch Reaktion der jeweiligen cyclischen Anhydride mit *p*-Nitroanilin (**19**) und mehrstündiges Erhitzen unter Rückfluß erhältlich. Im Falle der unsymmetrischen Anhydride der 2,2-Dimethylglutarsäure und der *N,N*-Phthaloylglutaminsäure (**31**) wurden mit hoher Regioselektivität von circa 95:5 und 98:2 jeweils bevorzugt die  $\omega$ -Anilide gebildet. Die Bestimmung des Regioisomerenverhältnisses erfolgte anhand der Signalintensitäten in den entsprechenden <sup>13</sup>C-NMR-Spektren. Behandlung des *N,N*-Phthaloylglutaminsäure-nitroanilids (**63**) mit Hydrazin lieferte freies Glutamoyl-nitroanilid (**20**). Die isolierten Ausbeuten variieren mit der Art der Substitution der Acylkomponente und der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Tendenziell steigen mit abnehmender Komplexität der Substitution die isolierten Ausbeuten; gleiches gilt für die Aufarbeitung durch Umkristallisation gegenüber der Extraktion. Im Fall der

Iminodiessigsäure (**64**) wurde diese zunächst in ihr Hydrochlorid überführt, um die Kupplung der sekundären Aminofunktion zu unterbinden. Nach der Cyclisierung mit DCC (**23**) wurde das Reaktionsgemisch ohne Isolierung des Anhydrids mit *p*-Nitroanilin (**19**) versetzt.

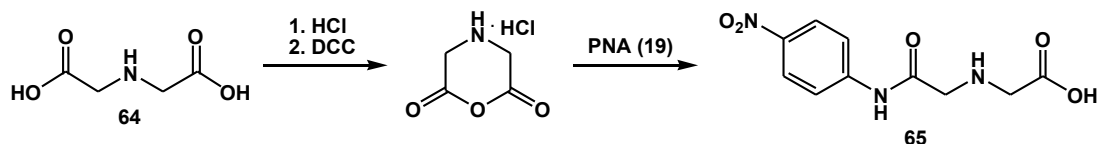
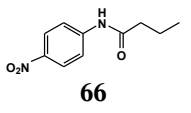
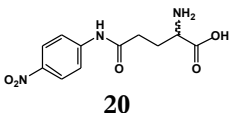
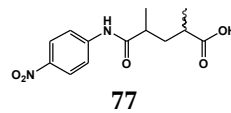
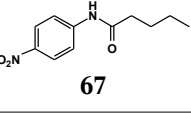
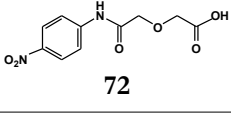
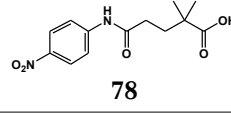
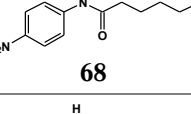
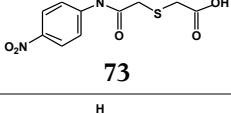
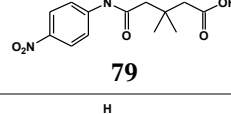
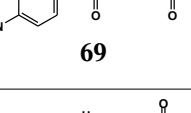
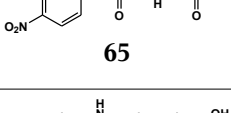
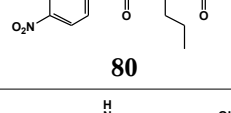
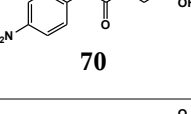
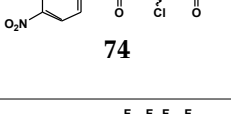
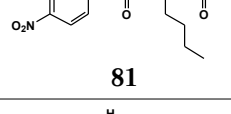
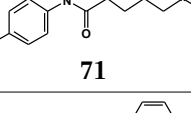
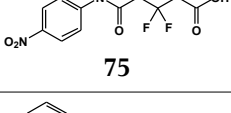
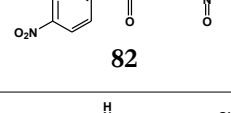
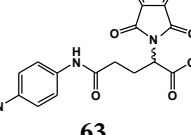
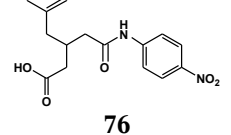
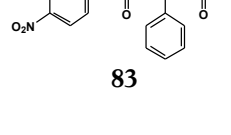


Abb. 34. Kupplung von Iminodiessigsäure und *p*-Nitroanilin

Tab. 5. Synthese von *N*-Acyl-*p*-Nitroaniliden

<i>p</i> -Nitroanilid	Ausbeute [%]	<i>p</i> -Nitroanilid	Ausbeute [%]	<i>p</i> -Nitroanilid	Ausbeute [%]
	81		49		80
	78		91		83
	83		68		85
	89		37		31
	68		79		27
	93		quantitativ		19
	70		63		61

### III.1.1.7. Zusammenfassende Betrachtung

Die Synthese von Dicarbonsäuremonoamiden und einiger Carbonsäureamide erfolgte auf unterschiedlichen Wegen. Während die Synthese der *N*-Acyl-*p*-nitroanilide im Allgemeinen mit guten bis sehr guten Ausbeuten verlief, war die Herstellung der nicht kommerziell verfügbaren

### III. Allgemeiner Teil

---

Dicarbonsäuren und ihrer jeweiligen Anhydride in vielfältiger Hinsicht eine Herausforderung. Die Cyclisierung der  $\alpha,\omega$ -terminalen Carboxylfunktionen zum Anhydrid gelang nur in wenigen Fällen durch Dehydratisierung mit Acetanhydrid als dem preisgünstigsten Reagenz. Nachteilig an dieser Methode waren vor allem die meist harschen Reaktionsbedingungen und die im Fall der L-Glutaminsäure (**30**) auftretende Racemisierung [130]. Die Cyclisierung mit DCC (**23**) erfolgte dagegen unter milden Bedingungen mit meist sehr hohen Ausbeuten, wenn auch die Aufreinigung durch Umkristallisieren und vollständiges Abtrennen des gebildeten Dicyclohexylharnstoffs vor allem bei den 3-alkylsubstituierten Glutarsäureanhydriden schwierig war.

Die Synthese 3-substituierter Glutarsäuren durch eine Aldol/Michael-Tandem-Reaktion erfolgte in meist guten Ausbeuten. Die Aufreinigung und Charakterisierung der primär gebildeten 3-substituierten 2,4-Dicyan-glutardiamide gelang nicht in allen Fällen zufriedenstellend. Im Ausblick auf ihre Anwendbarkeit auf cyclische und unsymmetrische Ketone [160] stellt diese Reaktion aber eine interessante Option zur Synthese von 3,3-disubstituierten Glutarsäurederivaten dar.

Die Synthese von aliphatischen Nitroverbindungen durch Ozonolyse entsprechender Azide ist, wie am Beispiel des 4-Nitrobuttersäureethylesters (**60**) gezeigt, eine sinnvolle Alternative zur Nitritsubstitution, welche starken sterischen und elektronischen Einschränkungen unterliegt.


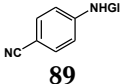
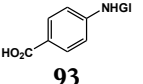
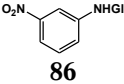
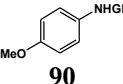
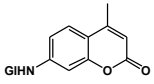
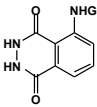
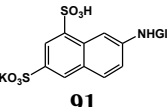
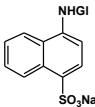



#### III.1.2. Variation der Aminokomponente

Die wenig ausgeprägten Enzym-Substrat-Wechselwirkungen in der Amin-Untereinheit der Enzymtasche der Glutaryl-Acylase aus *Pseudomonas diminuta* KAC-1 [79] legt die Vermutung nahe, daß Glutaryl-Acylasen eine ähnliche breite Substrattoleranz bezüglich der Aminokomponente aufweisen könnten, wie die strukturell verwandten Penicillin G-Acylasen. Zur Evaluierung der Breite der Substrattoleranz erfolgte die Synthese einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher Glutarylmonoamide sowie einiger Glutarylmonoester für spätere Experimente zu Hydrolyseversuchen mit der GA.

##### III.1.2.1. Synthese von aromatischen Glutarylmonoamiden

Analog der Herstellung von N-Glutaryl-p-nitroanilid erfolgte die Synthese der aromatischen Glutarylamide durch Umsetzung des Anilinderivats mit einem leichten Überschuß (1.05-1.5 Äquivalente) an Glutarsäureanhydrid unter Erhitzen auf Rückfluß. Die Anwesenheit einer Säurefunktion im Falle der 4-Aminobenzoessäure, der 4-Aminonaphthalinsulfonsäure und der 7-Amino-naphthalin-1,3-disulfonsäure (**84**) verringerte die erzielten Ausbeuten erheblich, während die übrigen Amide gut zugänglich sind.

Tab. 6. Synthese aromatischer Glutarylaminiden

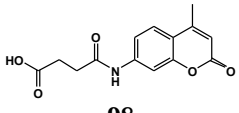
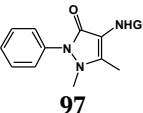
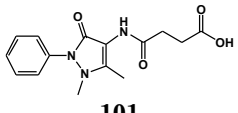
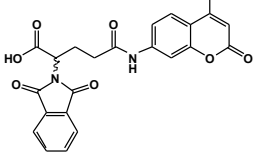
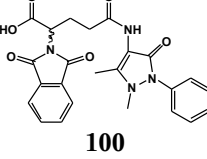
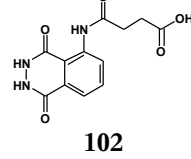
Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]
 85	84	 89	61	 93	42
 86	83	 90	72	 94	88
 87	70	 91	37	 95	34
 88	81	 92	78	 96	83

GI : Glutarylrest

III.1.2.2. Synthese weiterer aromatischer  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuremonoamide

Neben Glutarylaminiden von 7-Amino-4-methylcoumarin (**94**), Ampyron (**97**) und Luminol (**87**) wurden auch die entsprechenden Succinyl- und *N,N*-Phthaloyl-glutamyl-amide synthetisiert, um diese später mit der GA zu testen. Die Synthese aus den cyclischen Anhydriden erfolgt analog III.1.2.1..

Tab. 7. Synthese acylierter Aminoaromaten

Acylamid	Ausbeute [%]	Acylamid	Ausbeute [%]	Acylamid	Ausbeute [%]
 98	63	 97	77	 101	68
 99	58	 100	73	 102	65

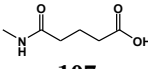
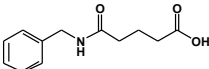
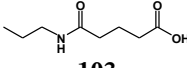
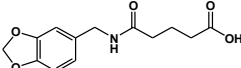
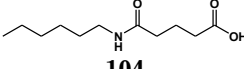
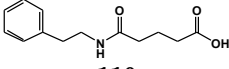
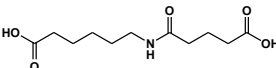
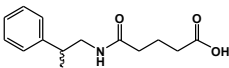
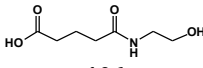
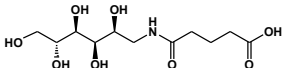
## III.1.2.3. Synthese terminaler primärer aliphatischer Glutarylmonoamide

Zur Synthese der Glutarylamide von endständigen primären aliphatischen Aminen wurden abhängig vom Substitutionsmuster und der Verfügbarkeit der Aminokomponente unterschiedliche Reaktionsbedingungen gewählt.

### III. Allgemeiner Teil

In der Reihe der einfachen *n*-Alkylamine wurden Propyl- und Hexylamin durch Erhitzen mit Glutarsäureanhydrid in Dioxan in hohen Ausbeuten von 87% und 85% in die entsprechenden Monoamide (**103,104**) überführt. In gleicher Weise wurden die Amide der  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (**105**) und Ethanolamin (**106**) mit 58% und 34% Ausbeute synthetisiert. Das unter Normalbedingungen gasförmige Methylamin lag als 40%ige Lösung in Ethanol vor und wurde, um die konkurrierende Alkoholyse zu minimieren, im doppelten Molverhältnis bei 0°C mit Glutarsäureanhydrid zur Reaktion gebracht. Die isolierte Ausbeute liegt mit 42% relativ niedrig, was auf Verluste bei der extraktiven Aufarbeitung zurückzuführen ist. Die Acylierung von Benzylamin, Piperonylamin, 2-Phenylethylamin und 2-Amino-1-phenylethanol erfolgten in Gegenwart von 1.1 Äquivalenten Triethylamin wobei letztere bei -18°C durchgeführt wurde, um die konkurrierende *O*-Acylierung zu unterdrücken. Die entsprechenden Amide (**108-111**) wurden in sehr guten Ausbeuten erhalten (s. Tab. 8). D-Glucamin wurde ebenfalls in der Kälte mit 82% in das entsprechenden Glutarylamid (**112**) überführt.

Tab. 8. Synthese terminaler aliphatischer Glutarylamide

Glutaryl-Amid	Ausbeute [%]	Glutaryl-Amid	Ausbeute [%]
 <b>107</b>	42	 <b>108</b>	94
 <b>103</b>	87	 <b>109</b>	91
 <b>104</b>	85	 <b>110</b>	80
 <b>105</b>	58	 <b>111</b>	97
 <b>106</b>	34	 <b>112</b>	82

Die Aminokomponenten 2-(2-Aminoethyl)-1,3-dioxolan (**113**), DL- (**114**) und D-4-Aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (**115**) waren durch Azidsubstitution [168] und anschließende Reduktion mit Natriumsulfid-Nonahydrat aus dem entsprechenden Bromid (**116**) bzw. Tosylestem [169]-[171] von Solketal (**117**) zugänglich.

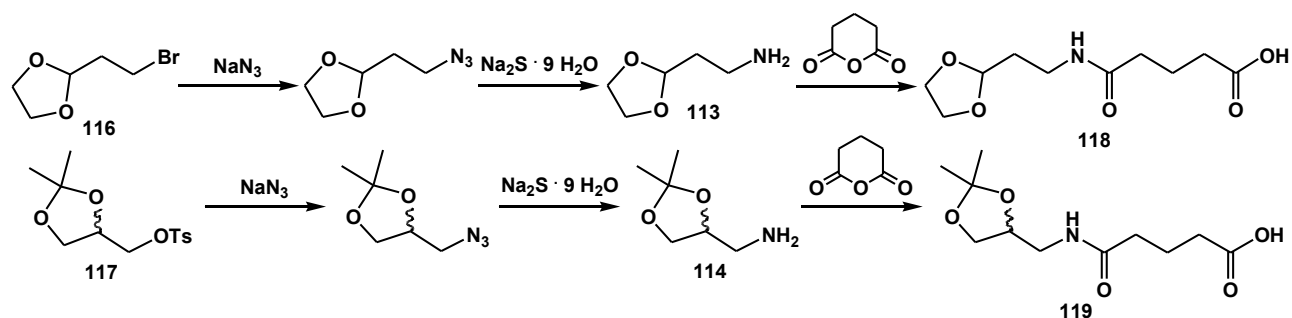
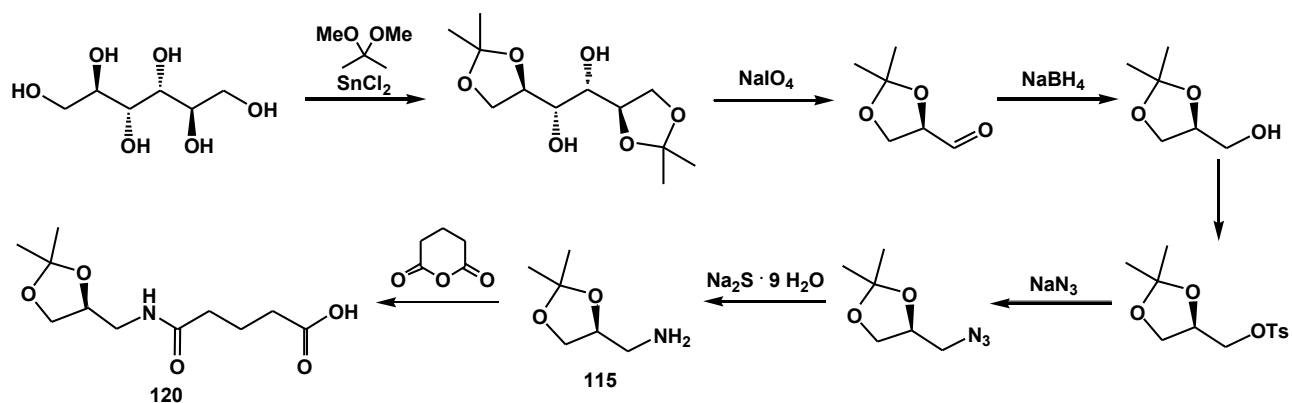


Abb. 35. Synthese von Dioxolanderivaten

Die jeweiligen Glutarylamide (**118-120**) werden in 47%, 55% und 34% Ausbeute erhalten.

Abb. 36. Synthese von *N*-Glutaryl-D-4-Aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan

Aus *N*-Glutaryl-DL-4-Aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (**119**) wurde die Isopropylidenschutzgruppe durch saure Hydrolyse quantitativ abgespalten.

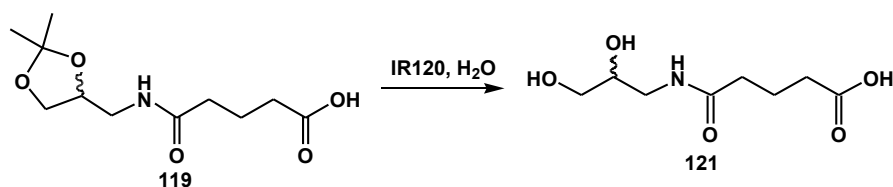


Abb. 37. Hydrolyse des Isopropylidenacetals

Die Acylierung von D-4-Aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (**120**) mit *N,N*-Phthaloylglutaminsäureanhydrid (**31**) unter Erhitzen führte in 90% Ausbeute zum entsprechenden diastereomeren Amid (**122**). Die Regioselektivität der Acylierung wurde aus den <sup>13</sup>C-NMR-Spektren zu 9:1 für das 4'-*N,N*-Phthaloyl-Regioisomer bestimmt.

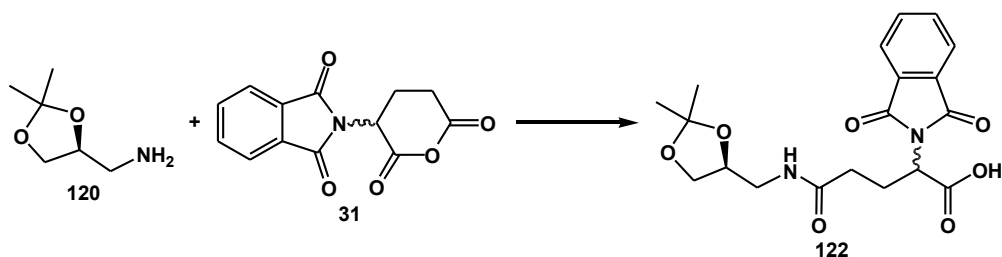


Abb. 38. Acylierung D-4-Aminomethylen-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan

Der Versuch der Synthese des Glutarylamides von 1-Amino-2-propyl-benzylether aus Propylenoxid (**123**) war nicht erfolgreich, da unter den Bedingungen der *Williamson*'schen Ethersynthese die *N,N*-Phthaloylschutzgruppe abgespalten wird. Bezüglich der Addition an die Kohlenstoffatome 1 oder 2 von Propylenoxid beträgt die Regioselektivität der Phthalimidalkylierung nach *Gabriel* [172] 94:6, ermittelt aus den Intensitäten der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale.

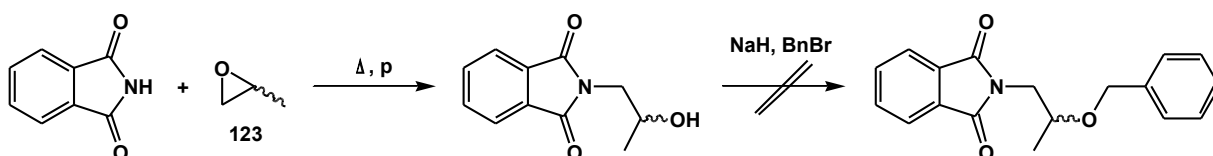


Abb. 39. Phthalimidalkylierung nach *Gabriel*

#### III.1.2.4. Synthese nicht-terminaler primärer aliphatischer Glutarylmonoamide

Die Acylierung von nicht endständigen primären Aminen erfolgt in der Regel in Gegenwart eines geringen Überschusses von Triethylamin, nur bei einzelnen Aminoalkoholen wurde auf den Zusatz der Hilfsbase verzichtet, da die Produkte eine separate Phase ausbilden und somit leicht abtrennbar sind. Die isolierte Ausbeute des Amids von Ammediol (**124**) beträgt 42%.

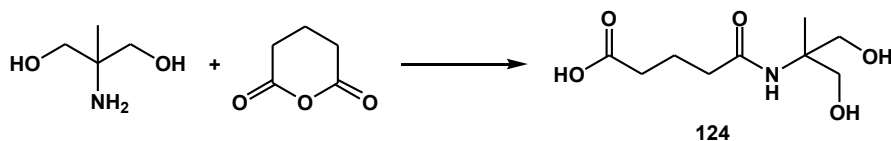


Abb. 40. Acylierung von Ammediol

Liegen neben der Amino- noch aliphatische Hydroxylfunktionen vor, wurde die Acylierung in der Kälte durchgeführt. Die Glutarylamide von L-(+)-*threo*-2-Amino-1-phenyl-1,3-propanediol (**125**), ( $\pm$ )-2-Aminobutanol (**126**) und 2-Amino-4-phenyl-3-butenol (**127**) werden in Ausbeuten von 81%, 33% und 63% erhalten.

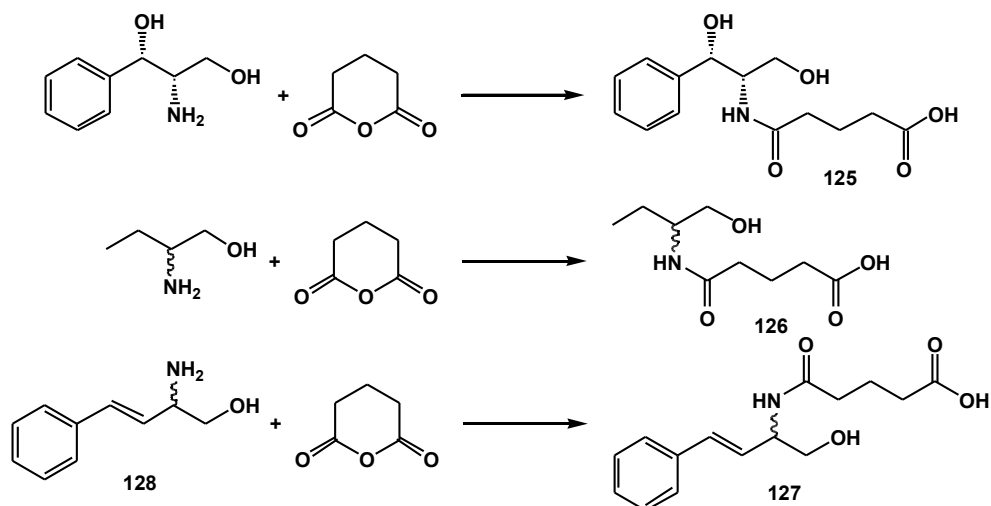


Abb. 41. Acylierung von Aminoalkoholen

Die Synthese von 2-Amino-4-phenyl-3-butenol (**128**) erfolgt ausgehend von *trans*-Zimtaldehyd (**129**) durch Homologisierung mit einem Schwefelylid zum entsprechenden Oxiran (**130**) [173], das mit Natriumazid regioselektiv zum 2-Azido-4-phenyl-3-butenol (**131**) geöffnet und abschließend nach *Staudinger* zum Amin (**128**) reduziert wird [174]. Da die chromatographische Abtrennung des gebildeten Triphenylphosphanoxids aufwendig und mit Ausbeuteverlusten behaftet ist, wurde als Alternative zum letzten Reaktionsschritt die Reduktion mit Wasserstoff und Lindlar-Katalysator durchgeführt. Diese führt quantitativ und ohne Verlust der Kohlenstoffdoppelbindung zum  $\alpha$ -Aminoalkohol.

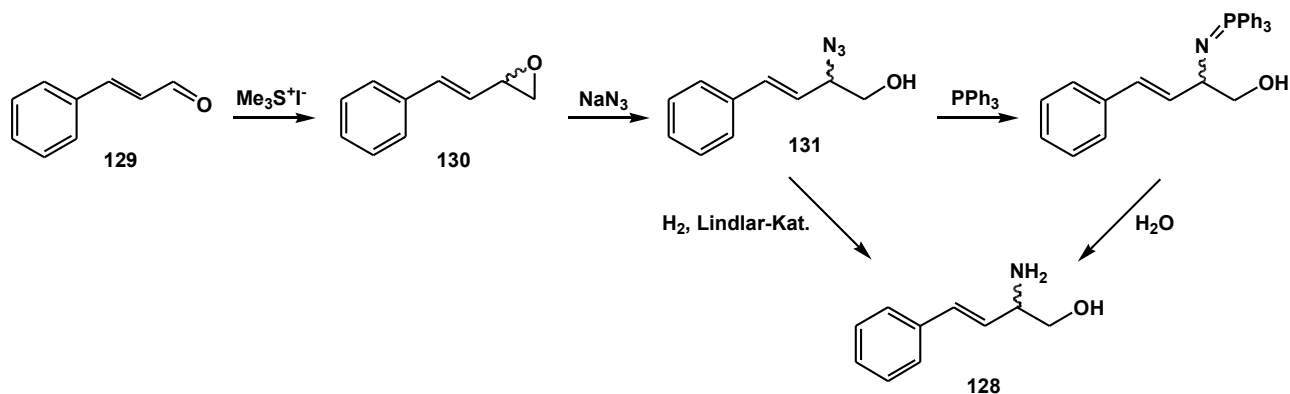


Abb. 42. Synthese von 2-Amino-4-phenyl-3-butenol

Die Synthese 1-substituierter 2-Aminopropane erfolgte basenkatalysiert durch die der Aldol-Reaktion verwandte *Henry*-Reaktion, Kondensation nach dem zum konjugierten Nitroolefin und anschließende Reduktion [175],[176]. Die Umsetzung aromatischer Aldehyde mit Nitroethan führt ausschließlich zu *E*-konfigurierten 1-Aryl-2-nitroalkenen. Das entsprechende *Z*-Isomer konnte kernresonanzspektroskopisch nicht identifiziert werden [177].

### III. Allgemeiner Teil

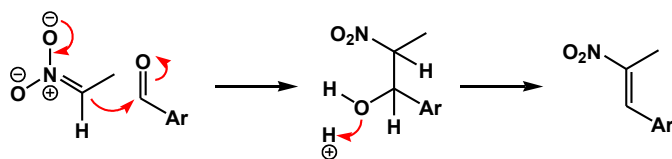
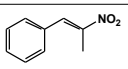
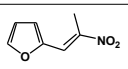
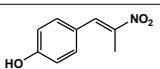
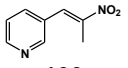
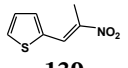
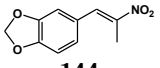
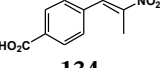
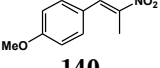
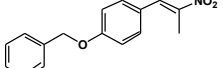
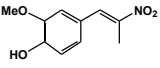
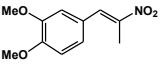
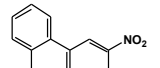
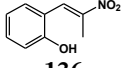
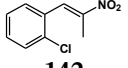
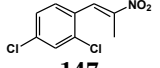
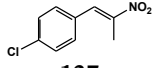


Abb. 43. Henry-Reaktion mit aromatischen Aldehyden

Im Fall der *para*-substituierten Benzaldehyde kristallisierten die entsprechenden *E*-1-Aryl-2-nitropropene sogar direkt aus der Reaktionsmischung.

Tab. 9. Synthese der 1-Aryl-2-nitropropene

1-Aryl-2-nitropropen	Ausbeute [%]	1-Aryl-2-nitropropen	Ausbeute [%]	1-Aryl-2-nitropropen	Ausbeute [%]
 132	55	 138	61	 143	54
 133	51	 139	70	 144	68
 134	50	 140	81	 145	79
 135	26	 141	73	 146	48
 136	74	 142	54	 147	75
 137	69	/	/	/	/

Die Reduktion der *E*-1-Aryl-2-Nitropropene mit zwei Moläquivalenten Lithiumaluminiumhydrid (LAH) führt in sehr guten Ausbeuten zu den entsprechenden 1-Aryl-2-aminopropanen [178],[179]. Literaturbekannt sind ebenfalls Reduktionen mit Natriumborhydrid unter Lewisäurekatalyse und die katalytische Hydrierung mit Platindioxid, welche aber vermehrt zur Bildung von Nebenprodukten wie 1-Phenylaceton und 1-Phenylpropanol führen. Versuche zur katalytischen Hydrierung mit Palladium/Kohlenstoff oder Lindlar-Katalysator führten dagegen nicht zum Zielprodukt.

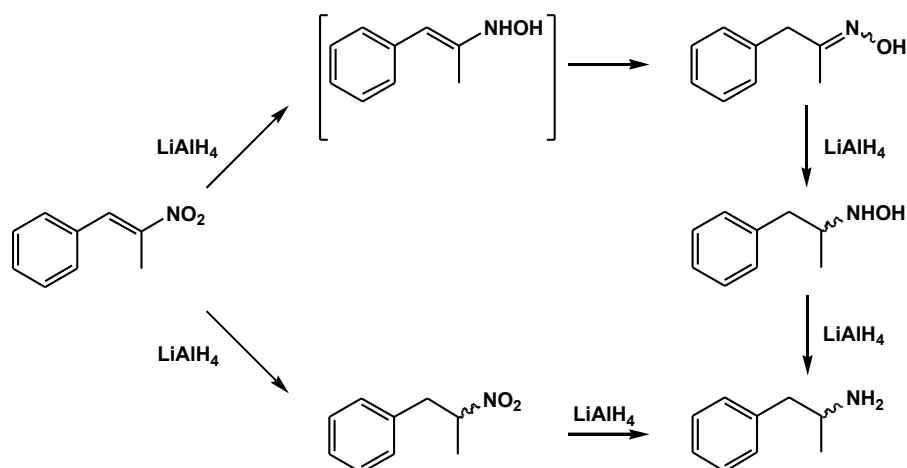
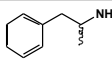
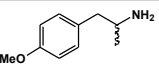
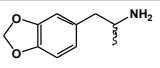
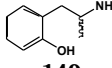
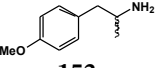
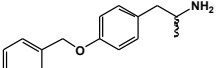
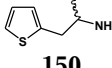
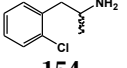
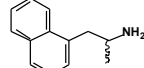
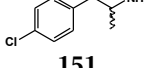


Abb. 44. LAH-Reduktion von Nitropropenen

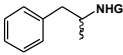
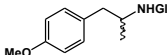
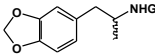
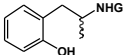
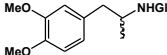
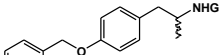
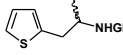
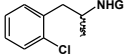
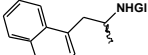
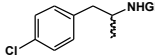
Tab. 10. Synthese der 1-Aryl-2-aminopropane

1-Aryl-2-aminopropan	Ausbeute [%]	1-Aryl-2-aminopropan	Ausbeute [%]	1-Aryl-2-aminopropan	Ausbeute [%]
 148	88	 152	98	 155	99
 149	62	 153	98	 156	89
 150	91	 154	74	 157	88
 151	91	/	/	/	/

Die Acylierung zu den entsprechenden *N*-Glutaryl-1-phenylpropan-2-amiden erfolgt mit Glutarsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin in guten bis sehr guten Ausbeuten.

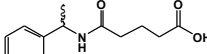
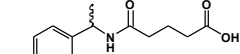
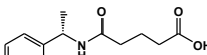
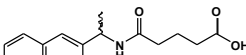
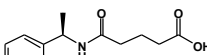
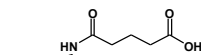
### III. Allgemeiner Teil

Tab. 11. Acylierung der 1-Aryl-2-aminopropane

Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]
 <b>158</b>	96	 <b>162</b>	77	 <b>165</b>	93
 <b>159</b>	53	 <b>163</b>	97	 <b>166</b>	95
 <b>160</b>	91	 <b>164</b>	74	 <b>167</b>	94
 <b>161</b>	91	/	/	/	/

Die Acylierung von  $\alpha$ -Aryl-ethylaminen mit Glutarsäureanhydrid liefert die entsprechenden Amide ebenfalls in sehr guten Ausbeuten.

Tab. 12. Synthese acylierter Benzylamine

Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]
 <b>168</b>	91	 <b>171</b>	88
 <b>169</b>	92	 <b>172</b>	95
 <b>170</b>	94	 <b>173</b>	93

$\alpha$ -Aryl-ethylamine sind aus den entsprechenden Acetyl aromaten über die Reduktion der jeweiligen Oxime zugänglich. Gleiches gilt für das 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butyamin (**174**). Während bei den meisten  $\alpha$ -Arylethanonen in der Hitze die ausschließliche Bildung des *E*-Oxims erfolgt, lag das *E/Z*-Isomerenverhältnis beim 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanoxim (**175**) bei 7:3 und beim 2-Acetylthiophenoxim (**176**) bei 4:1 [180],[181].

Die katalytische Reduktion der erhaltenen Oxime mit Palladium und Wasserstoff führt im Fall der heterocyclischen Verbindungen allerdings nicht zu den Zielprodukten. Während das Pyridinderivat (**177**) durch Überhydrierung des Aromaten zersetzt wurde [182],[183], desaktiviert die Thienylverbindung (**176**) den Metallkatalysator; auch die Verwendung von Platin als Hydrierkatalysator führte hier nicht zum Ziel.

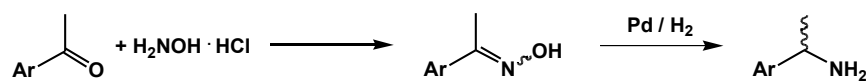
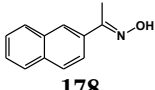
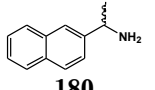
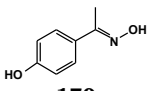
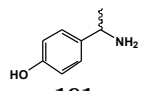
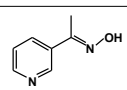
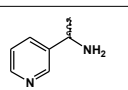
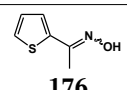
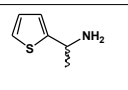
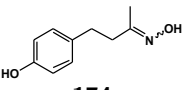
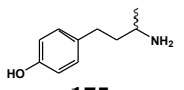


Abb. 45. Reduktive Aminierung von Arylketonen

Tab. 13. Reduktive Aminierung von Carbonylverbindungen

Oxim	Ausbeute [%]	Amin	Ausbeute [%]
 178	75	 180	66
 179	93	 181	quantitativ
 177	quantitativ	 182	Zersetzung
 176	93	 183	Keine Reaktion
 174	82	 175	quantitativ

Primäre Amine mit alicyclischen Strukturelementen wurden ebenfalls in die jeweiligen Amide überführt. Die Glutarylamide von Cyclohexylamin (**182**) sowie von (*S*)- und (*R*)-1-Cyclohexylethylamin (**183,184**) wurden in Ausbeuten von 91%, 88% und 87% isoliert.

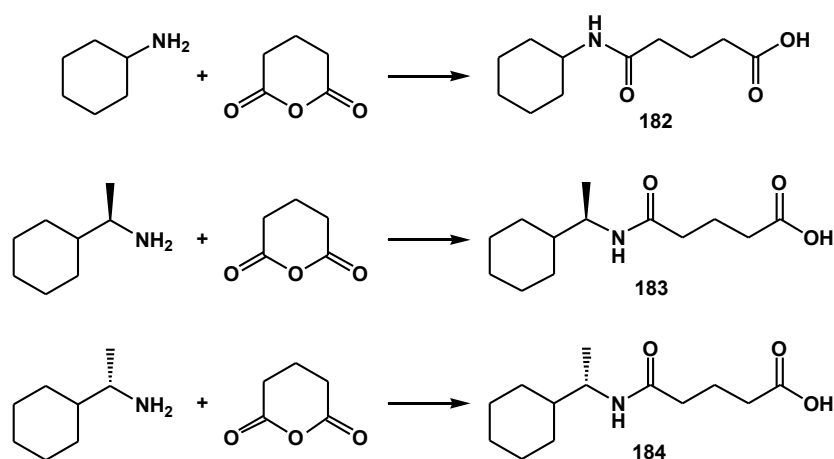


Abb. 46. Acylierung von von Aminen mit alicyclischen Strukturelementen

Das Glutarylamid von *D*-Glucosamin (**185**) wurde durch portionsweises Versetzen einer übersättigten Lösung des Aminozuckers in Methanol in 49% Ausbeute erhalten [184].

### III. Allgemeiner Teil

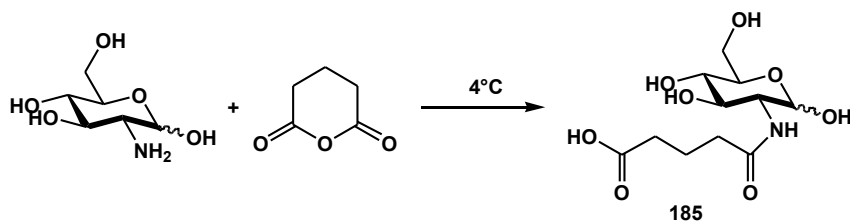


Abb. 47. Acylierung von D-Glucosamin

#### III.1.2.5. Synthese sekundärer Glutarylmonoamide

Zur Synthese sekundärer Glutarylamide wurden die entsprechenden Amine mit Glutarsäureanhydrid unter Rückfluß erhitzt. Nach der Aufarbeitung wurden die Zielprodukte in moderaten Ausbeuten erhalten.

Tab. 14. Synthese sekundärer Glutarylamide

Glutarylamid	Ausbeute [%]	Glutarylamid	Ausbeute [%]
 186	43	 189	38
 187	40	 190	38
 188	20	/	/

Die Herstellung monoacylierter Piperazine setzt die selektive Desaktivierung einer der beiden Aminofunktionen des Piperazins voraus. Dieses kann durch Monoprotonierung, entweder durch Einengen mit einem Äquivalent Chlorwasserstoff oder in Lösung bei pH 3.3 erfolgen [185]. Versuche zur Synthese von Piperidin-4-carbonsäureestern mit DCC-aktiviertem 4-Nitrobenzylalkohol (**191**) bzw. Methanol mit anschließender Acylierung waren nicht erfolgreich, da unter den Reaktionsbedingungen die *N*-Alkylierung des Piperidin-4-carbonsäureesters (**192**) erfolgt [186].

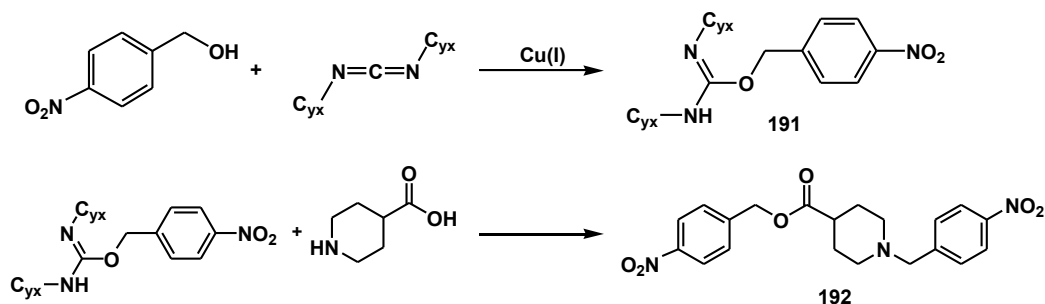


Abb. 48. Aktivierung von *p*-Nitrobenzylalkohol

### III.1.2.6. Synthese von *N*-Glutaryl-Aminosäurederivaten

Aminosäuren stellen die prominenteste Gruppe der natürlich vorkommenden Amine dar, wovon die  $\alpha$ -Aminosäuren den überwiegenden Teil stellen. Jedes Molekül verfügt über mindestens zwei funktionelle Gruppen, Amino- und Carboxylfunktion, die unterschiedlich weiter modifiziert werden können.

#### III.1.2.6.1. Synthese von $\beta$ -Aminosäurederivaten

Reges Forschungsinteresse wird aktuell den  $\beta$ -Aminosäuren entgegengebracht, da deren Einbau in Peptide aus  $\alpha$ -Aminosäuren die Sekundärstruktur oder Metabolisierbarkeit beeinflussen oder im Fall von  $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -aminosäuren bestimmten Übergangszuständen pathogener Enzyme ähneln und somit potentielle Inhibitoren darstellen [187]. Eine Vielzahl von asymmetrischen Synthesen führt direkt zu enantiomerenreinen  $\beta$ -Aminosäuren [188]. In ihrer einfachsten Variante erfolgt dabei die Homologisierung einer enantiomerenreinen  $\alpha$ -Aminosäure nach *Arndt-Eistert* durch Umsetzung des Carbonsäurechlorids mit Diazomethan zum Carben.

Eine strategisch anderer Ansatz beruht auf der Synthese des Aminosäureracemats und dessen anschließender Racematspaltung [189]-[191]. Die Synthese von racemischen  $\beta$ -Aryl- $\beta$ -aminosäuren ist in einfacher Weise durch die *Rodionow*-Variante der *Knoevenagel*-Reaktion möglich [192],[193]. Dabei wird ein Arylcarbaldehyd in Gegenwart einer Ammoniakquelle wie Ammoniumacetat mit Malonsäure umgesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist komplexer als von *Rodionow* ursprünglich beschrieben [194],[195] und das Verhältnis der Endprodukte  $\beta$ -Aryl- $\beta$ -aminosäure und Zimtsäure ist stark vom Substitutionsmuster des Aromaten, dem Lösungsmittel, der Reaktionszeit und -temperatur abhängig [196].

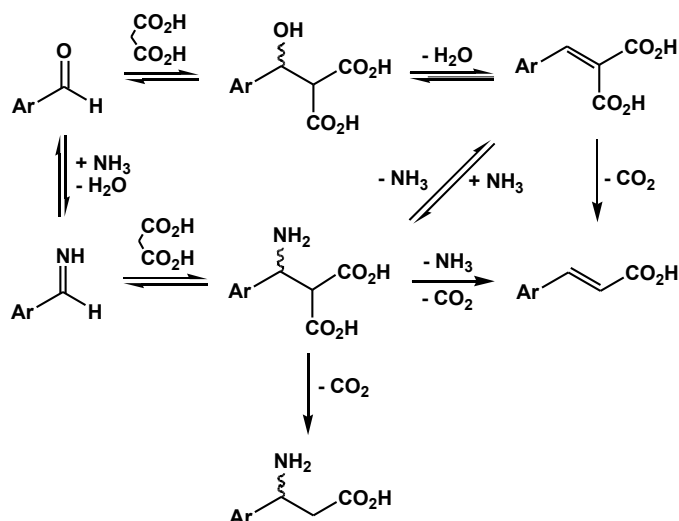


Abb. 49. Mechanismus der Rodionow-Reaktion

Lange Reaktionszeiten und hohe Reaktionstemperaturen begünstigen die Ausbildung des konjugierten Zimtsäuresystems durch Eliminierung. Eine Substitution des Aromaten mit Elektronendonoren favorisiert die Entstehung der Aminosäure. Ein hydrophober Charakter der Substituenten erhöht die Löslichkeit der Arylidenmalonsäure in weniger polaren Solventien und begünstigt damit ebenfalls die Ausbildung der Aryl-aminodicarbonsäure, welche durch Decarboxylierung in die  $\beta$ -Aminosäure übergeht.

Der Wechsel von Malonsäure zu deren Mononitril als Methylenkomponente führte wegen der stärkeren CH-Aktivierung ausschließlich zum Benzylidenkondensat (**193**).

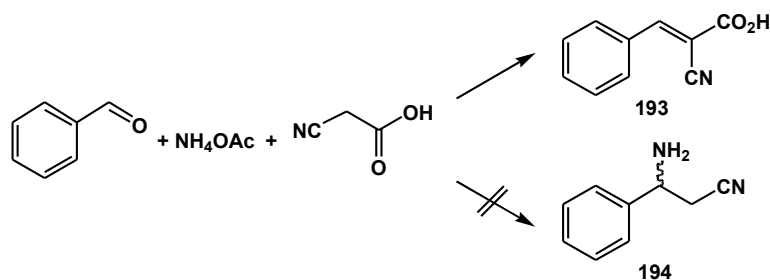
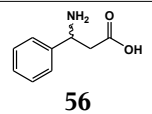
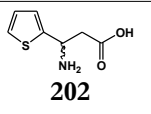
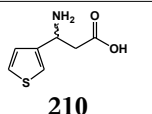
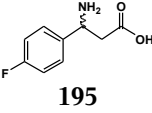
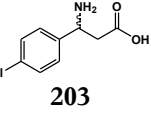
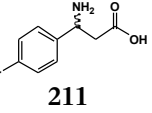
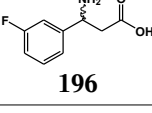
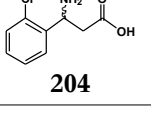
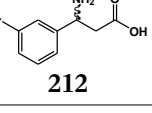
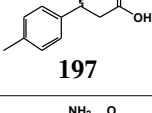
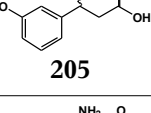
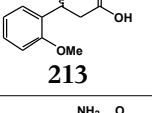
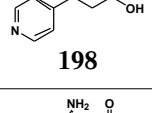
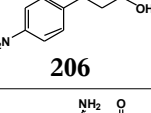
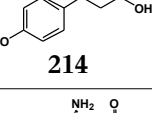
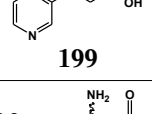
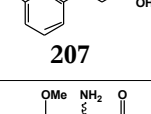
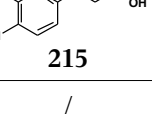
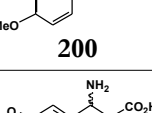
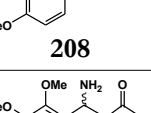
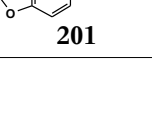
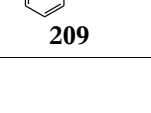


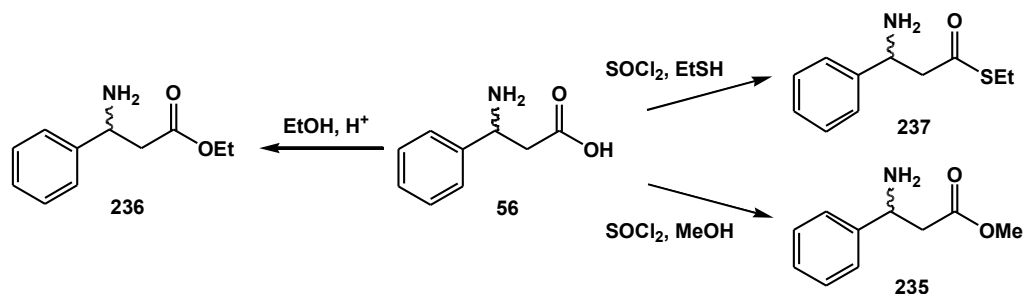
Abb. 50. Versuch der Rodionow-Reaktion mit Cyannessigsäure

Nach der beschriebenen Methodik konnte eine Reihe verschiedener 3-Aryl-3-aminosäuren in Ausbeuten von 21% bis 83% synthetisiert und in die entsprechenden *N*-Glutaryl-Derivate überführt werden. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 15. Synthese von  $\beta$ -Aminosäuren nach Rodionow

Aminosäure	Ausb. [%]	Gl-AS [%]	Aminosäure	Ausb. [%]	Gl-AS [%]	Aminosäure	Ausb. [%]	Gl-AS [%]
 56	75	(216) 97	 202	21	(223) 99	 210	28	(229) 94
 195	73	(217) 96	 203	83	(224) 81	 211	82	(230) 89
 196	57	(218) 97	 204	52	(225) 88	 212	76	/
 197	57	(219) 98	 205	50	/	 213	72	/
 198	50	(220) 93	 206	52	(226) 91	 214	78	(233) 95
 199	52	(221) 96	 207	56	(227) 94	 215	42	(234) 83
 200	44	(222) 98	 208	26	(228) 56	/	/	/
 201	26	/	 209	20	/	/	/	/

Die Veresterung von  $\beta$ -Phenylalanin lieferte in Ausbeuten von 95%, 69% und 88% den Methyl- (235), Ethyl- (236) und Ethylthioester (237).

Abb. 51. Veresterung von  $\beta$ -Phenylalanin

Der Methyl ester von 3-(2-Thienyl)-alanin (238) wurde durch Umsetzung mit Thionylchlorid/DMF und Methanol in 91% Ausbeute erhalten.

### III. Allgemeiner Teil

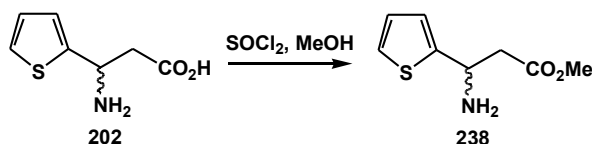


Abb. 52. Veresterung von  $\beta$ -(2-Thienyl)-alanin

Die *N*-Glutarylamide der  $\beta$ -Aminosäureester (239-242) wurden in sehr guten Ausbeuten durch Reaktion mit Glutarsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin erhalten.

Tab. 16. Synthese von *N*-Glutaryl- $\beta$ -Aminosäureester

<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäureester	Ausbeute [%]	<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäureester	Ausbeute [%]
	96		93
	95		87

Aus Alkenen sind  $\beta$ -Aminosäuren durch Umsetzung mit Chlorsulfonylisocyanat (CSI) zugänglich [197]. Bei der Umsetzung entstehen ein *N*-Chlorsulfonylcarbonsäureamid und durch [2+2]-Cycloaddition ein  $\beta$ -Lactam-*N*-sulfonylchlorid. Das Verhältnis der beiden Reaktionsprodukte ist vor allem von der Konstitution der Kohlenstoffdoppelbindung abhängig und wird nur wenig vom Reaktionsmedium und der Temperatur beeinflusst [198].

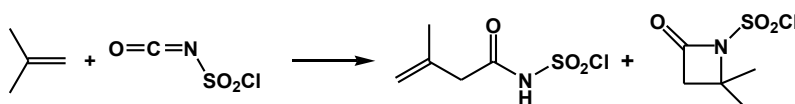
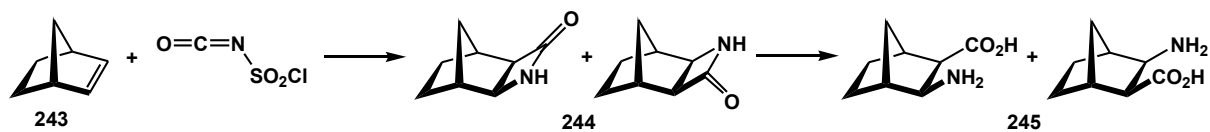


Abb. 53. Reaktion von *N*-Chlorsulfonylisocyanat mit Alkenen

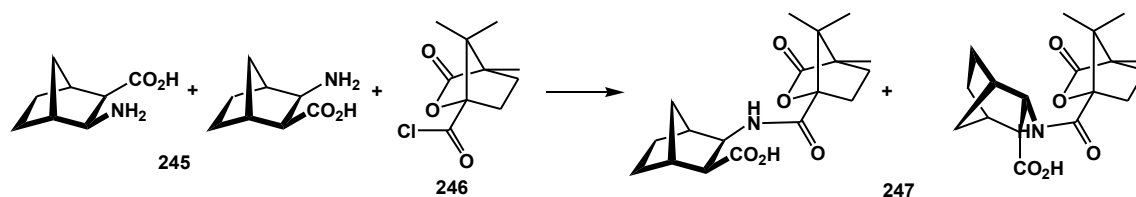
Die Cycloaddition erfolgt entsprechend der *Markownikow*-Regel durch Anlagerung des elektronenarmen Stickstoffs an das am höchsten substituierte Kohlenstoffatom der Doppelbindung. Die Geschwindigkeit der Cycloaddition an aliphatische Olefine verringert sich mit sinkender Substitution. Die Reaktivität nimmt in der Reihe geminal > aromatisch-konjugiert > vicinal > mono-substituiert ab [199]. Bicyclische Alkene nehmen eine Sonderstellung ein und entsprechen in ihrer Reaktivität etwa den geminal-substituierten Olefinen, die Addition von Chlorsulfonylisocyanat erfolgt dabei mit hoher Selektivität zum *exo*-Produkt [200].

Aus Norbornen (243) konnte durch Umsetzung mit CSI und vorsichtige Hydrolyse der *N*-Sulfonylchloride das racemische Norbornan  $\beta$ -lactam (244) nahezu quantitativ (97%) erhalten werden. Die anschließende Hydrolyse führte zu der entsprechenden *cis*- $\beta$ -Aminosäure (245) (96%)

[201].

Abb. 54. Synthese einer Norbornan- $\beta$ -aminosäure

Durch Derivatisierung mit (-)-Camphansäurechlorid (**246**) wurde kernresonanzspektroskopisch das Vorliegen nur eines Diastereomerenpaares (**247**) und damit die *exo*-Selektivität der Addition verifiziert.

Abb. 55. Derivatisierung der Norbornan- $\beta$ -aminosäure

Aus Inden (**248**) wurden analog durch Umsetzung mit CSI und anschließende Hydrolyse das racemische Indan-2-lactam (**249**) in guten Ausbeuten (63%) kristallin erhalten, und mittels saurer Methanolyse in den entsprechenden Aminosäuremethylester (**250**) überführt (94%) [202]. Die Bildung des regioisomeren Additionsproduktes Indan-1-lactam wurde nicht beobachtet.

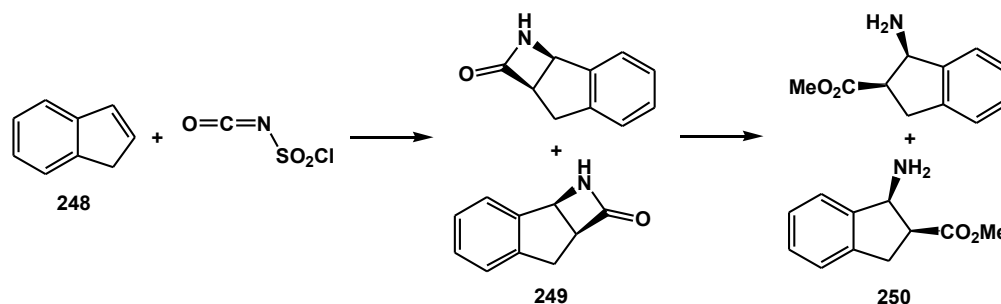
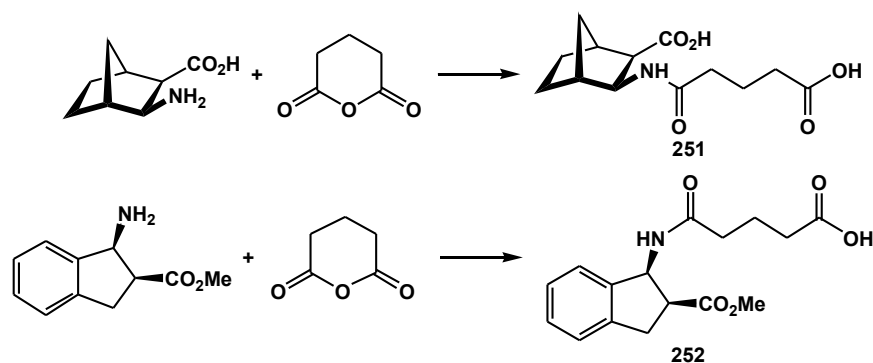


Abb. 56. Synthese Benzo-Analogen von Cispentacin

Die Norbornanaminosäure und Indan-1-amino-2-carbonsäuremethylester wurden in Ausbeuten von 42% und 88% in die entsprechenden *N*-Glutaryl-Amide (**251,252**) überführt.

Abb. 57. Acylierung der *cis*- $\beta$ -Aminosäuren

### III. Allgemeiner Teil

#### III.1.2.6.2. Synthese von $\alpha$ -Aminosäurederivaten

Die *de novo*-Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren ist eines der ältesten Betätigungsfelder der Naturstoffsynthese. Da die 22 proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren [203] in der Natur meist L-konfiguriert vorkommen, besteht schon lang das Interesse an Syntheserouten zur Gewinnung der D-Enantiomere. Die frühen Verfahren zur Aminosäureherstellung, wie die *Gabriel*- oder *Strecker*-Synthese, liefern racemische Gemische, welche durch fraktionierte Kristallisation mit chiralen Auxiliaren in ihre optischen Antipoden aufgetrennt werden. Beide Methoden bieten zudem die Möglichkeit der Einführung neuer, nicht natürlich vorkommender Aminosäurereste [204].

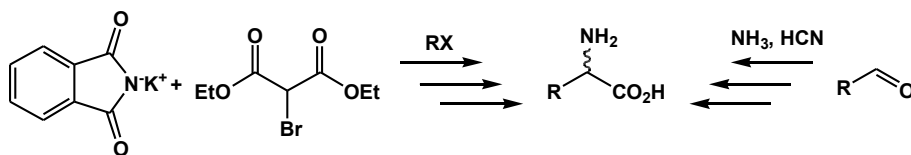


Abb. 58. Klassische  $\alpha$ -Aminosäuresynthesen

Mittlerweile werden die meisten  $\alpha$ -Aminosäuren unter Verwendung biotechnologischer Verfahren gewonnen. Während einige L-Aminosäuren wie Glutaminsäure, Lysin oder Phenylalanin fermentativ in Bulkquantitäten bis zu  $1.5 \cdot 10^6$  jato gewonnen werden, erfolgt die Produktion von weniger gefragten enantiomerenreinen AS oft mittels chemo-enzymatischer Verfahren, wie dem Hydantoin-Prozeß [205]. Dieser zeichnet sich durch eine relativ breite Toleranz bezüglich des  $\alpha$ -Alkylrestes und fast quantitativen Ausbeuten der enantiomerenreinen Aminosäuren aus. Mit der gezielten Evolution von Hydantoinasen sind D- als auch L-AS in breitem Umfang zugänglich [206]. In einer *Bucherer-Bergs*-Synthese [207] wird ein Carbaldehyd mit Cyanid und Ammoniumhydrogencarbonat zum Hydantoin umgesetzt. Dieses wird von einer D- oder L-spezifischen Hydantoinase zur Carbamoylaminosäure gespalten und durch ein weiteres Enzym die AS freigesetzt. Im Fall von aromatischen Resten R erfolgt die Racemisierung des Hydantoinis spontan. Durch die fortwährende Racemisierung der Hydantoine und deren enantioselective enzymatische Spaltung erfolgt eine dynamische kinetische Racematspaltung, welche theoretisch das gesamte Edukt in das gewünschte Zielenantiomer umwandelt.

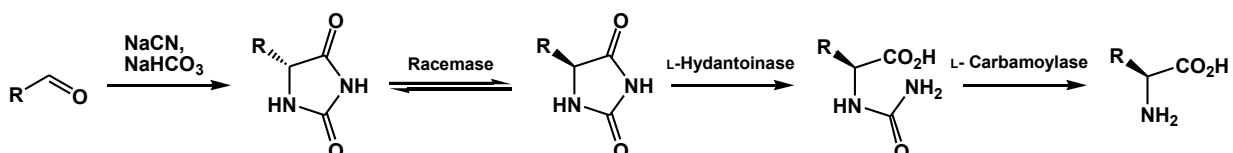


Abb. 59. Enzymatischer Hydantoinase-Prozeß

Weitere chemo-enzymatische Methoden zur Gewinnung enantiomerenreiner L-AS basieren auf der selektiven Hydrolyse von Aminosäureestern durch proteolytische Enzyme wie Subtilisin oder der

Spaltung von *N*-Acylaminosäuren durch Aminoacylasen. Meist muss jedoch erst die racemische AS synthetisiert und anschließend in einem zusätzlichen Schritt zum Ester oder Amid derivatisiert werden. Eine Ausnahme stellt die Synthese von *N*-Acylarylglycinen aus Glyoxylsäure (**268**) dar. Bei der Umsetzung von Carbonsäureamiden mit Glyoxylsäure kommt es zur Ausbildung von *N*-Acylhemiaminalen. Unter Säurekatalyse erfolgt die Abspaltung der Hydroxylfunktion zum Iminiumkation, welches aromatische Systeme im Sinne einer elektrophilen aromatischen Substitution zum entsprechenden *N*-Acylarylglycin angreift [208]. Die Regioselektivität der Substitution folgt den dirigierenden Effekten des jeweiligen substituierten aromatischen Systems.

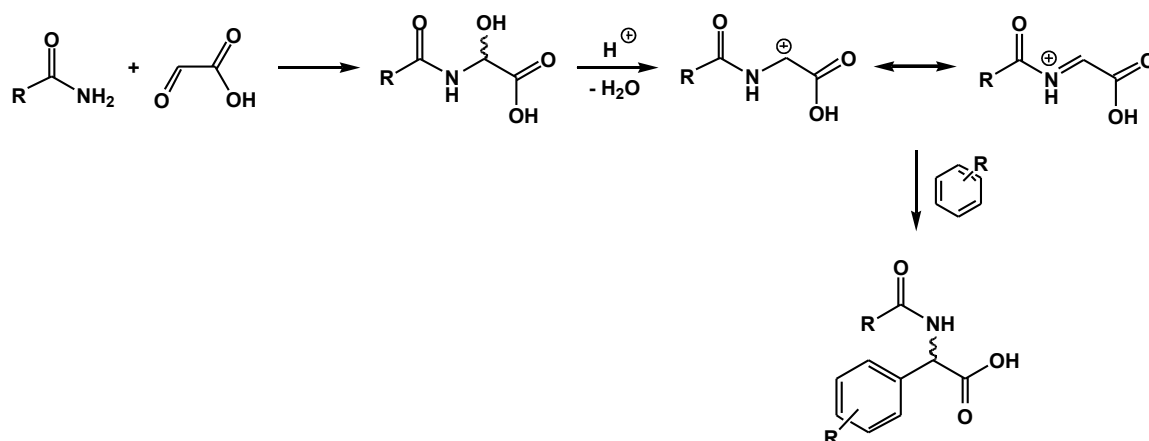


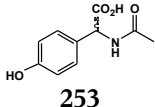
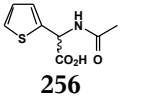
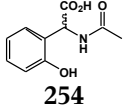
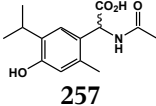
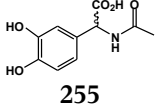
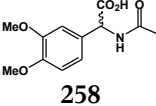
Abb. 60. Synthese von Arylglycinen

Elektronenarme Aromaten wie Nitrobenzol, Benzoesäure oder Trifluormethylbenzol werden der Literatur zufolge nicht amidoalkyliert. Neben Acetamid wurden auch die Amide der Chloressig- und Acrylsäure, sowie Ethoxycarbamoylsäure zu den entsprechenden *N*-Acylhemiaminalen und weiter zu Arylglycinen umgesetzt.

Im Falle der Umsetzung von Acetamid waren die Literaturangaben für durch Sauerstoff aktivierte Aromaten gut reproduzierbar. Für die nicht literaturbekannte Umsetzung von Brombenzol oder *tert.*-Butylbenzol als Arylkomponente konnte dagegen keine Produktbildung beobachtet werden. Die Regioselektivität der Amidoalkylierung von Phenol ist stark temperaturabhängig. Während bei Reaktionstemperaturen  $<10^{\circ}\text{C}$  nur das *para*-Substitutionsprodukt (**253**) isoliert wird, so erhält man bei Raumtemperatur vornehmlich das *ortho*-Produkt (**254**). Durch saure Hydrolyse wurde jeweils die freie Aminosäure erhalten.

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 17. Synthese von *N*-Acetyl-arylglycinen

<i>N</i> -Acetyl-arylglycin	Ausb. [%]	freie AS [%]	<i>N</i> -Acetyl-arylglycin	Ausb. [%]	freie AS [%]
 253	58	(259) quant.	 256	35	(261) 96
 254	11	/	 257	70	/
 255	84	(260) quant.	 258	87	(262) 82

Prinzipiell war eine Ausweitung der Methode auf die Nutzung von Phenylacetamid (**263**) oder Glutarsäuremonoamid (**264**) als Amidkomponenten zur Herstellung der *N*-Acylhemiaminale reizvoll. Die Erzeugung eines stereogenen Zentrums und gleichzeitige Einführung einer Schutzgruppe in einer Eintopfsynthese ist besonders vor dem Hintergrund der hohen Enantioselektivität von PGA gegenüber racemischen *N*-Phenylacetyl-arylglycinen interessant [209],[210]. Analog zu bereits patentierten Verfahren der Spaltung von racemischen Aminosäuren mittels PGA aus *Bacillus megaterium* [211] oder GA [107] ergibt sich eventuell ein einfacher dreistufiger Zugang zu verschiedenen substituierten enantiomerenreinen nicht-proteinogenen Arylglycinen.

Phenylacetamid (**263**) ist durch partielle Hydrolyse von Benzylcyanid (**265**) gut zugänglich (72%) [212], Glutarsäuremonoamid (**264**) Aminolyse von Glutarsäureanhydrid (**34**) (100%).

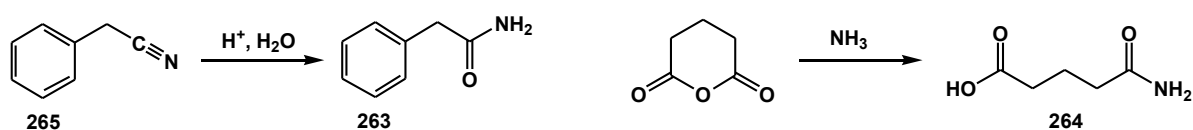


Abb. 61. Synthese der benützten Carbonsäureamide

Während die Hemiaminale des Phenylacetamids mit den eingesetzten elektronenreichen Aromaten in befriedigenden bis sehr guten Ausbeuten zu den jeweiligen *N*-Phenylacetyl-arylglycinen reagierten, konnte bei den Umsetzungen von Glutarsäuremonoamid (**264**) einzig das Produkt (**266**) aus der Reaktion mit dem stark aktivierten Veratrol (**267**) in bescheidener Ausbeute von 9% isoliert werden. Eine mögliche Ursache für das unbefriedigende Ergebnis könnte die Instabilität des *in situ* gebildeten Hemiaminals sein, welches eventuell unter den Reaktionsbedingungen durch einen intramolekularen Angriff der Carboxylfunktion zersetzt wird.

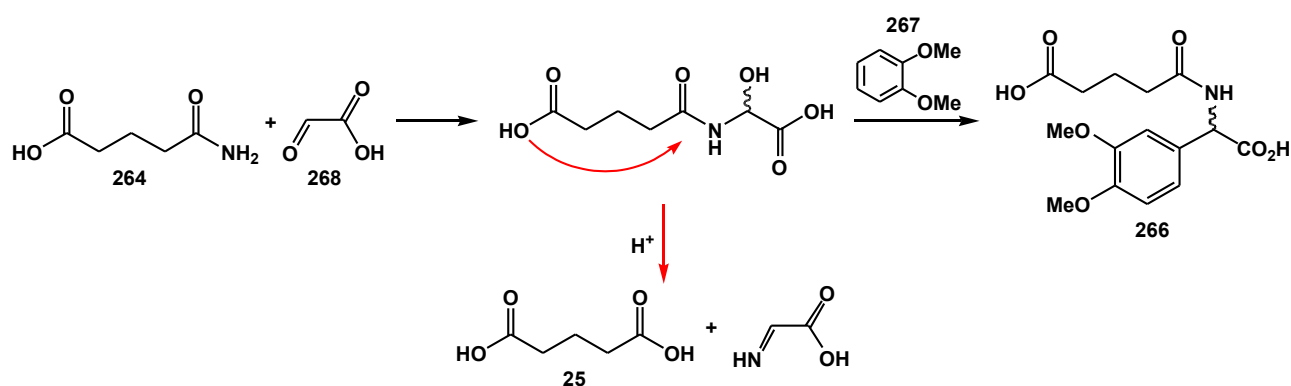
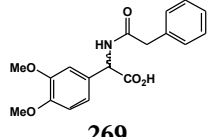
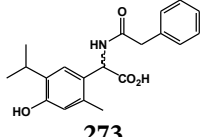
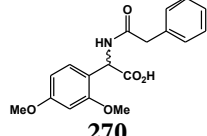
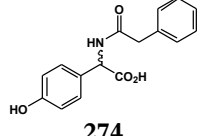
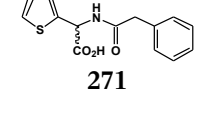
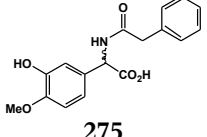
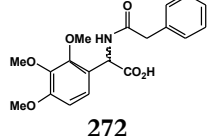
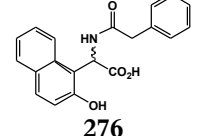


Abb. 62. Reaktion von Glutarylmonoamid

Weiterhin gestaltete sich die Abtrennung der gebildeten *N*-Glutarylaryl glycine aus der Reaktionsmischung wegen der polaren Struktur des Acylrestes schwierig. Die Ausbeuten der Folgeprodukte des Phenylacetamides (269-276) sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 18. Synthese von *N*-Phenylacetyl-aryl glycinen

<i>N</i> -Phenylacetyl-aryl glycine	Ausbeute [%]	<i>N</i> -Phenylacetyl-aryl glycine	Ausbeute [%]
 269	86	 273	73
 270	61	 274	63
 271	39	 275	32
 272	36	 276	88

Die Überführung der  $\alpha$ -Aminosäuren in die entsprechenden Methylester (277-282) erfolgte ebenfalls über die entsprechenden Acylchloride, aus denen durch Methanolyse das Hydrochlorid des jeweiligen Methylesters in durchweg sehr guten Ausbeuten gebildet wurde.

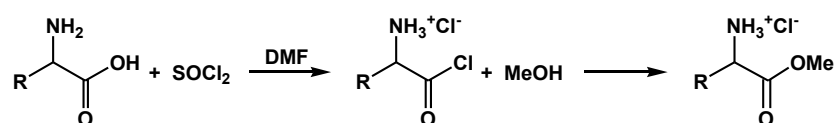
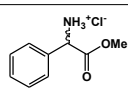
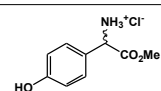
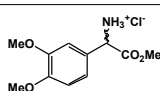
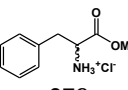
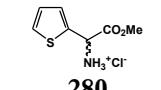
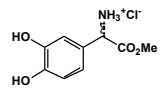
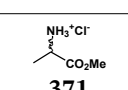
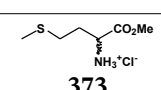


Abb. 63. Veresterung der Aminosäuren

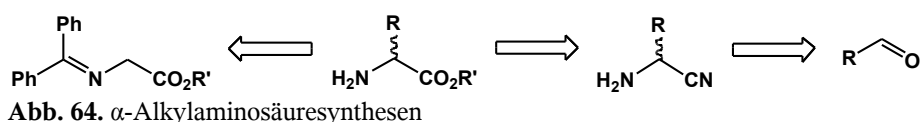
### III. Allgemeiner Teil

Die Methylesterhydrochloride (277-282) wurden anschließend mit Glutarsäureanhydrid in Gegenwart von 2.2 Äquivalenten Triethylamin zu den entsprechenden *N*-Glutarylaminosäuremethylestern (283-287) umgesetzt.

Tab. 19. Synthese der Aminosäureester und *N*-Glutarylamide

Aminosäuremethylester	Ausb. [%]	GI-AS [%]	Aminosäuremethylester	Ausb. [%]	GI-AS [%]	Aminosäuremethylester	Ausb. [%]	GI-AS [%]
 277	98	(283) 93	 279	91	(285) 90	 281	84	(287) 92
 278	91	(284) 96	 280	87	(286) 88	 282	85	/
 371	83	(372) 94	 373	78	(374) 84	/	/	/

Der Einbau ungesättigter aliphatischer Aminosäuren in Peptidstrukturen bedeutet eine interessante Erweiterung der dreidimensionalen Verknüpfungsmöglichkeiten und postsynthetischer Dekorationen [213],[214]. Alkene etwa lassen sich *via* Ringschlußmetathese zu Vorstufenanaloga makrocyclischer Peptide umsetzen [215]. Alkine eröffnen im Rahmen der „Click“-Chemie Zugang zu völlig neuen Kombinationen funktioneller Einheiten [216]. Der Zugang zu Allylglycin und seinen Homologen erfolgt am einfachsten nach *Strecker* aus den entsprechenden ungesättigten Aldehyden [217], welche durch selektive Oxidation der jeweiligen Alkohole erhältlich sind. Aus diesen Alkoholen sind zudem durch Bromaddition und Eliminierung die entsprechenden Alkine zugänglich [218]. Ein vergleichbar einfacher Zugang ergibt sich durch das *O'Donnell*-Protokoll zur Aminosäuresynthese, welches methodisch an die *Gabriel*-Synthese angelehnt ist. Hierbei wird ein Glycinester in *N*-(Diphenylmethylen)-glycinat überführt, zum Carbanion deprotoniert und durch Alkylierung in eine länger-kettige Aminosäure überführt [219], wobei der sterische Anspruch der Schiffbase zusätzlich eine Dialkylierung verhindert.



Die Synthese von Homovinylglycin (288) und Homopropargylglycin sollte ausgehend von 4-Pentenol (289) erfolgen. Der ungesättigte Alkohol 289 ist aus Tetrahydrofurfurylalkohol (290) durch Chlorierung und anschließende Grob-Fragmentierung des erhaltenen Chlorids 291 zugänglich [220]. Die Substitution des Alkohols 290 zum Chlorid 291 und die anschließende Fragmentierung zu 4-Pentenol (289) mit Natrium verliefen mit 64% bzw. 76% Ausbeute zufriedenstellend. Nach

Acylierung der Hydroxylfunktion (95%) mit Pivaloylchlorid und Bromaddition (76%) wird durch basische Eliminierung und Deacylierung 4-Pentanol (**292**) in 54% Ausbeute erhalten.

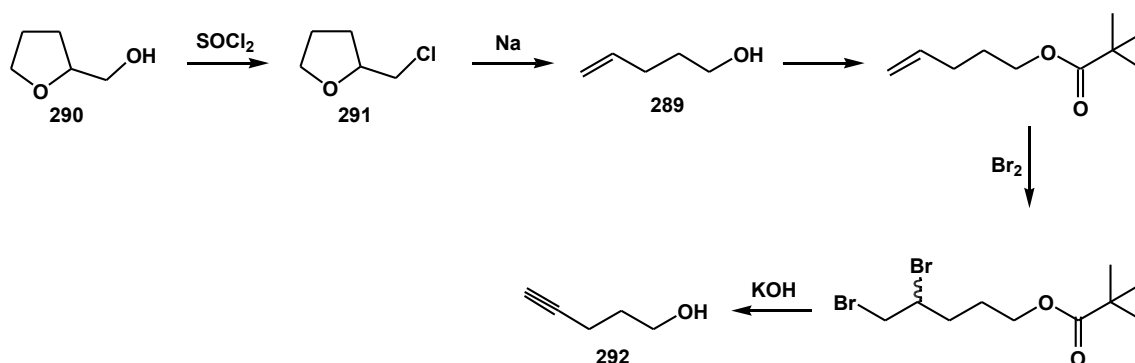


Abb. 65. Synthese von 4-Pentenol und 4-Pentynol

Die Oxidation zum Aldehyd **293** nach *Swern* mit Oxalylchlorid (**294**) und DMSO verlief mit einer Ausbeute von 35% wenig zufriedenstellend. Ein Versuch zur Oxidation mit *N*-Chlorsuccinimid (**295**) blieb erfolglos. Die Verwendung von Pyridiniumchlorochromat als Oxidationsmittel führte dagegen in 60% Ausbeute zum Aldehyd **293** [221].

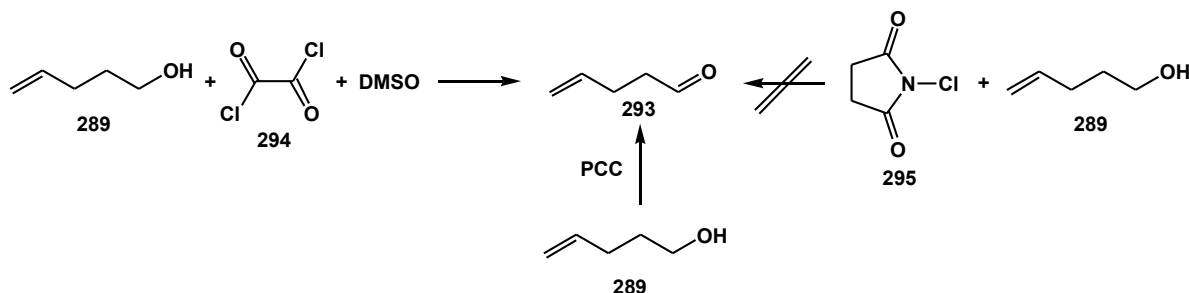


Abb. 66. Synthese von 4-Pentenal

4-Pentenal (**293**) wurde durch Behandlung mit Ammoniak intermediär in das entsprechende Imin **296** überführt, welches mit *in situ* erzeugtem Cyanwasserstoff in 45% Ausbeute zum (1-Amino-5-pentenyl)-nitril (**297**) reagierte. Die Acylierung der Aminofunktion mit Glutarsäureanhydrid lieferte mit 92% Ausbeute das gewünschte Amid **298**. Die saure Hydrolyse des Aminonitrils **297** zum Homoallylglycin (**288**) verlief jedoch nicht mit der gewünschten Selektivität, da unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls eine Hydratisierung der Doppelbindung erfolgte.

### III. Allgemeiner Teil

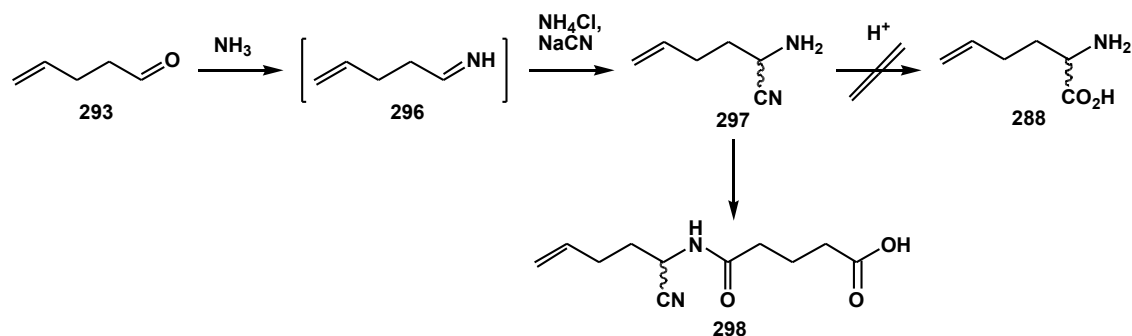
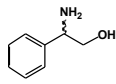
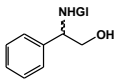
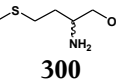
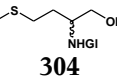
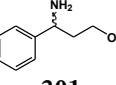
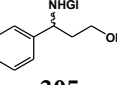
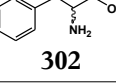
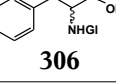


Abb. 67. Synthese von Homoallylglycin

Die Reduktion von Aminosäuren zu den entsprechenden Aminoalkoholen erfolgt am einfachsten durch komplexe Hydride, wie Lithiumalanat oder dem wesentlich preiswerteren Natriumborhydrid. Nachteilig an der Verwendung von Natriumborhydrid ist allerdings die notwendige Aktivierung der Carboxylfunktion durch starke Säuren, wie Bortrifluorid oder Schwefelsäure [222]. Als Alternative bietet sich die Verwendung von *Amberlyst-15* an, einem makroretikulären sulfonierten Ionentauscher, und  $\text{NaBH}_4/\text{LiCl}$  [223]. Bei der Reduktion von DL-Phenylglycin und DL-Methionin konnten die bei der Aufarbeitung entstehenden Borate jedoch durch Extraktion nicht vollständig abgetrennt werden, weshalb letztlich auf Lithiumalanat als Reduktionsmittel zurückgegriffen wurde [224]. Die erhaltenen Aminoalkohole (299-302) wurden mit Glutarsäureanhydrid bei 0°C selektiv zu den jeweiligen Glutarylaminen (303-306) umgesetzt.

Tab. 20. Synthese von Aminoalkoholderivaten

Aminoalkohol	Ausbeute [%]	N-Glutaryl-Aminoalkohol	Ausbeute [%]
 299	70	 303	91
 300	72	 304	78
 301	68	 305	83
 302	77	 306	88

#### III.1.2.6.3. Synthese von N-Acyl-7-aminocephalosporansäuren

Die Synthese der N-Acyl-7-aminocephalosporansäuren erfolgte ähnlich der *Schotten-Baumann*-Acylierung im wässrigen Milieu. Hierzu wurde die 7-Aminocephalosporansäure (17) in Wasser

gelöst, ein basischer pH-Wert eingestellt und das in Aceton gelöste cyclische Anhydrid zugesetzt. Während der Reaktion sinkt der pH-Wert stetig wegen der Freisetzung der Säurefunktion, was durch kontinuierliche Zugabe von Natriumhydrogencarbonat-Lösung kompensiert werden mußte. Mit Ausnahme von Hexafluorglutarsäureanhydrid war die Reaktivität der Anhydride gering genug, um bevorzugt mit der nucleophileren Aminogruppe statt mit Wasser zu reagieren.

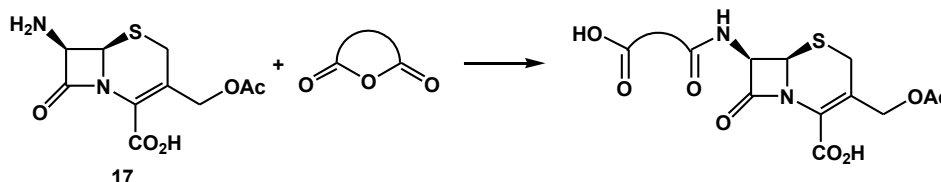
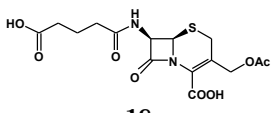
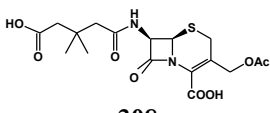
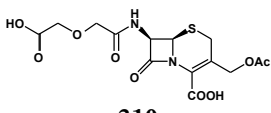
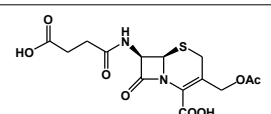
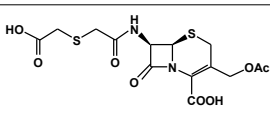
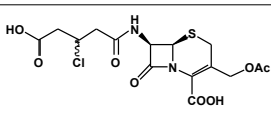


Abb. 68. Synthese der *N*-Acyl-7-aminocephalosporansäurederivate

Die erzielten Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt.

Tab. 21. Synthese von *N*-Acyl-7-aminocephalosporansäurederivaten

<i>N</i> -Acyl-7-amino- cephalosporansäure	Ausb. [%]	<i>N</i> -Acyl-7-amino- cephalosporansäure	Ausb. [%]	<i>N</i> -Acyl-7-amino- cephalosporansäure	Ausb. [%]
 18	71	 308	68	 310	58
 307	61	 309	73	 311	81

### III.1.2.7. Synthese von Glutarsäuremonoestern

Zur Herstellung der Glutarsäuremonoester leicht flüchtiger Alkohole wurden diese in mehrfachem Überschuß mit Glutarsäureanhydrid (34) und einer katalytischen Menge Natriumhydrid zur Reaktion gebracht. Glutarsäuremonomethylester (312) und Glutarsäure-2,2,2-trifluorethylester (313) wurden so in 97% und 91% Ausbeute erhalten.

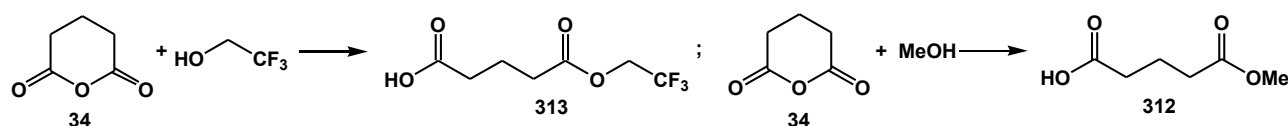
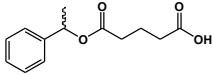
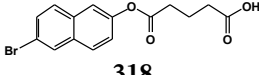
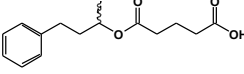
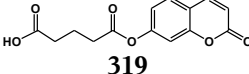
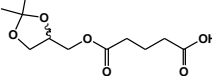
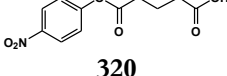
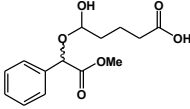
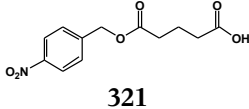


Abb. 69. Synthese einfacher Glutarylmonoester

Die Glutarylmonoester weniger flüchtiger Alkohole (314-321) wurden durch Umsetzung mit äquimolaren Mengen Glutarsäureanhydrid in Dioxan und vorsichtige extractive Aufarbeitung erhalten.

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 22. Synthese von Glutarylmonoestern

Glutarylester	Ausbeute [%]	Glutarylester	Ausbeute [%]
 314	66	 318	63
 315	72	 319	64
 316	68	 320	75
 317	71	 321	73

Die Synthese sekundärer Alkohole erfolgte durch Reduktion entsprechender Ketoverbindungen. So wurden aus Acetophenon und 4-Phenylbutanon die jeweiligen Alkohole in 91% und 83% Ausbeute erhalten und diese mit Glutarsäureanhydrid (**34**) weiter zu den entsprechenden Glutarylmonoestern **314** und **315** umgesetzt.

Die Reaktion metallorganischer Verbindungen mit Aldehyden stellt eine Vielzahl weiterer Methoden zum Aufbau sekundärer Alkohole bereit. Breite Anwendung bis in technischen Maßstab findet die *Grignard*-Reaktion, bei der Magnesiumorganyle an Carbonylverbindungen zu den entsprechenden Alkoholen addiert werden.

Aus Phenylacetaldehyd (**322**) und Methylmagnesiumchlorid konnte 1-Phenyl-2-propanol (**323**) in 68% Ausbeute erhalten werden, welches weiter zum Glutarylmonoester (**324**) umgesetzt wurde (76%).

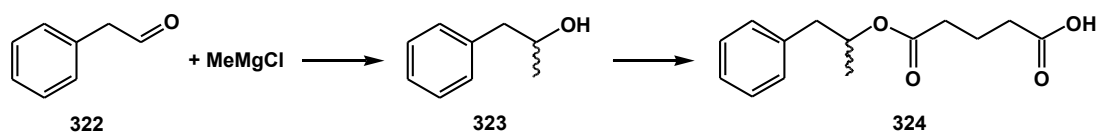


Abb. 70. Synthese von *O*-Glutaryl-1-phenyl-2-propanol

Die hohe Reaktivität der Magnesiumorganyle bedingt zugleich eine Einschränkung ihrer funktionellen Vielfalt. So führt z.B. die Umsetzung der meisten  $\alpha$ -Halocarbonsäureestern mit Magnesium sofort zur Selbstkondensation der gebildeten Metallorganyle. Ausnahmen bilden *tert.*-Butyl- $\alpha$ -halocarbonsäureester [225] und die Verwendung von Magnesium/Graphit-Intercalationsverbindungen [226]. Reagenzien geringerer Reaktivität sind hingegen die entsprechenden Zinkorganyle. Nach *Reformatsky* [227] erfolgt die Insertion von Zink in  $\alpha$ -aktivierte

Kohlenstoff-Halogen-Bindungen entsprechender Carbonsäureester. Die Zinkorganyle konnten teilweise in Substanz isoliert werden und liegen gemäß kristallographischen Untersuchungen als Dimere vor. Durch kernresonanzspektroskopische Experimente konnten keinerlei vinyliche Protonen nachgewiesen werden, was für das Vorliegen einer Zink-Kohlenstoff-Bindung spricht [228]. Die Annäherung einer Carbonylkomponente führt zur Dissoziation des dimeren Zinkorganyl-Komplexes. Zugleich mit der Koordination der Carbonylkomponente erfolgt die Umformung der C- in eine O-metallierte Spezies, einem Enolat. Der Koordinationskomplex erlaubt die Ausbildung eines sesselförmigen cyclischen 6-Elektronen-Übergangszustandes, der zur Produktbildung führt. Die [3,3]-sigmatrope Verschiebung entspricht dabei einer Metallo-Claisen-Umlagerung [229].

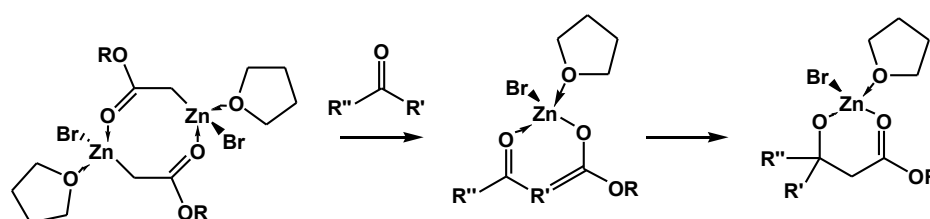


Abb. 71. Struktur und Reaktion von *Reformatsky*-Reagenzien

Als Lösungsmittel finden meist wasserfreie Ether oder Ethergemische Verwendung, da diese die durchlaufenen Zwischenstufen koordinativ stabilisieren können.

Die Aktivierung der Zinkmetalloberfläche nimmt eine tragende Rolle bei der Durchführung der *Reformatsky*-Reaktion ein. Grundsätzlich lassen sich zwei Strategien unterscheiden, zum einen die effektive Beseitigung der Oberflächenoxide, zum anderen die möglichst feine Verteilung des Metalls im Reaktionsgemisch. Eine feine Metallverteilung kann durch *in situ* Reduktion von Zinksalzen erreicht werden. Die Entfernung der Oberflächenoxide kann mechanisch durch Mahlen oder Behandlung mit Ultraschall bewirkt werden oder chemisch durch Anätzen mit Iod oder Säure [230]. Die ursprüngliche Reaktionsmethodik verwendet wasserfreie Lösungsmittel, jedoch hat sich in den letzten Jahren gezeigt, daß Umsetzungen im wäßrigen Milieu wie konzentrierten Salzlösungen durchaus möglich sind. Einhergehend mit diesen Untersuchungen wurde auch ein alternativer radikalischer Reaktionsmechanismus formuliert [231].

Als interessante Alternative bietet sich die lösungsmittelfreie *Reformatsky*-Reaktion an, bei der ein feinvermahlene Gemisch aus Zink und Ammoniumchlorid mit Bromessigsäureester (326) und der Carbonylkomponente versetzt wird. Nach einer Induktionszeit von wenigen Sekunden erfolgt eine rasche, heftige Reaktion, die nach wenigen Minuten beendet ist [232]. Vorteilhaft ist die extrem einfache extraktive Aufarbeitung, nachteilig die durch die hohe Flüchtigkeit bedingte Notwendigkeit, die toxische und carcinogene Halogenkomponente in mehrfachem Überschuß einzusetzen.

### III. Allgemeiner Teil

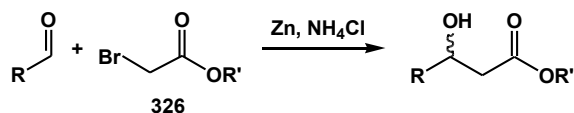
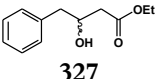
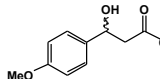
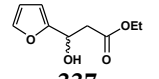
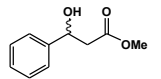
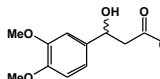
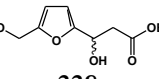
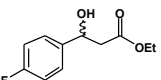
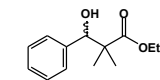
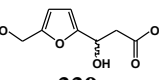
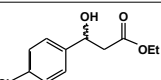
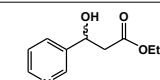
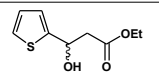
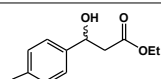
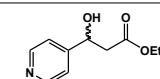
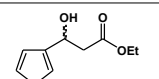


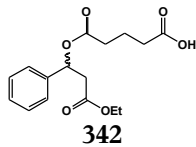
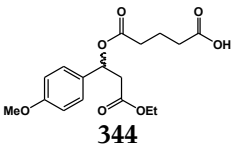
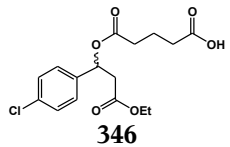
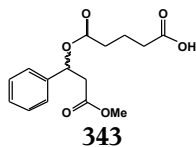
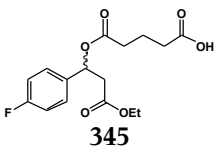
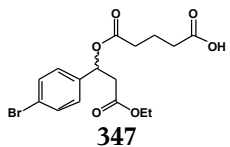
Abb. 72. Reformatsky-Reaktion ohne Lösungsmittel

Die Umsetzung verschiedener Aldehyde mit Bromessigsäureestern lieferte in moderaten bis sehr guten Ausbeuten die entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-carbonsäureester. Zur Verlängerung der Reaktionszeit wurde dem Aldehyd/Bromestergemisch etwas Dioxan zugesetzt. Im Fall der heterocyclischen, polaren Carbaldehyde waren eine weniger heftige Reaktion und geringere isolierte Ausbeuten zu beobachten. Einige der erhaltenen sekundären Alkohole (**327-341**) wurden mit Glutarsäureanhydrid in die jeweiligen Glutarylester (**342-347**) überführt. Die erzielten Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 23. Synthese von  $\beta$ -Hydroxyestern

$\beta$ -Hydroxy-carbonsäureester	Ausb. [%]	$\beta$ -Hydroxy-carbonsäureester	Ausb. [%]	$\beta$ -Hydroxy-carbonsäureester	Ausb. [%]
 <b>327</b>	59	 <b>332</b>	54	 <b>337</b>	65
 <b>328</b>	83	 <b>333</b>	64	 <b>338</b>	12
 <b>329</b>	52	 <b>334</b>	91	 <b>339</b>	50
 <b>330</b>	88	 <b>335</b>	38	 <b>340</b>	36
 <b>331</b>	56	 <b>336</b>	3	 <b>341</b>	35

Tab. 24. Acylierung von  $\beta$ -Hydroxyestern

Glutaryl-Ester	Ausb. [%]	Glutaryl-Ester	Ausb. [%]	Glutaryl-Ester	Ausb. [%]
 342	72	 344	67	 346	74
 343	71	 345	72	 347	86

Nach der gleichen Methodik kann auch die Synthese von 1-Aryl-3-buten-1-olen erfolgen. Die *in situ*-Erzeugung von Metallorganen aus Allylbromid (**348**) und deren Umsetzung mit Carbonylkomponenten ist allgemein als *Barbier*-Reaktion bekannt. Der Mechanismus der Reaktion wird meist als sigmatrope Umlagerung formuliert, jedoch wurden analog der *Reformatsky*-Reaktion auch Indizien für einen alternativen radikalischen Mechanismus gefunden [233].

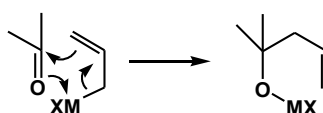


Abb. 73. Allylübertragungs-Reaktion

Bei der Verwendung von im *Pearson*'schen Sinne [234] „weichen“ Metallen wie Zink, Zinn, Indium, Cadmium oder Blei kann sogar auf „harte“ protische Reaktionsmedien wie Alkoholen oder sogar Wasser zurückgegriffen werden [235]-[237]. Erfolgt die Aktivierung des Zink durch konzentrierte Ammoniumchloridlösung, spricht man von einer *Luche*-Reaktion [238], die ebenso wie die *Reformatsky*-Reaktion in Abwesenheit von Solventien durchgeführt werden kann [232]. Dabei beschränkt sich die Anwendungsbreite nicht nur auf Carbonylverbindungen als Elektrophile. Die Reaktion von Nitrilen liefert diallylierte Amine (**349,350**), wie an der Umsetzung von Benzotrinitril (**351**) (77%) und Cyanacetamid (**352**) (32%) gezeigt werden konnte. Die Diallylierung von Nitrilen erfolgte bisher nur mit präformierten Allylverbindungen von Magnesium, Indium oder Samarium [239],[240].

### III. Allgemeiner Teil

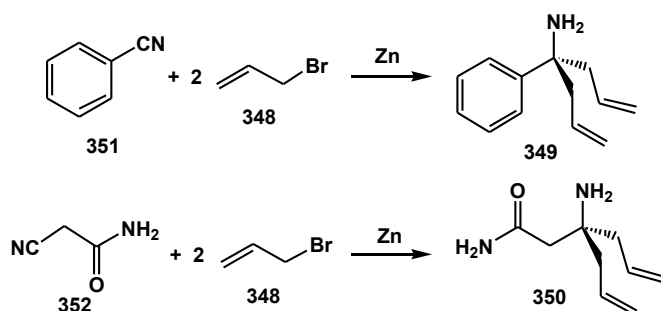


Abb. 74. Diallylierung von Nitrilen

Wie im Fall der Umsetzungen mit Bromessigsäureethylester konnten auch bei der Reaktion von heterocyclischen Arylcarbaldehyden mit Allylbromid weniger lebhaftere Reaktionen und moderate isolierte Ausbeuten an Homoallylalkoholen (353-365) beobachtet werden. Im Folgenden sind die für die Umsetzung von Allylbromid mit Carbonylverbindungen erzielten Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst.

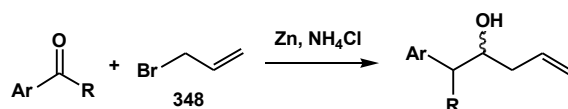


Abb. 75. Allylierung ohne Lösungsmittel

Tab. 25. Synthese Homoallylalkohole

Homoallylalkohol	Ausb. [%]	Homoallylalkohol	Ausb. [%]	Homoallylalkohol	Ausb. [%]
	86		15		16
	25		46		16
	84		40		70
	76		45		
	81		36	/	/

Die Reaktion einiger Homoallylalkohole (353-356) mit Glutarsäureanhydrid (34) führte zu den entsprechenden Glutarylmonoestern (366-369).

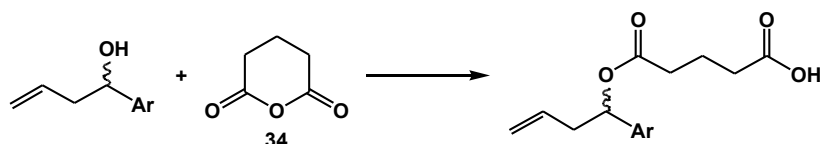


Abb. 76. Reaktionsschema der Acylierung von Homoallylalkoholen

Tab. 26. Acylierung von Homoallylalkoholen

Glutaryl-Ester	Ausbeute [%]	Glutaryl-Ester	Ausbeute [%]
 366	76	 368	67
 367	75	 369	86

### III.1.2.8. Zusammenfassende Betrachtung

Die Synthese von Monoacylderivaten der Glutarsäure erfolgte auf sehr unterschiedliche Weisen und mit wechselndem Erfolg. Die Acylierung von Aminen mit Glutarsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin lieferte meist sehr hohe Ausbeuten, während die Synthese von *N*-Glutaryl-arylglycinen aus Glutarsäuremonoamid nur in einem Fall erfolgreich war. Die Synthese der Glutarylmonoester war vor allem durch die diffizile extractive Aufarbeitung gekennzeichnet.

Die Ausweitung der Synthesen auf kommerziell nicht verfügbare Aminokomponenten führte zur Identifikation von fünf Reaktionskanälen zur Herstellung chiraler Amine, von denen drei vertiefend untersucht wurden. Die katalytische Reduktion von Oximen und die [2+2]-Cycloaddition von CSI an Alkene wurden an einzelnen Beispielen exemplarisch zur Synthese von Aminokomponenten überwiegend erfolgreich angewendet. Bei den drei vertiefend untersuchten Reaktionskanälen, der Amphetaminsynthese aus Nitrostyrolen, der *Rodionow*-Synthese von  $\beta$ -Arylalaninen und der Synthese von Arylglycinen aus Glyoxylsäure und Carbonsäureamiden, wurde eine Vielzahl verschieden-substituierter Aminoderivate hergestellt. Die Synthese von Amphetaminderivaten verläuft vor allem bei weniger polaren Arylcarbaldehyden in guten Ausbeuten, was vor allem auf geringe Verluste bei der Aufarbeitung der LAH-Reduktion zurückzuführen ist. Die erzielten Ausbeuten der *Rodionow*-Synthese sind stark temperatur- und lösungsmittelabhängig und schwanken zwischen gut und moderat. Dennoch eröffnet dieser Reaktionspfad in Verbindung mit einer entsprechenden Racematspaltung den Zugang zu enantiomerenreinen nicht-proteinogenen  $\beta$ -Aminosäuren aus äußerst preiswerten Edukten [190]. Die Eintopf-Synthese von *N*-Acy-

### III. Allgemeiner Teil

---

arylglycinen ist zwar durch die Reaktivität des jeweils umgesetzten Aromaten eingeschränkt, weist aber andererseits durch die Wahl des eingesetzten Carbonsäureamids eine gewisse Flexibilität auf. Durch eine mögliche anschließende kinetische Racematspaltung mit Hydrolasen, wie Lipasen, Aminoacylase I oder PGA, stellt diese Synthesesequenz eine interessanten Option zur Synthese enantiomerenreiner Arylglycine dar.

Die Zink-vermittelte, lösungsmittelfreie Synthese von chiralen sekundären Alkoholen nach *Reformatsky* bzw. *Luche* erlaubt einen äußerst einfachen Zugang zu diesen Komponenten, der sich wie am Beispiel von **327** gezeigt, nicht nur auf aromatische Carbaldehyde beschränkt. Die Allylierungsreaktion konnte in guten Ausbeuten sogar auf Nitrile als elektrophile Komponenten ausgedehnt werden. Exemplarisch wurde dies an **351** und **352** gezeigt, wobei das Addukt **349** vergleichsweise bisher nur durch präformierte Metallorganyle von Magnesium, Indium oder Samarium erhalten werden konnte.

#### III.1.3. Qualitative Untersuchung der Substrattoleranz

Zur orientierenden qualitativen Untersuchung der Substrattoleranz wurde die hydrolytische Aktivität von Glutaryl-Acylase bezüglich der eingesetzten Substrate bestimmt. Die Detektion der Hydrolyseprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie. Hierfür wurde eine Stammlösung des Substrats in Natriumphosphatpuffer definierter pH-Werte hergestellt, in zwei Hälften geteilt und jeweils mit Lösungen von Glutaryl-Acylase und Rinderalbumin bestimmter Proteinkonzentration versetzt. Der Ansatz mit Rinderalbumin dient dabei als Referenz, um unspezifische Hintergrundaktivitäten durch das Protein oder den Puffer zu ermitteln.

##### III.1.3.1. Substrattoleranz der Glutaryl-Acylase bezüglich der Acylkomponente

Die Untersuchung der Substrattoleranz der GA bezüglich der Acylkomponente erfolgte durch Bewertung der Hydrolyse der *N*-Acyl-*p*-nitroanilide, bzw. *N*-Carbamoyl- $\beta$ -aminosäuren bei pH 8.0. Im Falle der positiven Akzeptanz des Acylrestes erfolgt die Freisetzung von detektierbarem *p*-Nitroanilin, bzw. der *N*-alkylierten Carbaminsäure, welche sich durch spontane Decarboxylierung zur entsprechenden  $\beta$ -Aminosäure zersetzt. Die Probenahme erfolgt jeweils nach 1 und 24 Stunden.

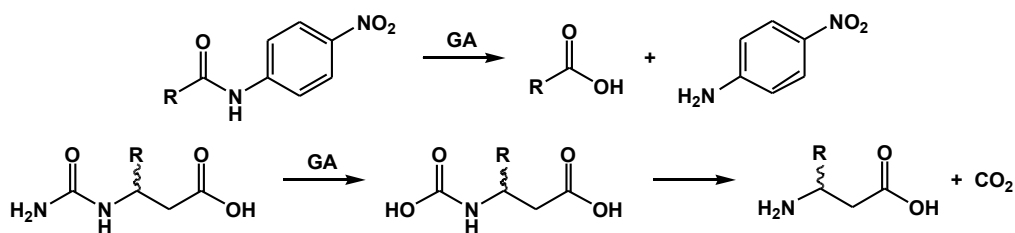
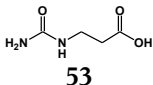
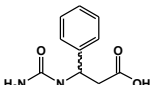
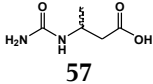


Abb. 77. Enzymatische Hydrolyse von Glutarsäurederivaten durch GA

Im Fall der *p*-Nitroanilinverbindungen erfolgte die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme mit Toluol/Methanol 3:1 als Laufmittel. Freigesetztes *p*-Nitroanilin wird anhand seiner intensiven gelben Farbe identifiziert, die acylierte Verbindung durch UV-Detektion und bei Vorliegen von Dicarbonsäurederivaten durch Behandlung des Chromatogramms mit Bromkresolgrün (BKG). Die freigesetzten Carbonsäuren werden ebenfalls durch Anfärben mit Bromkresolgrün (BKG) detektiert. Die positive Detektion von *p*-Nitroanilin und freigesetzter Carbonsäure im GA-Ansatz, im Vergleich zur Negativkontrolle aus dem Rinderalbumin-Ansatz, wurde als hydrolytische Aktivität der GA bezüglich des jeweiligen Substrats interpretiert.

Die Umsetzung der *N*-Carbamoyl- $\beta$ -aminosäuren wurde ebenfalls dünn-schichtchromatographisch mit Ethanol als Laufmittel analysiert. Die Detektion der Edukte erfolgt durch Anfärben mit BKG, der Produkte mit Ninhydrin (NHD) und BKG.

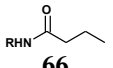
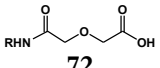
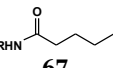
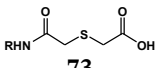
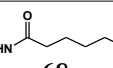
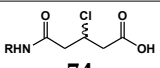
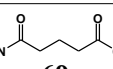
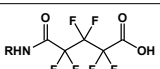
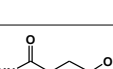
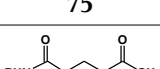
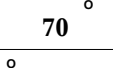
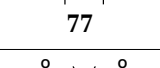
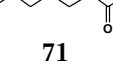
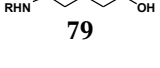
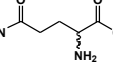
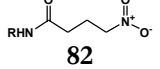
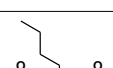
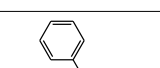
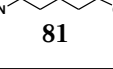
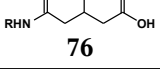
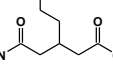
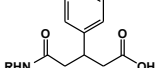
Tab. 27. Ergebnisse der Aktivitätsassays zur Hydrolyse von *N*-Carbamoylsäuren

<i>N</i> -Carbamoyl- $\beta$ -aminosäure	Ansatz				<i>N</i> -Carbamoyl- $\beta$ -aminosäure	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 53	+	+	-	-	 58	-	-	-	-
 57	-	-	-	-					

+ : positiv; - : negativ

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 28. Ergebnisse der Aktivitätsassays zur Acylkomponente

Acylrest	Ansatz				Acylrest	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	UVvis	BKG	UVvis		BKG	UVvis	BKG	UVvis
 <b>66</b>	-	-	-	-	 <b>72</b>	+	+	-	-
 <b>67</b>	-	-	-	-	 <b>73</b>	+	+	-	-
 <b>68</b>	-	-	-	-	 <b>74</b>	+	+	-	-
 <b>69</b>	+	+	-	-	 <b>75</b>	+	+	-	-
 <b>70</b>	+	+	a	a	 <b>77</b>	-	-	-	-
 <b>71</b>	+	+	-	-	 <b>79</b>	+	+	-	-
 <b>20</b>	+	+	a	a	 <b>82</b>	+	+	-	-
 <b>81</b>	-	-	-	-	 <b>76</b>	-	-	-	-
 <b>80</b>	-	-	-	-	 <b>83</b>	-	-	-	-
 <b>65</b>	+	+	-	-	 <b>78</b>	-	-	-	-
 <b>iso-63</b>	+	+	-	-	 <b>63</b>	-	-	-	-

+ : positiv; - : negativ; a : nach 24 h unselektive Hydrolyse beobachtet

Die aus der Kristallstruktur der GA aus *Pseudomonas diminuta* KAC-1 bestimmte schlauchförmige Struktur der Glutaryl-Bindetasche [79] paßt gut zum Reaktivitätsmuster der hier untersuchten GA von Roche. So kann offenbar die 3-Methylengruppe der Glutarsäure mit einem oder mehreren kleinen polaren (74) oder unpolaren Substituenten (79) versehen werden oder durch Heteroatome

wie Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff (72,73,65) ersetzt werden. Die Einführung größerer Substituenten in 3-Position wie Propyl-, Butyl- oder Phenylresten (80,81,83) resultiert in einem sterischen Anspruch der Acylkomponente, der erwartungsgemäß die räumliche Kapazität der Bindungstasche übersteigt. Die Umsetzung von *N,N*-Phthaloyl-glutaminsäure-anhydrid mit *p*-Nitroanilin führte zu einem 95:5 Regioisomerengemisch von 4'- (63) und 2'-*N,N*-Phthaloylglutamylanilid (*iso*-63). Wurde dieses Gemisch mit der GA inkubiert, so waren nach 24 Stunden kernresonanzspektroskopisch nur noch die Amidsignale der 4'-*N,N*-Phthaloylglutamyloverbindung (63) detektierbar, was auf eine enzymatische Hydrolyse des 2'-, nicht aber des 4'-Regioisomeren hindeutet. Für die 2,2- und 2,4-Dimethyl-substituierten Glutarsäuren 78 und 77 konnte keine katalytische Hydrolyse des *p*-Nitroanilids beobachtet werden, was plausiblerweise auf die durch die Methylsubstituenten verursachten Raumbedarf und stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen in Nachbarschaft zur terminalen Carboxylfunktion zurückzuführen ist.

In der Gruppe der *N*-carbamoylierten  $\beta$ -Aminosäuren (53,57,58) konnte nur für das unsubstituierte  $\beta$ -Alanin 53 nach 24 Stunden eine hydrolytische Umsetzung durch die GA detektiert werden.

Essentiell für die Substrat-Bindung ist jedoch das Vorliegen einer polaren Kopfgruppierung. Analog zum nativen Carboxylat wurde auch für das zum Gl-PNA isoelektronische 4-Nitrobuttersäure-*p*-nitroanilid (82) enzymatische Hydrolyseaktivität detektiert. Für den Succinyl- und Glutamyrest (70,20) wurde nach 24 h ein erhebliches Maß an unspezifischer Hydrolyse beobachtet. Sowohl die Carboxylfunktion des Succinylrestes, als auch die protonierte Aminofunktion des Glutamyrestes, können durch einen intramolekularen Angriff autokatalytisch auf die Hydrolyse der Amidbindung wirken.

#### III.1.3.2. Substrattoleranz der Glutaryl-Acylase bezüglich der Aminokomponente

Zur Untersuchung der Substrattoleranz von GA wurde diese mit verschiedensten Glutarylaminen inkubiert. Da Aminohydrolasen oftmals auch eine signifikante Aktivität und Selektivität bei der Umsetzung von Carbonsäureestern aufweisen, wurde zudem eine Reihe von Glutarylmonoestern auf Akzeptanz durch die GA untersucht [241],[242].

##### III.1.3.2.1. Substrattoleranz von GA gegenüber Glutarylaminen

Eine Stammlösung des Glutarylamides in Natriumphosphatpuffer bei pH 8.0 wurde geteilt und jeweils mit GA- und Rinderalbumin-Lösungen gleicher Proteinkonzentration versetzt. Die Analytik der hydrolytischen Umsetzung erfolgte dünschichtchromatographisch mit Ethanol als Laufmittel. Freigesetztes Amin wurde durch Anfärben mit Ninhydrin-Reagenz, die Glutarylamine bzw. die

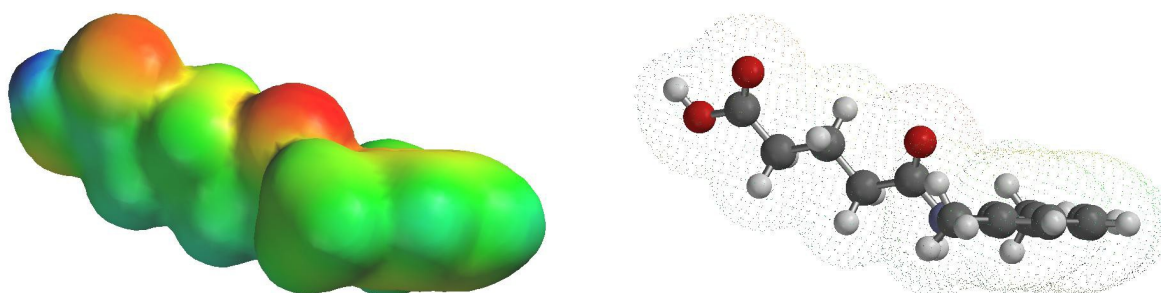
### III. Allgemeiner Teil

---

freigesetzte Glutarsäure durch Anfärben mit Bromkresolgrün nachgewiesen. Im Fall von Anilinderivaten erfolgte die Detektion zusätzlich durch Fluoreszenzlöschung auf den Kieselgelplatten bei 254 nm. Sekundäre Amine wurden durch die intensive Blaufärbung beim Besprühen mit BKG detektiert. Die Probenahme erfolgte nach 1 bzw. 24 Stunden. Als positiven Nachweis auf hydrolytische Aktivität der GA wurde das Auftreten von freiem Amin und Glutarsäure im GA-Ansatz im Vergleich zur Negativkontrolle gewertet.

#### III.1.3.2.1.1. Aromatische Glutarylamide

Die Umsetzung aromatischer Glutarylamide zeigte eine breite Akzeptanz durch die GA. Das Enzym bindet und spaltet sowohl Phenyl-, als auch Naphthylderivate. Die Einführung von Substituenten am Phenylring in *meta*- und *para*-Stellung zur Aminofunktion hat keinen nennenswerten Einfluß auf die generelle Substrat-Akzeptanz. Bei Substitution in *ortho*-Position, wie im Fall des 2,6-Dimethylanilins oder des *o*-Toluidins, war dagegen keine Umsetzung des Glutarylamides zu beobachten. Ursache für die Reaktionsträgheit von *N*-Glutaryl-2,6-dimethylanilid (**92**) und *N*-Glutaryl-2-methylanilid (**88**) ist vermutlich die sterische Abschirmung, welche die aus der Ebene des aromatischen Systems herausgedrehte Carbonylfunktion der Amidbindung durch die *ortho*-Substituenten erfährt.



**Abb. 78.** Modell der Gleichgewichtskonformation im energetischen Grundzustand von *N*-Glutaryl-2,6-dimethylanilid, berechnet mit *Spartan'02*, Modellierungsmethode: Hartree-Fock, 3-21G(\*)

Die Raumbeanspruchung der *ortho*-Methylgruppen und ihre durch den Aromaten bewirkte räumliche Fixierung verhindert offenbar eine Annäherung der zu spaltenden Amidbindung auf Reaktionsdistanz an das katalytisch aktive Serin des *N*-Terminus.

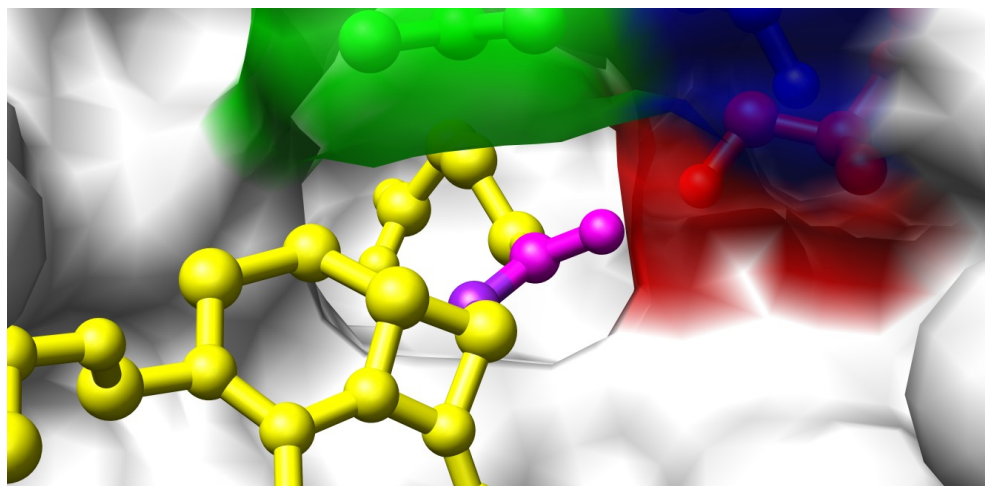

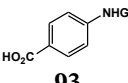
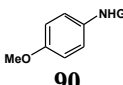

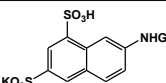

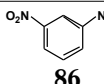
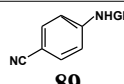
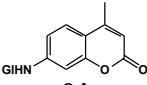
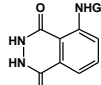

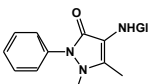



Abb. 79. Aktives Zentrum von GA aus *Pseudomonas diminuta* KAC-1 in Komplex mit Gl-7-ACA (gelb), Umgebung der zu hydrolysierenden Amidbindung (violett/magenta)

Ein ähnliches Bild zeichnet sich auch für die Glutaryl-derivate des Ampyrons (97) und des Luminols (87), welche ein vergleichbares Substitutionsmuster aufweisen.

Tab. 29. Ergebnisse Aktivitätsassay aromatischer Glutarylamide

Glutaryl-Aminoaromat	Ansatz				Glutaryl-Aminoaromat	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	UVvis	BKG	UVvis		BKG	UVvis	BKG	UVvis
 85	+	+	-	-	 93	+	+	-	-
 90	+	+	-	-	 96	+	+	-	-
 91	+	+	-	-	 95	+	+	-	-
 86	+	+	-	-	 89	+	+	-	-
 94	+	+	-	-	 87	-	-	-	-
 92	-	-	-	-	 97	-	-	-	-
 88	-	-	-	-	/	/	/	/	/

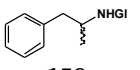
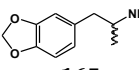
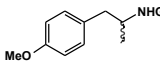
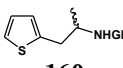
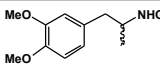
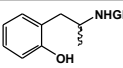
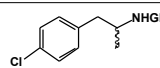
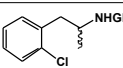
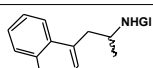
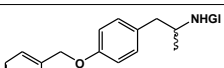
+ : positiv; - : negativ

### III. Allgemeiner Teil

#### III.1.3.2.1.2. Primäre aliphatische Glutarylamide

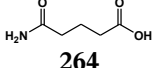
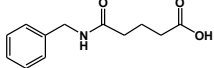
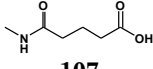
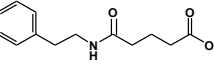
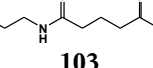
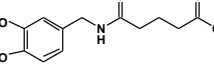
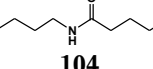
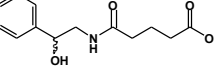
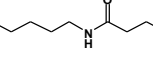
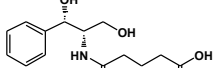
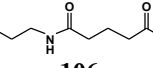
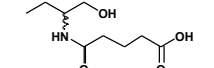
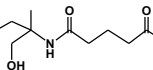
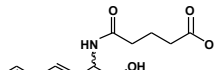
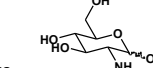
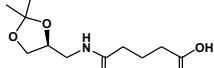
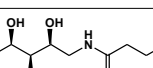
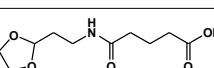
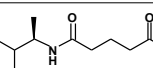
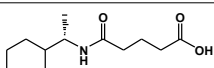
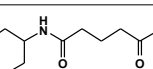
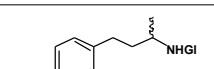
Die Glutaryl-Acylase zeigte ebenfalls eine breite Toleranz bei der hydrolytischen Umsetzung von primären aliphatischen Glutarylamiden. Angefangen bei einfachen *n*-Alkylamiden über hydroxy- oder arylsubstituierte Alkylketten bis zu Dicarbonsäuremonoamiden reicht das Spektrum der umgesetzten Amide. Befindet sich die acylierte Aminofunktion an einem sekundären Kohlenstoffatom, wird diese ebenfalls hydrolysiert, auch im Fall der sterisch anspruchsvolleren Strukturen wie dem Amid von D-Glucosamin **185** oder naphthyl-substituierten Substraten (**146,172**). Sogar das an einen tertiären Kohlenstoffatom gebundene Amid des Ammediols **124** wird hydrolytisch gespalten. Die Präsenz von polaren Funktionalitäten wie Carbonsäuren, Hydroxylfunktionen oder Ethern wird dabei ebenso toleriert wie heterocyclische Substituenten.

Tab. 30. Ergebnisse der Aktivitätsassays von Amphetaminderivaten

Glutaryl-Amid	Ansatz				Glutaryl-Amid	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 <b>158</b>	+	+	-	-	 <b>165</b>	+	+	-	-
 <b>162</b>	+	+	-	-	 <b>160</b>	+	+	-	-
 <b>163</b>	+	+	-	-	 <b>159</b>	+	+	-	-
 <b>161</b>	+	+	-	-	 <b>164</b>	+	+	-	-
 <b>167</b>	+	+	-	-	 <b>166</b>	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

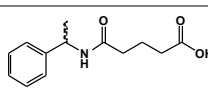
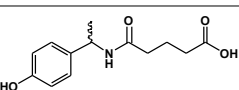
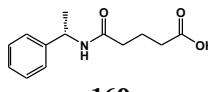
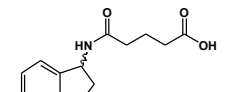
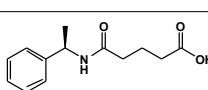
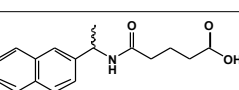
Tab. 31. Ergebnisse der Aktivitätsassays von aliphatischen Glutarylmiden

Glutaryl-Amid	Ansatz				Glutaryl-Amid	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 <b>264</b>	+	-	-	-	 <b>108</b>	+	+	-	-
 <b>107</b>	+	+	-	-	 <b>110</b>	+	+	-	-
 <b>103</b>	+	+	-	-	 <b>109</b>	+	+	-	-
 <b>104</b>	+	+	-	-	 <b>111</b>	+	+	-	-
 <b>105</b>	+	+	-	-	 <b>125</b>	+	+	-	-
 <b>106</b>	+	+	-	-	 <b>126</b>	+	+	-	-
 <b>124</b>	+	+	-	-	 <b>127</b>	+	+	-	-
 <b>185</b>	+	+	-	-	 <b>120</b>	+	+	-	-
 <b>112</b>	+	+	-	-	 <b>118</b>	+	+	-	-
 <b>183</b>	+	+	-	-	 <b>184</b>	+	+	-	-
 <b>182</b>	+	+	-	-	 <b>370</b>	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 32. Ergebnisse der Aktivitätsassays von benzylischen Amiden

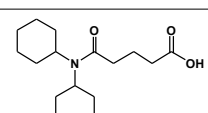
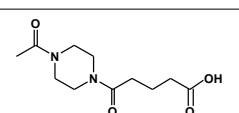
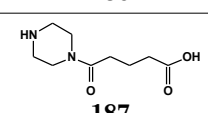
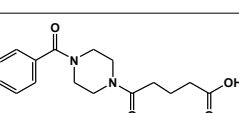
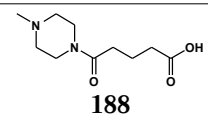
Glutaryl-Amid	Ansatz				Glutaryl-Amid	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 168	+	+	-	-	 171	+	+	-	-
 169	+	+	-	-	 173	+	+	-	-
 170	+	+	-	-	 172	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

#### III.1.3.2.1.3. Sekundäre aliphatische Glutarylamide

Bei der Inkubation verschiedener sekundärer aliphatischer Glutarylamide mit der GA konnte keinerlei enzymatische Hydrolyseaktivität festgestellt werden. Die Ursache hierfür ist sicherlich in der Geometrie des aktiven Zentrums des Enzyms zu suchen. Zum einen bewirkt der sterische Anspruch der sekundären Amide eine weniger leichte Annäherung an den katalytisch aktiven Serinrest, zum anderen ist die Stabilisierung des sich ausbildenden tetraedrischen Übergangszustandes und Reaktionsintermediats im Oxyanionenloch durch die von dem zusätzlichen Substituenten bedingten repulsiven Wechselwirkungen erschwert.

Tab. 33. Ergebnisse der Aktivitätsassays der sekundären Glutarylamide

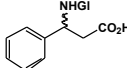
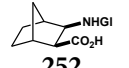
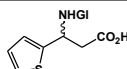
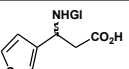
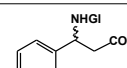
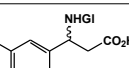
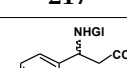
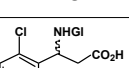
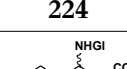
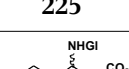
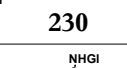
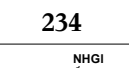

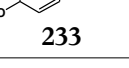
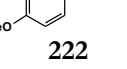
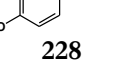
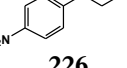
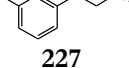
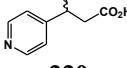
Glutaryl-Amid	Ansatz		Glutaryl-Amid	Ansatz	
	GA	Albumin		GA	Albumin
	BKG	BKG		BKG	BKG
 186	-	-	 189	-	-
 187	-	-	 190	-	-
 188	-	-	/	/	/

+ : positiv; - : negativ

III.1.3.2.1.4. *N*-Glutaryl- $\beta$ -aminosäurederivate

Die Glutaryl-Acylase akzeptiert eine breite Palette von  $\beta$ -Aminosäurederivaten als Substrate. Diese umfaßt einfache aliphatische AS, solche mit bicyclischem Grundgerüst sowie 3-arylsubstituierte  $\beta$ -Alanine. Der Arylrest kann heterocyclischer Natur oder auch mehrfach substituiert sein. Das Substituentenmuster des Phenylrings reicht von einfachen Alkyl- über Oxy- und Halogensubstituenten bis zu Nitrogruppen. Die Carboxylfunktion kann in freier Form oder als Ester vorliegen. Auch die Reduktion zum entsprechenden Alkohol liefert von GA akzeptierte Substrate.

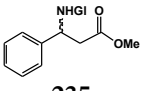
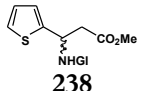
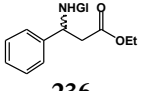
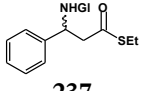
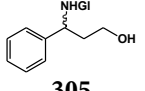
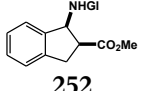
Tab. 34. Ergebnisse der Aktivitätsassays von  $\beta$ -Aminosäuren

<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäure	Ansatz				<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäure	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 216	+	+	-	-	 252	+	+	-	-
 223	+	+	-	-	 229	+	+	-	-
 217	+	+	-	-	 218	+	+	-	-
 224	+	+	-	-	 225	+	+	-	-
 230	+	+	-	-	 234	+	+	-	-
 197	+	+	-	-	 233	+	+	-	-
 222	+	+	-	-	 228	+	+	-	-
 226	+	+	-	-	 227	+	+	-	-
 220	+	+	-	-	 221	+	+	-	-
 370	+	+	-	-					

+ : positiv; - : negativ

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 35. Ergebnisse der Aktivitätsassays von  $\beta$ -Aminosäurederivaten

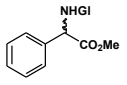
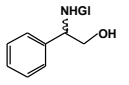
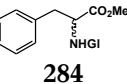
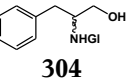
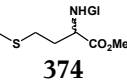
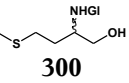
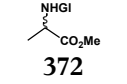
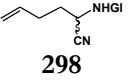
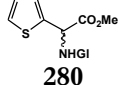
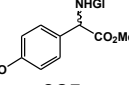
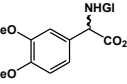
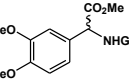
<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäurederivat	Ansatz				<i>N</i> -Glutaryl- $\beta$ -aminosäurederivat	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 235	+	+	-	-	 238	+	+	-	-
 236	+	+	-	-	 237	+	+	-	-
 305	+	+	-	-	 252	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

III.1.3.2.1.5. *N*-Glutaryl- $\alpha$ -aminosäurederivate

*N*-Glutarylierte Derivate von  $\alpha$ -Aminosäuren werden von GA generell erkannt und hydrolytisch gespalten. Die Natur des C-Substituenten am  $\alpha$ -Kohlenstoff kann sowohl Alkyl- als auch Arylreste umfassen. Die Carboxylfunktion kann in freier Form oder als Ester vorliegen. Die hierzu korrespondierenden  $\alpha$ -Aminoalkohole wurden ebenso wie  $\alpha$ -Aminonitrile als Substrat erkannt und umgesetzt.

Tab. 36. Ergebnisse Aktivitätsassay  $\alpha$ -Aminosäurederivate

<i>N</i> -Glutaryl- $\alpha$ -aminosäurederivat	Ansatz				<i>N</i> -Glutaryl- $\alpha$ -aminosäurederivat	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 283	+	+	-	-	 303	+	+	-	-
 284	+	+	-	-	 304	+	+	-	-
 374	+	+	-	-	 300	+	+	-	-
 372	+	+	-	-	 298	+	+	-	-
 280	+	+	-	-	 285	+	+	-	-
 266	+	+	-	-	 287	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

### **III.Allgemeiner Teil**

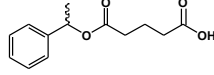
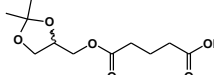
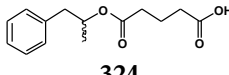
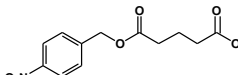
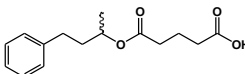
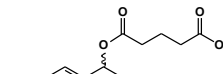
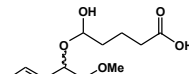
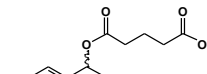
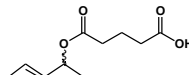
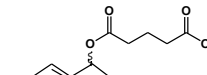
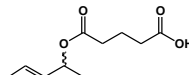
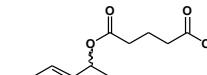
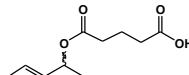
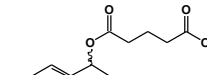
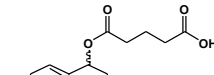
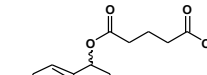
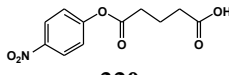
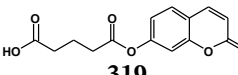
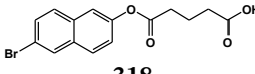
---

#### **III.1.3.2.2. Substrattoleranz der GA gegenüber Glutarsäureestern**

Die Substrattoleranz der GA gegenüber Monoestern der Glutarsäure wurde ebenfalls mit dünnschichtchromatographischer Analytik bestimmt. Eine Stammlösung des Glutarylmonoesters in Natriumphosphatpuffer vom pH 7.0 wurde geteilt und mit GA- bzw. zur Kontrolle mit Rinderalbuminlösung versetzt. Obwohl das pH-Optimum der GA laut Hersteller bei 8.0 liegt, wird die Untersuchung der Hydrolyseaktivität bei pH 7.0 durchgeführt, um die unerwünschte chemische Hydrolyse der Esterbindung zu minimieren. Die Probenahme erfolgte jeweils nach 30 Minuten und 1 Stunde. Die Chromatogramme wurden mit einer Mischung Toluol/Methanol (3:1) als Laufmittel entwickelt und mit Bromkresolgrün und Anisaldehydreagenz (AAR) angefärbt. Die Edukte und Glutarsäure werden mit BKG, freigesetzte Alkohole mit AAR detektiert. Im Fall der Phenolderivate erfolgt die Detektion optisch durch Fluoreszenzlöschung, statt mit AAR. Als positiven Nachweis enzymatischer Aktivität wird das Vorliegen von freigesetztem Alkohol und Glutarsäure im GA-Ansatz, nicht jedoch in der Negativkontrolle gewertet.

Auch beim Vorliegen einer Monoesterbindung der Glutarsäure zeigt sich GA aktiv und hydrolysiert diese zum entsprechenden Alkohol und Glutarsäure. Im Fall der Phenolderivate wird nach 1 Stunde ein erhebliches Maß an unselektiver Hydrolyse beobachtet, was auf die guten Abgangsgruppeneigenschaften der Phenolate und eine entsprechende Hydrolyseempfindlichkeit zurückzuführen ist.

Tab. 37. Ergebnisse der Aktivitätsassays von Glutarylmonoestern

Glutarylester	Ansatz				Glutarylester	Ansatz			
	GA		Albumin			GA		Albumin	
	BKG	AAR	BKG	AAR		BKG	AAR	BKG	AAR
 314	+	+	-	-	 316	+	+	-	-
 324	+	+	-	-	 321	+	+	-	-
 315	+	+	-	-	 344	+	+	-	-
 317	+	+	-	-	 345	+	+	-	-
 343	+	+	-	-	 346	+	+	-	-
 342	+	+	-	-	 347	+	+	-	-
 366	+	+	-	-	 368	+	+	-	-
 367	+	+	-	-	 369	+	+	-	-
<b>Glutarylphenolat</b>	BKG	UVvis	BKG	UVvis	<b>Glutarylphenolat</b>	BKG	UVvis	BKG	UVvis
 320	+	+	a	a	 319	+	+	a	a
 318	+	+	a	a	/	/	/	/	/

: positiv; - : negativ; a : nach 1 h unselektive Hydrolyse beobachtet

### III. Allgemeiner Teil

#### III.1.3.3. Aktivitätsassay der PGA gegenüber *N*-Phenylacetyl-arylglycinen

Zur Überprüfung der Substrattoleranz durch PGA wurden die synthetisierten *N*-Phenylacetyl-arylglycine **269-276** in Natriumphosphatpuffer bei pH 7.8 gelöst, diese Stammlösung geteilt und mit PGA sowie Rinderalbumin als Negativkontrolle versetzt. Die Analytik erfolgt dünnschichtchromatographisch analog den Aktivitätsassays der *N*-Glutarylamide mit Ethanol als Laufmittel und Anfärben mit BKG und NHD. In allen PGA-Ansätzen konnten nach 2 Stunden die Produkte der enzymatischen Hydrolyse, Phenyllessigsäure und das jeweilige Arylglycin, mit BKG bzw. NHD detektiert werden. In den Negativkontrollen wurden keine Hydrolyseprodukte festgestellt. Die literaturbekannte hohe Enantioselektivität von PGA gegenüber diesem Substrattyp [209],[210] eröffnet die Möglichkeit einer kinetischen Racematspaltung der in einer Zweistufen/Eintopfsynthese hergestellten acylierten Arylglycine, und damit den Zugang zu enantiomerenreinen nicht-proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren.

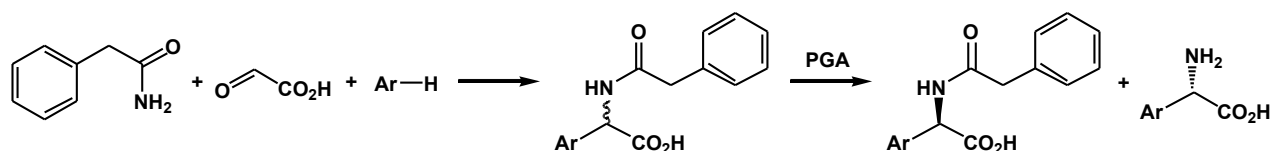
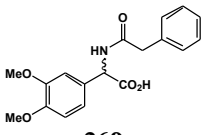
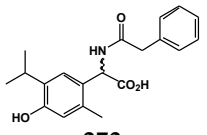
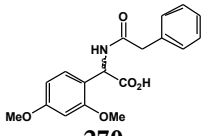
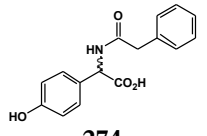
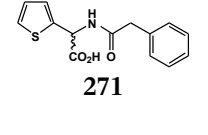
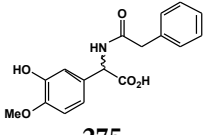
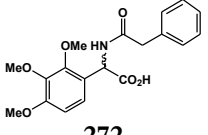
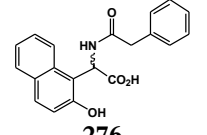


Abb. 80. Potentielle Synthese enantiomerenreiner Arylglycine

Tab. 38. Ergebnisse der Aktivitätsassays von *N*-Phenylacetyl-arylglycinen

<i>N</i> -Phenylacetyl-arylglycinen	Ansatz				<i>N</i> -Phenylacetyl-arylglycinen	Ansatz			
	PGA		Albumin			PGA		Albumin	
	BKG	NHD	BKG	NHD		BKG	NHD	BKG	NHD
 <b>269</b>	+	+	-	-	 <b>273</b>	+	+	-	-
 <b>270</b>	+	+	-	-	 <b>274</b>	+	+	-	-
 <b>271</b>	+	+	-	-	 <b>275</b>	+	+	-	-
 <b>272</b>	+	+	-	-	 <b>276</b>	+	+	-	-

+ : positiv; - : negativ

#### III.1.3.4. Zusammenfassende Betrachtung

Die zunächst rein qualitativ durchgeführten Aktivitätsassays zeigen, daß die Glutaryl-Acylase hochselektiv den Glutarylrest als Acylkomponente erkennt, andererseits aber eine sehr breite Toleranz bezüglich der Aminkomponente aufweist. Die einzigen Ausnahmen hiervon stellen *ortho*-substituierte Anilinderivate sowie die Glutarylamide sekundärer Amine dar, bei denen keinerlei hydrolytische Aktivität beobachtet werden konnte, was mit sterischen Faktoren erklärbar ist.

Ebenso zeigt die GA eine beachtliche Esteraseaktivität, wobei die Breite des Spektrums der akzeptierten Alkoholkomponenten etwa dem der Aminkomponenten entspricht.

Eine vergleichende Quantifizierung der Substratqualität erfolgt in den folgenden Abschnitten an ausgewählten Beispielen.

### III. Allgemeiner Teil

---

#### **III.2. Bestimmung der Aktivität und Selektivität der Glutaryl-Acylase**

Zur Untersuchung der Aktivität und Selektivität von Hydrolasen steht im Allgemeinen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, welche sich jedoch abhängig von der untersuchten Reaktion in den Aspekten der Empfindlichkeit, Genauigkeit und des apparativen Aufwandes erheblich voneinander unterscheiden. Ein weiterer Unterscheidungspunkt ist die Art der Meßwerterfassung, d.h. kontinuierliche oder diskontinuierliche Meßverfahren.

Die Umsatzbestimmung bzw. Verfolgung wird oftmals durch eines der im Folgenden genannten Verfahren durchgeführt

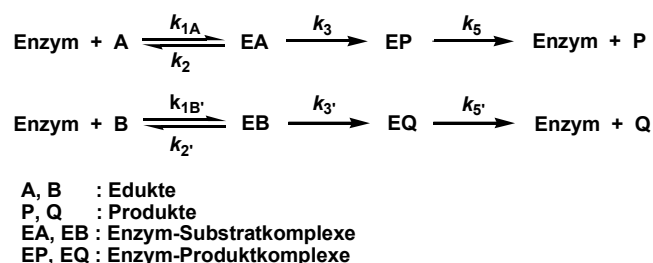
- Titration
- Kolorimetrie (optische Spektroskopie)
- Chromatographie (HPLC, GC)
- nicht-optische Spektroskopie (NMR, etc.).

Während Titration und Kolorimetrie eine kontinuierliche Verfolgung des Reaktionsverlaufs erlauben, arbeiten chromatographische Methoden diskontinuierlich, d.h. durch Probenahme und Analyse des entnommenen Reaktionsvolumens. Die nicht-optischen spektroskopischen Methoden können abhängig von der betrachteten Meßgröße sowohl kontinuierlich, als auch diskontinuierlich angewendet werden. So kann mittels  $^{31}\text{P}$ -Kernresonanzspektroskopie der Reaktionsverlauf der enzymatischen Umsetzung durch die Arginin-Kinase kontinuierlich verfolgt werden [243]. Wesentlich einfacher ist im Fall von Hydrolasen jedoch meist die Probenahme mit Reaktionsabbruch, Isolierung der Edukte und Produkte und Bestimmung ihrer Verhältnisse zueinander.

Zur Selektivitätsbestimmung einer Hydrolase-katalysierten Reaktion, d.h. der differenzierten Umsetzung von Regio- oder Stereoisomeren, steht ein weniger breites Repertoire an Methoden zur Verfügung, welche sich im Allgemeinen auf spektroskopische und chromatographische Verfahren verteilen.

Aus den ermittelten Daten bezüglich der Aktivität und Selektivität des betrachteten Enzyms können Rückschlüsse auf die Optimierung der Reaktionsparameter und das präparativ-synthetische Potential gezogen werden. So ergeben sich bei einer hohen hydrolytischen Aktivität gegenüber bestimmten Strukturmotiven Anwendungsbereiche in der enzymatischen Schutzgruppentechnik [244],[245]. Erfolgen die Umsetzungen mit hoher Enantioselektivität, lassen sich gegebenenfalls kinetische Racematspaltungen mit Hilfe des untersuchten Enzyms durchführen [246]. Für die Beurteilung, ob ein gegebenes Enzym sich zur kinetischen Racematspaltung bestimmter

Substrattypen eignet, ist der *E*-Wert, abgeleitet vom angelsächsischen „enantiomeric ratio“, eine nützliche dimensionslose Kennzahl [247]. Sie beschreibt unabhängig vom Umsatzgrad die Enantioselektivität eines durch Variablen wie pH-Wert, Temperatur etc. definierten Reaktionssystems. Grundlage für die theoretische Behandlung dieser Kennzahl bildet der einfache Dreischrittmeechanismus der *Michaelis-Menten*-Kinetik, der in Komplexbildung von Enzym-Substrat, Umwandlung und Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes unterteilt wird. Im Fall der kinetischen Racematspaltung durch Hydrolyse wird von folgenden Annahmen ausgegangen : Es konkurrieren zwei enantiomere Edukte A und B um den Enzymkatalysator, die Umwandlung Edukt → Produkt wird aufgrund der hohen Wasserkonzentration als dem Reaktionsmedium als irreversibel betrachtet und das System unterliegt keiner Produktinhibition. Die Reaktionsmechanismen lassen sich folgendermaßen definieren



und das Verhältnis der individuellen Reaktionsgeschwindigkeiten kann mathematisch erfaßt werden. Unter Verwendung der *Michaelis-Menten*-Gleichung, der Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  und der Bindungs-Konstante  $K_m$  ergibt sich für das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{V_A}{V_B} \cdot \frac{K_B}{K_A} \cdot \frac{A}{B}$$

woraus durch Integration die homokompetitive Gleichung

$$\frac{\ln \frac{A}{A_0}}{\ln \frac{B}{B_0}} = \frac{\frac{V_A}{K_A}}{\frac{V_B}{K_B}} = E$$

resultiert. Der *E*-Wert wird durch das Verhältnis der spezifischen Konstanten  $V$  und  $K$  bestimmt.  $V/K$  läßt sich mathematisch aus Umsatz ( $c$ ) und Enantiomerenüberschuß ( $ee$ ) berechnen, somit ergeben sich für  $E$  die folgenden Gleichungen

$$E = \frac{\ln[1 - c \cdot (1 + ee_p)]}{\ln[1 - c \cdot (1 - ee_p)]} \quad \text{mit} \quad ee_p = \frac{[P] - [Q]}{[P] + [Q]}$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c) \cdot (1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c) \cdot (1 + ee_s)]} \quad \text{mit} \quad ee_s = \frac{[A] - [B]}{[A] + [B]}$$

für Produkt und Substrat.

### III. Allgemeiner Teil

---

Die im Folgenden beschriebenen Methoden und Untersuchungen haben die Analyse der Aktivität und Selektivität für Umsetzungen mit der Glutaryl-Acylase zum Thema.

#### III.2.1. Umsatzbestimmung mittels Titration

Der Verlauf der durch die Glutaryl-Acylase katalysierten Hydrolyse von *N*-Glutarylaminen kann bei vollständiger Deprotonierung der terminalen Carboxylfunktion prinzipiell durch Titration verfolgt werden. Bei der Hydrolyse der Amidbindung erfolgt die Freisetzung einer Amino- und einer Carboxylfunktion, welche bei Durchführung im Bereich von pH 7.0 bis 8.0 ein Absinken des pH-Wertes bedingt.

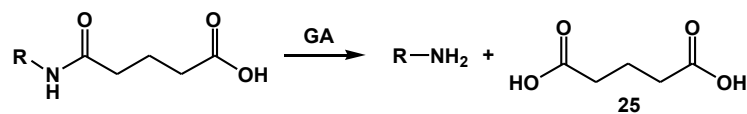


Abb. 81. Hydrolyse von Glutarylaminen

Wird während der Reaktion der pH-Wert durch Titration konstant gehalten, so ist der Verbrauch an Titrationsmedium proportional dem Reaktionsfortschritt. Für die praktische Durchführung empfiehlt sich ein Arbeitsbereich nahe dem pH-Optimum der GA, also bei pH 7.0-8.0. Die freigesetzte Glutarsäure (**25**) sollte in diesem Bereich weitgehend als Dianion vorliegen, wie sich aus den Säureexponenten  $pK_{a1} = 4.34$  und  $pK_{a2} = 5.27$  ergibt [248].

Aus der Tatsache, daß sowohl Edukt als auch eines der Produkte Carbonsäuren darstellen, welche als schwache Säuren nicht vollständig dissoziieren, und der mehr oder weniger basischen Natur des freigesetzten Amins ergeben sich komplizierte Gleichgewichtssysteme. Diese führen vor allem bei höheren Umsatzgraden durch Pufferbildung zu Abweichungen von der linearen Beziehung zwischen Umsatz und dem Verbrauch an Titrationsmedium.

Die titrative Umsatzbestimmung wurde vor allem zur Ermittlung der Anfangshydrolysegeschwindigkeiten beim Vergleich verschiedener Glutaryl-Acylasen verwendet und wird in späteren Abschnitten näher beschrieben [110],[111].

#### III.2.2. Umsatzbestimmung durch kolorimetrische Methoden

Die Umsatzbestimmung mittels kolorimetrischer Methoden erfolgt jeweils spezifisch für eine der in die Reaktion involvierten Komponenten, meist die freigesetzte Carbonsäure oder Aminokomponente. Die Problematik der Detektion liegt im Fehlen chromogener Eigenschaften der meisten Hydrolyseprodukte.

Während die Umsatzbestimmung bezüglich der Acylkomponente durch Hydrolyse der

verschiedenen Amide des gleichen chromogenen Amins wie PNA (19) oder AMC (22) erfolgen kann, so müssen die nicht-chromogenen Amine erst durch entsprechende Derivatisierung in eine optisch detektierbare Verbindung überführt werden. Diese *in situ*-Derivatisierung kann z.B. durch Überführung in Fluorophore mit 4-Nitro-7-chlor-benzo-2-oxa-1,3-diazol (375) (NBD-Cl) erfolgen [249].

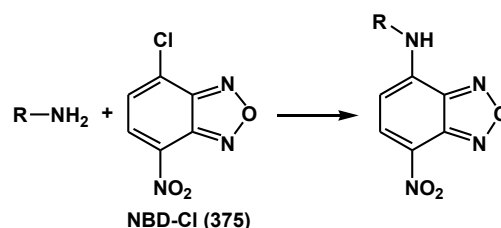


Abb. 82. Aminderivatisierung mit Fluorophor  
NBD

Nachteilig an einer *in situ*-Derivatisierung ist die Beeinflussung des betrachteten Reaktionssystems durch zusätzliche Komponenten und eine dadurch eventuell bedingte Verfälschung der ermittelten Daten oder eine eventuelle Enzyminhibition. Zudem muß die Derivatisierungsreaktion schnell und mit immer gleichen Umsatzgraden erfolgen, was nicht für alle Reaktionssysteme gewährleistet ist. Aufgrund dieser Limitationen beschränken sich die im Weiteren beschriebenen kolorimetrischen Methoden auf die Umsatzbestimmung bezüglich der Acylkomponente.

### III.2.2.1. Umsatzbestimmung durch die Freisetzung von *p*-Nitroanilin

Die in den Abschnitten III.1.1.1. und III.1.3.1. beschriebene Methodik zur qualitativen Bestimmung der Substrattoleranz eignet sich ebenfalls zur quantitativen Untersuchung bestimmter enzymatischer Hydrolysen [127]. So ist L-Glutaminsäure-5-(4-nitroanilid) (20) kommerziell als Substrat für  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase-Assays erhältlich.

Zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der GA bezüglich der Variation der Acylkomponente, wurde die Freisetzung von *p*-Nitroanilin (19) aus *N*-Acyl-nitroaniliden verfolgt. Hierzu wurde die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 411$  nm in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgezeichnet. Die ermittelten Werte wurden anhand einer Kalibrationskurve einer bestimmten *p*-Nitroanilin-Konzentration zugeordnet. In Kenntnis der zugesetzten Proteinmenge läßt sich so die relative Hydrolyserate der eingesetzten *N*-Acyl-*p*-nitroanilide bestimmen.

Die maximale Löslichkeit von *N*-Glutaryl-*p*-nitroanilin (Gl-PNA) (69) in 0.1 M Natriumphosphatpuffer vom pH 7.0 liegt bei ca. 5 mmol/L. Zwar weist Gl-PNA (69) selbst keine Absorption bei  $\lambda = 411$  nm auf, dennoch wurde die Kalibrationskurve durch Mischen von 4 mM

### III. Allgemeiner Teil

---

Stammlösungen von Gl-PNA (**69**) und PNA (**19**) für Konzentrationen von 0 bis 4 mmol/L des Anilins erstellt, um eine bathochrome Verschiebung durch etwaige Aggregationseffekte der Aromaten zu erfassen [250]. Die jeweils bei 25°C und 37°C aufgezeichneten Kalibrationskurven zeigten einen S-förmigen Verlauf und zueinander nur geringe Differenzen.

Die Hydrolyse von Glutaryl- und Succinylnitroanilid (**70**) wurde bei pH 7.0 und Temperaturen von 25°C und 37°C verfolgt, zusätzlich wurde die Hydrolyserate von 5'-Glutamyl-*p*-nitroanilid (**20**) bei 37°C und pH 7.0 ermittelt.

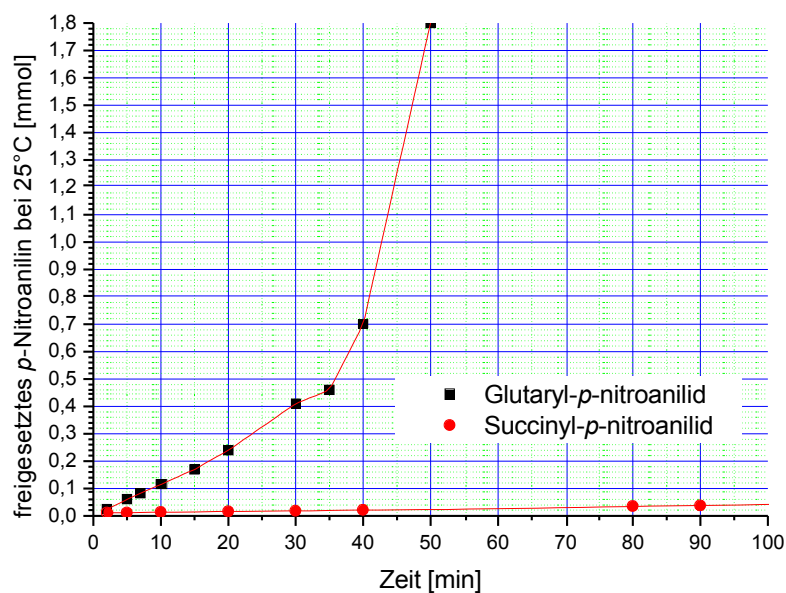


Abb. 83. Hydrolyse von *p*-Nitroaniliden bei 25°C

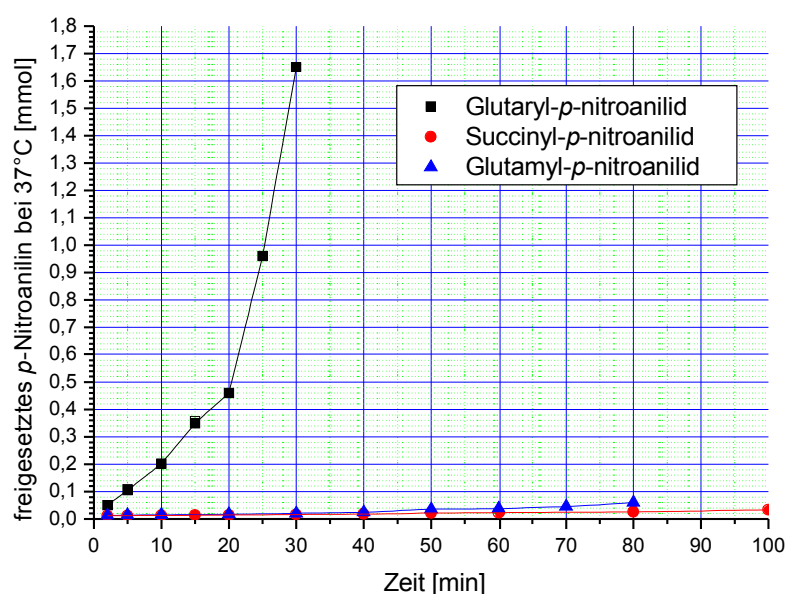


Abb. 84. Hydrolyse von *p*-Nitroaniliden bei 37°C

Im Bereich der linearen Zunahme des freigesetzten PNA wurde die Steigung der Kurven ermittelt und zueinander in Relation gesetzt.

Tab. 39. Hydrolyseraten

Substrat	Hydrolyserate bei T = 25°C		Hydrolyserate bei T = 37°C	
	mmol / min	%	mmol / min	%
Glutaryl-PNA	$1.35 \times 10^{-2}$	100	$2.32 \times 10^{-2}$	100
Succinyl-PNA	$3.20 \times 10^{-4}$	2.4	$2.10 \times 10^{-4}$	0.9
Glutamyl-PNA	/	/	$5.47 \times 10^{-4}$	2.4

Die Hydrolyserate von Gl-PNA (**69**) zeigt durch den Temperaturanstieg von 25°C auf 37°C in erster Näherung eine Verdopplung, während die Werte für Succinyl-PNA (**70**) relativ und absolut betrachtet sinken. Dies ist auf eine kinetische Kontrolle der Hydrolyse von Succinyl-Amiden zurückzuführen, entscheidend ist die der Hydrolyse vorangehende Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Dieser ist aufgrund der um eine Methylengruppe verkürzten Kettenlänge im Vergleich von Succinyl- zum Glutarylrest weniger stabil und dissoziiert aufgrund der durch die Temperaturerhöhung gesteigerten Molekulardynamik leichter.

Die Hydrolyserate von Glutamyl-PNA (**20**) liegt bei nur knapp 1/40 des für Glutaryl-PNA ermittelten Wertes. Beide Acylreste leiten sich von einer C<sub>5</sub>-Dicarbonsäure, jedoch trägt der Glutamylrest zusätzlich eine der in ihrer Polarität der Carboxylfunktion komplementäre

### III. Allgemeiner Teil

---

Aminofunktion und entspricht damit einem Homologen des 5-Aminoadipylrestes in Cephalosporin C (**11**). Für dieses liegt die Hydrolyserate natürlichen Glutaryl-Acylasen bei maximal 4% des Wertes für Gl-7-ACA (**18**) [80].

Die Einschränkungen bei der Umsatzbestimmung durch die Freisetzung von PNA (**19**) liegen zum Einen technisch bedingt in der erheblichen Streubreite der einzelnen Absorptionswerte, die durch eine entsprechende Anzahl von Meßwerten kompensiert werden muß. Zum Anderen erfolgt die Erfassung der Meßwerte ohne Bezug auf eine Referenzprobe ohne enzymatische Aktivität. Durch die Zugabe von GA ändert sich aufgrund der Lichtstreuung an den Proteinpartikeln die gemessene Absorption spontan. Zwar weist das als Referenzprotein ohne hydrolytische Aktivität verwendete Albumin aus Rinderserum eine der GA (70 kDa) vergleichbare Masse von 67-69 kDa auf, jedoch unterscheiden sich Tertiär- und Quartärstruktur der beiden Proteine, was somit eine unterschiedliche Lichtstreuung bewirkt. Ohne Referenzprobe kann jedoch nicht das Maß der in III.1.3.1. beschriebenen Autohydrolyse bestimmt werden. Eine Verminderung der Selbstersetzung wurde daher durch Arbeiten bei pH 7.0 statt am pH-Optimum von pH 8.0 erreicht. Als mögliche Alternative zur Überwindung dieser Einschränkungen bietet sich die Verwendung immobilisierter GA an, welche außerhalb des Strahlengangs positioniert werden kann.

#### III.2.2.2. Umsatzbestimmung durch Fluoreszenzmessung

Die Umsatzbestimmung der Hydrolyse verschiedener Acylreste durch die GA ist ebenfalls durch die Analyse der Freisetzung geeigneter Fluorophore möglich. Als Substrate eignen sich die Glutaryl-derivate des 7-Aminomethylcumarins (**94**) (Gl-AMC), des Umbelliferons (**319**) (Gl-Umb) und der 7-Amino-1,3-naphthalindisulfonsäure (**84**) (Gl-AGA) [128],[129],[251].

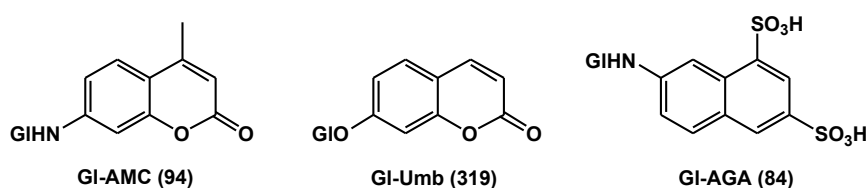


Abb. 85. Derivate von Fluorophoren

Der preisgünstigste Fluorophor ist das Umbelliferon, dessen Glutaryl-derivat **319** jedoch der nicht enzymkatalysierten Hydrolyse unterliegt. Die Derivatisierung der 7-Amino-1,3-naphthalindisulfonsäure resultierte in moderaten isolierten Ausbeuten an **84**, während AMC (**22**) zwar in akzeptablen Ausbeute acyliert werden kann, aber um den Faktor 2 teurer ist. Allen drei Substraten ist gemein, daß sie in ihrer acylierten Form keine Fluoreszenz aufweisen. Die Quantifizierung der enzymatischen Hydrolyse mittels Fluoreszenzmessung ist aufgrund der

orthogonalen Anordnung von Anregungs- und Detektionseinheit weniger sensibel gegenüber der durch Proteinpartikel verursachten Lichtstreuung. Daraus folgt aber auch ein zusätzlicher apparativer Aufwand gegenüber der UV/vis-Spektrometrie, weshalb auf eingehendere Untersuchungen zur Quantifizierung verzichtet wurde.

### III.2.2.3. Umsatzbestimmung durch Azokupplung freigesetzter Phenole

Die Kupplung von Phenolderivaten mit aromatischen Diazosalzen findet Verwendung in einer Anzahl von unterschiedlichen Detektionsmethoden. So lassen sich Phenole in der Dünnschicht- und Papierchromatographie durch das Entwickeln mit aromatischen Diazoniumsalzlösungen sichtbar machen [252]. Die Aktivität bestimmter Glycosidasen in biologischen Gewebeproben kann durch Behandeln mit Glycosiden, welche ein phenolisches Aglycon enthalten, und entsprechenden Diazoniumsalzen lokalisiert werden [253],[254].

Liegt die phenolische Hydroxylgruppe nicht in freier Form, sondern z.B. derivatisiert als Ester vor, so ist die Elektronendichte des aromatischen Systems soweit verringert, daß eine Kupplung mit dem Diazoniumkation ausbleibt. Durch Verwendung eines geeigneten Substrats sollte sich ein entsprechender Assay für die Umsatzbestimmung von GA auf Basis der Azokupplung von Phenolen entwickeln lassen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß die Anwesenheit des Diazoniumsalzes die Aktivität der GA nicht negativ beeinflusst. Da Naphthole, wie etwa bei den „Eisfarben“ [255], erheblich leichter mit Diazoniumverbindungen reagieren als die einkernigen Phenole, fiel die Wahl der Kupplungskomponente auf 6-Brom-2-naphthol (**376**), welches zusätzlich einen auxochromen Bromsubstituenten beinhaltet. Die Diazokomponente sollte eine akzeptable Löslichkeit in wäßrigen Medien aufweisen, weshalb auf das einkernige, methoxy-substituierte *Echtrotsalz RC* (**377**) zurück gegriffen wurde.

Zur experimentellen Überprüfung wurde eine Lösung von *Echtrotsalz RC* (**377**) und *O*-Glutaryl-6-brom-2-naphthol (**318**) in 0.1 M Natriumphosphatpuffer vom pH 7.0 mit unterschiedlichen Mengen GA versetzt.

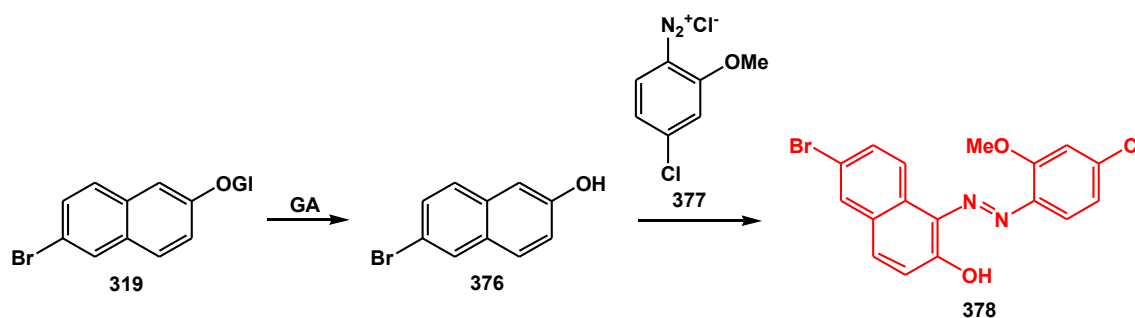
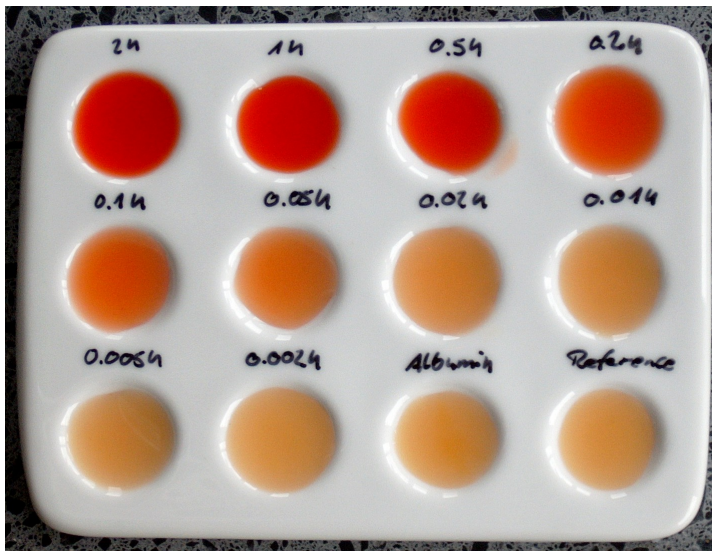


Abb. 86. Azokupplungsbasierter Assay

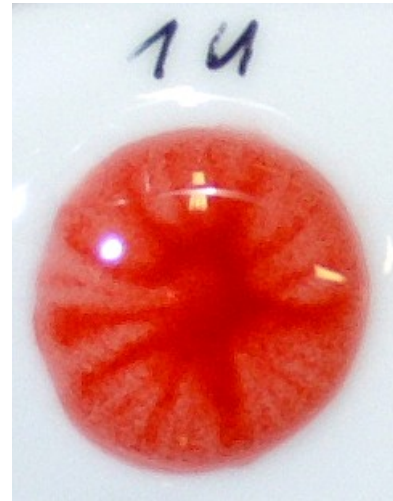
### III. Allgemeiner Teil

---

Aus der einsetzenden Rotfärbung der mit GA versetzten Reaktionsvolumina, nicht aber der Referenzproben, ist ersichtlich, daß *Echtrotsalz RC (377)* keinen inhibierenden Effekt auf GA ausübt. Die Zunahme der Rotfärbung scheint in erster Näherung proportional der zugesetzten Enzymmenge zu sein. Die in **Abb. 87** gezeigte Aufnahme erfolgte 2 Minuten nach dem Zusatz von GA.



**Abb. 87.** Azokupplungsassay mit Variation der Enzymmenge



**Abb. 88.** Sedimentation der Farbstoffpartikel

Im weiteren Reaktionsverlauf zeigte sich jedoch, daß auch in den Referenzproben eine allmähliche chemische Hydrolyse des Glutarylesters und in Folge die Azokupplung zum roten Farbstoff **378** stattfindet. Dieser agglomeriert zu Farbstoffpartikeln, welche wie in **Abb. 88** gezeigt sedimentieren. Die Autohydrolyse des Glutarylnaphtholats und besonders die Agglomeration des Farbstoffs sprechen gegen eine Verwendung des Assays zur kontinuierlichen Quantifizierung der enzymatischen Reaktion.

#### III.2.3. Umsatz- und Selektivitätsbestimmung durch Kernresonanzspektroskopie

Die Ermittlung des Umsatzgrades einer chemischen Reaktion mittels Kernresonanzspektroskopie ist eine gängige, wenn auch im Laboralltag weniger häufig angewandte Methode. Dabei wird die Intensität von für Produkt und Edukt jeweils charakteristischen Signalen bestimmt und zueinander in Relation gesetzt. Dies gelingt umso einfacher und präziser, je besser die betrachteten Signale separiert vorliegen. Durch Protonenspektren läßt sich eine erheblich genauere Umsatzanalyse erzielen als etwa durch  $^{13}\text{C}$ -Spektren, was auf die Geschwindigkeiten der jeweiligen Relaxationsprozesse der betrachteten Kerne zurückzuführen ist.

Die kernresonanzspektroskopische Bestimmung der Stereoselektivität einer chemischen Reaktion ist in den meisten Fällen nur durch die Einführung eines zusätzlichen Anisotropiefaktors in das zu vermessende System möglich [256]. Dies kann unter anderem durch die Verwendung von chiralen Lösungsmitteln [257], durch Chelatisierung mit chiralen Übergangsmetall-Komplexen [258], durch Assoziation an enantiomerenreine Solvatisierungsreagenzien [259] oder Derivatisierung zu diastereomeren Verbindungen erfolgen [260]-[262].

Die Verwendung enantiomerenreiner Lösungsmittel wie 1-Phenyl-2,2,2-trifluorethanol oder 1-Phenylethylamin hat neben dem erheblichen Kostenfaktor den Nachteil, daß im Verhältnis zur Eigenresonanz der Protonen des Lösungsmittels die Signalintensität der zu analysierenden Probe abnimmt und bestimmte Bereiche des Spektrums durch die Lösungsmittelsignale völlig überdeckt werden. Vorteilhaft ist eine nur minimale Beeinflussung des Analyten durch die eventuelle Aufarbeitung und eine durch den Lösungsmittelüberschuß bewirkte vollständige Solvatisierung beider Enantiomere in einer chiralen Umgebung.

Eine Chelatisierung der zu analysierenden Spezies mit chiralen Lanthanoid-Komplexen ist an die Fähigkeit zur Komplexbildung gebunden. Durch die meist hohe Austauschrate der Komplexbildungspartner erfolgt eine erhebliche Verbreiterung der einzelnen Resonanzsignale. Dies verringert zum Einen die Meßgenauigkeit und kann zum Anderen zu Überschneidungen der einzelnen Signale führen. Zusätzlich weisen die meisten üblichen Seltenerd-Reagenzien eine starke Hygroskopie auf, welche in einem erhöhten Aufwand zur Probenvorbereitung resultiert. Der Vorteil der Verwendung von Lanthanoid-Shift-Reagenzien liegt in der im Vergleich zu anderen Methoden breiten Aufspaltung der enantiotopen Signale.

Chirale Solvatisierungsreagenzien (CSA) bilden in einem reversiblen Gleichgewicht diastereomere Solvatisierungs-Komplexe mit dem Analyten, dabei konkurrieren sie mit dem achiralen Lösungsmittel. Abhängig von der Natur des Analyten und der CSA basiert die Komplexbildung auf Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen oder sonstigen attraktiven Wechselwirkungen. Die beobachteten enantiotopen Aufspaltungen sind im Vergleich zu den Lanthanoid-Reagenzien meist um den Faktor 4-8 geringer und die Auswahl der Lösungsmittel ist bedingt durch das Solvations-Gleichgewichtes auf unpolare Solventien, wie Chloroform und Benzol beschränkt. Polarere Lösungsmittel vermindern durch ihre stärkere Wechselwirkung mit dem Analyten die beobachtete Aufspaltung. Eine weitere Einschränkung resultiert aus der möglichen Salzbildung zwischen CSA und Analyt, die zur Sedimentation führen kann. Die Vorteile dieser Methodik liegen in der einfachen praktischen Umsetzung, der Verfügbarkeit unterschiedlicher Reagenzien und der Tatsache, daß diese nicht notwendiger Weise enantiomerenrein vorliegen müssen [263].

### III. Allgemeiner Teil

---

Die Derivatisierung der zu analysierenden Spezies zu diastereomeren Verbindungen kann in Abhängigkeit vom enantiomerenreinen Derivatisierungsreagenz und den Reaktionsbedingungen zur Racemisierung des Analyten führen und dadurch von der Realität abweichende Resultate liefern. Zudem ergibt sich durch die diastereomorphen Übergangszustände der Derivatisierung u.U. die favorisierte Umsetzung eines Enantiomeren, eine kinetische Diskriminierung. Diese kann durch einen Überschuß an Derivatisierungsreagenz weitestgehend kompensiert werden, erhöht aber den Aufarbeitungs- und Kostenaufwand. Die große Zahl und funktionelle Vielfalt enantiomerenreiner Derivatisierungsreagenzien ist Grundlage für die dominierende Rolle dieser Methodik bei der Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen.

Im Folgenden werden zunächst die Vorgehensweisen zur Umsatz- und Selektivitätsbestimmung beschrieben und eingehend auf ihre praktische Anwendbarkeit überprüft, bevor im letzten Abschnitt anhand konkreter Experimente eine Bestimmung des *E*-Wertes erfolgt [246].

#### **III.2.3.1. Vorgehensweise zur Umsatzbestimmung mittels Kernresonanzspektroskopie**

Die Umsatzbestimmung der enzymatischen Umsetzung von Substraten durch die Glutaryl-Acylase mittels Kernresonanzspektroskopie erfordert die Identifikation charakteristischer Signale in Edukten und Produkten, welche zueinander in Relation gesetzt werden können. Die Signalidentifikation muß unter Berücksichtigung der experimentellen Durchführung der hydrolytischen Umsetzung erfolgen. Die Aufarbeitung der zu untersuchenden Reaktionskomponenten sollte derart erfolgen, daß Edukt und mindestens eines der Produkte in der gleichen Probe vorliegen, um diese in Relation setzen zu können. Hierfür wurde die von *Raimondi* [110] entwickelte Methode zur kinetischen Racematspaltung mittels der GA modifiziert. Die bei pH 7.0 durchgeführten enzymatischen Hydrolysen wurden durch Absenken des pH auf 3.0 abgebrochen und aus dieser sauren wäßrigen Phase nicht umgesetztes Glutarylamid und freigesetzte Glutarsäure durch Extraktion mit Ethylacetat isoliert. Die organische Phase enthält somit das Edukt und eines der Hydrolyseprodukte, während das freigesetzte Amin als Ammoniumsalz in der wäßrigen Phase verbleibt.

Aus der Vielzahl der in III.1.3. identifizierten GA-Substrate war eine Auswahl von Komponenten zu treffen, welche näher untersucht werden sollten. Da in Zusammenhang mit der Bestimmung der Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse das Potential der GA als „Reagenz“ zur kinetischen Racematspaltung erkundet werden soll, fiel die Wahl primär auf die Glutarylamide einiger chiraler  $\alpha$ -Arylamine. Diese weisen in ihren <sup>1</sup>H-Spektren im Bereich von 5-6 ppm ein weitgehend isoliertes Signal für das Proton am stereogenen Zentrum auf, welches als Referenzpunkt dienen kann. Glutarsäure und Glutarylamide weisen im Bereich von 2.2-2.4 ppm charakteristische

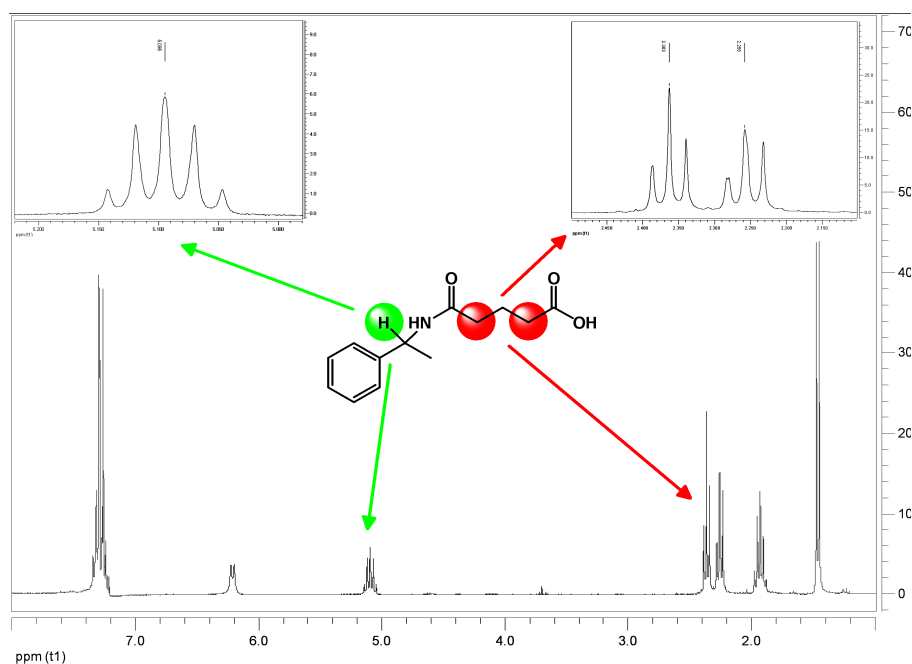
Signale für die zu den Carbonylfunktionen  $\alpha$ -ständigen Methylenprotonen auf, welche als Referenz für die Umsatzbestimmung herangezogen werden können.

Die Integrale der überlagerten Signale der jeweils 4 Protonen von Glutarsäure und Glutarylamid entsprechen hierbei der Summe aus Produkt und Edukt. Der Anteil an Edukt und daraus abgeleitet der Umsatz kann durch Relation mit dem Integral für das Proton am stereogenen Zentrum des Glutarylamids errechnet werden.

$$\text{Umsatz} = \frac{\text{Stoffmenge Produkt}}{\text{Stoffmenge Edukt} + \text{Produkt}}$$

$$\text{Umsatz} = \frac{\frac{1}{4} \cdot \text{Integral der Methylenprotonen} - \text{Integral des Protons am stereogenen Zentrum}}{\frac{1}{4} \cdot \text{Integral der Methylenprotonen}}$$

Bei den untersuchten Verbindungen handelte es sich um die *N*-Glutarylamide von 1-Phenylethylamin (**168**), Phenylglycinmethylester (**283**) und  $\beta$ -Phenylalaninmethylester (**239**). Diese sind im Folgenden mit den relevanten Ausschnitten ihrer Protonenspektren dargestellt.



**Abb. 89.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von *N*-Glutaryl-1-phenylethylamin (**168**)

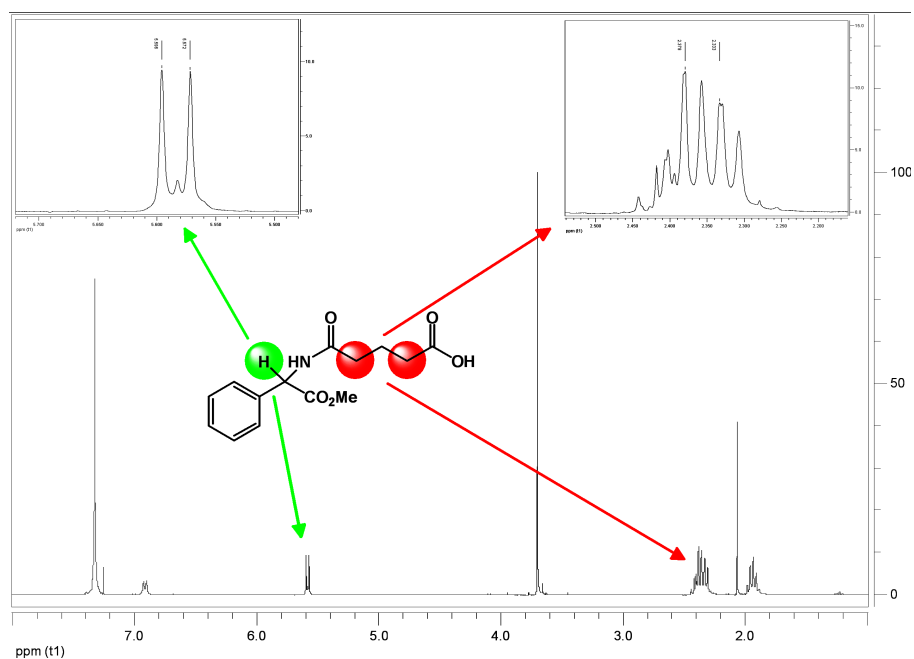


Abb. 90.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *N*-Glutaryl-phenylglycinmethyl ester (283)

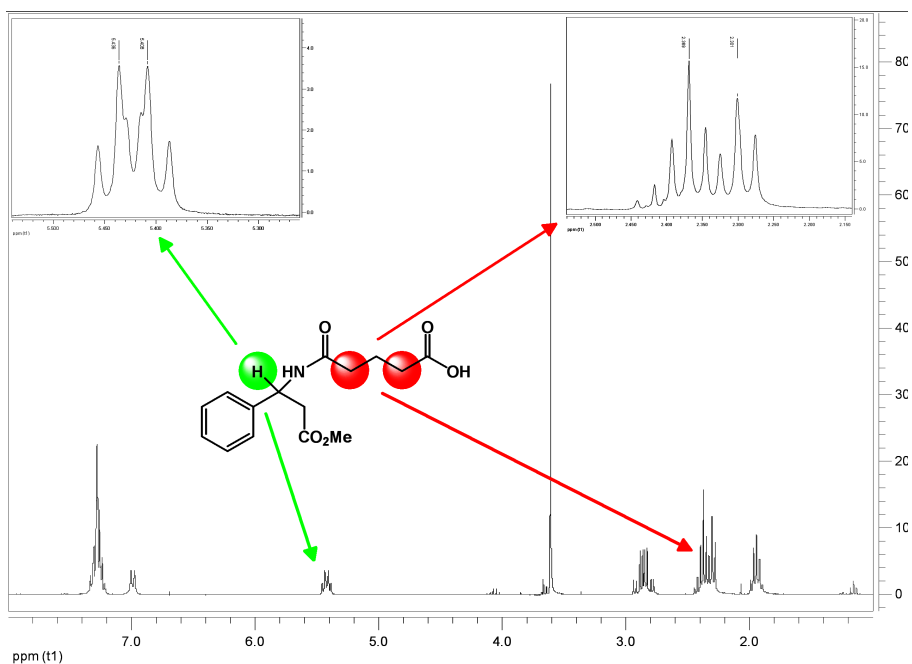


Abb. 91.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethyl ester (239)

#### III.2.3.2. Bestimmung der Enantioselektivität der GA mittels Kernresonanzspektroskopie

Aus den oben beschriebenen Methoden zur Ermittlung der Enantiomerenverhältnisse einer Substanz wurden zwei Vorgehensweisen auf ihre Eignung zur Quantifizierung der Selektivität der

hydrolytischen Umsetzungen der Glutaryl-Acylase hin untersucht.

Durch ihre einfache praktische Umsetzung eignet sich die Verwendung chiraler Solvatisierungsreagenzien (CSA) prinzipiell hervorragend zur Kombination mit der Vorgehensweise zur kernresonanzspektroskopischen Umsatzbestimmung. Die Zugabe eines CSA zu den isolierten Edukt- oder Produktfraktionen sollte in einfacher Weise Zugang zur Ermittlung der jeweiligen Enantiomerenverhältnissen gestatten.

Die Derivatisierung der durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzten Aminokomponenten mit einem chiralen Auxiliar bietet einen alternativen Zugang zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse. Vorteilhaft an dieser Methodik ist die umfangreiche Palette der zur Auswahl stehenden Derivatisierungsreagenzien und eine mögliche Korrelation mit vorhandenen Literaturdaten.

### III.2.3.2.1. (-)-Chinin als CSA zur Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen

Limitierend für die breitere Verwendung von chiralen Solvatisierungsreagenzien ist oftmals deren erheblicher Beschaffungspreis. Eine Ausnahme hiervon stellt (-)-Chinin (**379**) dar, welches als enantiomerenreiner Naturstoff gut zugänglich und preiswert ist [264]. Chinin (**379**) bietet mit seiner sekundären Hydroxylfunktion, zwei basischen Stickstofffunktionalitäten und dem aromatischen Ringsystem eine ganze Reihe von Angriffspunkten für attraktive Wechselwirkungen. So konnten z.B. bereits die Enantiomerenverhältnisse von Binaphthylderivaten, Arylalkylcarbinolen und  $\beta$ -Hydroxycarbonsäureestern erfolgreich untersucht werden [259]. Letztere stellen in Teilen Strukturanaloga zu den untersuchten Phenylglycinmethylester- und  $\beta$ -Phenylalaninmethylesterderivaten dar.

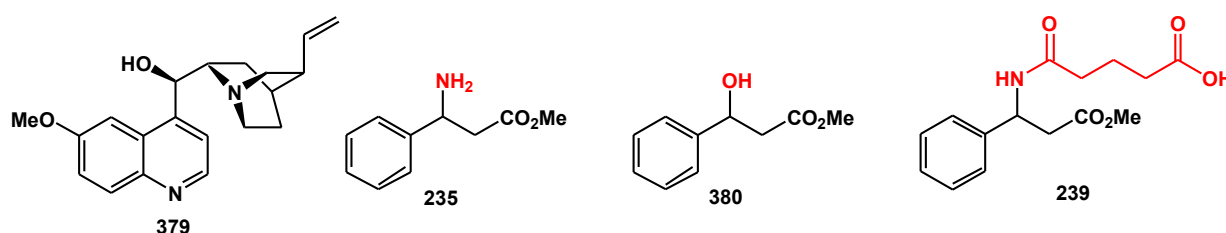


Abb. 92. (-)-Chinin und verschiedene 3-substituierte 3-Phenylpropionsäuremethylester

Die von CSA und Analyt gebildeten diastereomeren Solvationskomplexe bewirken eine enantiotopie Aufspaltung der Protonensignale. Mit sinkender Multiplizität vermindert sich auch die Basisbreite der Signale und die Quantifizierung der enantiotopen Aufspaltung vereinfacht sich zunehmend. Den Idealfall stellen basisliniengetrennte Singulettssignale dar. In den zu untersuchenden Strukturen verkörpern die Protonen der Methylestergruppierung eine solche ideale

### III. Allgemeiner Teil

Sonde, da sie ohne unmittelbaren Kopplungspartner als Singulet in einem signalarmen Spektrenbereich zu finden sind. In der Literatur findet sich eine detaillierte Untersuchung zur enantiotopen Aufspaltung von 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäureestern nur für den *tert.*-Butylester [259], weshalb im Folgenden zuerst die Solvatationskomplexe von racemischem 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäuremethylester (380) mit (-)-Chinin (379) untersucht wurden. Dessen *O*-Glutarylderivat stellt ebenfalls ein von GA akzeptiertes Substrat dar. Untersucht wurde die chemische Verschiebung in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an (-)-Chinin. Die Aufnahme der  $^1\text{H}$ -Spektren erfolgt in  $\text{CDCl}_3$  als wenig polarem aprotischen Lösungsmittel bei einer Resonanzfrequenz von 500 MHz.

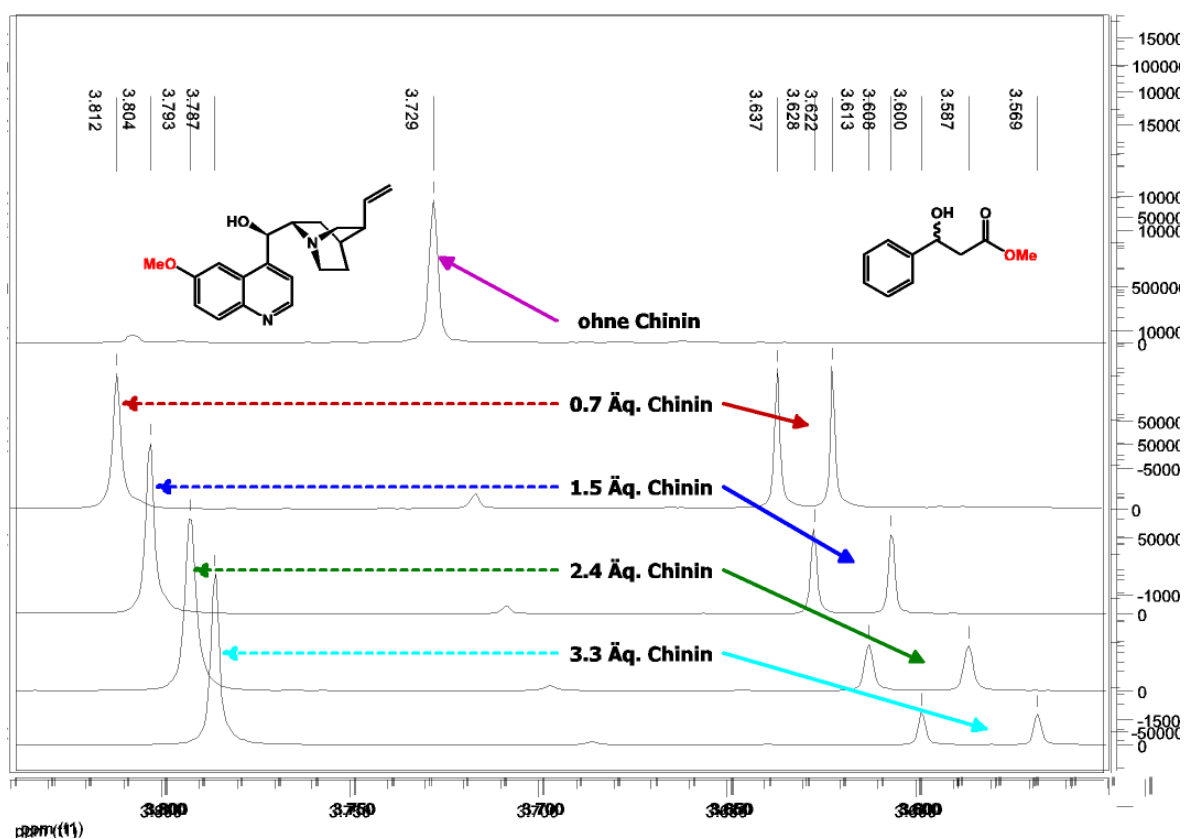


Abb. 93. Enantiotope Aufspaltung der Methylester-Signale von 3-Phenyl-3-hydroxypropionsäuremethylester

Die aus den Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen der betrachteten Methylestergruppierung und der relative Abstand zur Methoxyethergruppierung des Chinins sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt.

Tab. 40. Chemische Verschiebungen für 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäuremethylester

Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
0	3.729	-	-	-	-	-
0.7	3.636 / 3.622	7.329	0.014	3.811	87.629	0.175
1.5	3.628 / 3.607	10.193	0.021	3.804	88.073	0.176
2.4	3.613 / 3.587	13.217	0.026	3.793	89.998	0.180
3.3	3.599 / 3.569	15.314	0.030	3.787	93.805	0.188

Die Aufspaltung der enantiotopen Methylestersignale steigt im betrachteten Bereich linear mit der Anzahl der Chininäquivalente. Bereits bei einem Verhältnis von 1:1 von Ester zu Alkaloid ist eine deutliche Basislinientrennung zu beobachten.

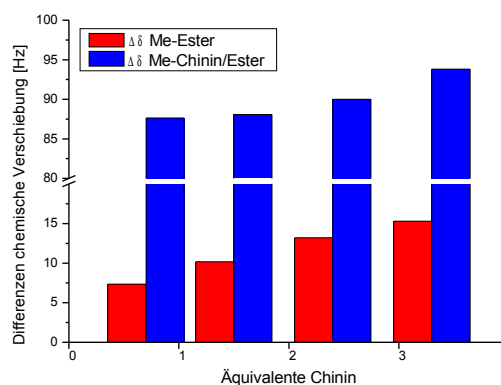


Abb. 94. Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

Der Einfluß der räumlichen Distanz zwischen Ester- und Arylcarbinolgruppierung auf das Komplexierungsverhalten mit Chinin wurde anhand des DL-Mandelsäuremethylesters (**381**) untersucht. Dieser stellt das um die Methylengruppe verkürzte Homologe des 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäuremethylesters (**380**) und als O-Glutarylderivat (**317**) ebenfalls ein GA-Substrat dar. Die erhaltene enantiotope Aufspaltung ist gering, erst ab Zusatz von 3 Äquivalenten Chinin als solche zu registrieren, und führt selbst in Gegenwart von 5 Äquivalenten Chinin nicht zu einer Basislinientrennung der Methylestersignale. Die ermittelten chemischen Verschiebungen sind im Folgenden tabellarisch und graphisch aufgeführt.

### III. Allgemeiner Teil

Tab. 41. Chemische Verschiebung für Mandelsäuremethylester

Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
0	3.751	-	-	-	-	-
1	3.660	-	-	3.767	53.170	0.106
2	3.667	-	-	3.790	61.780	0.124
3	3.661	1.052	0.002	3.798	68.042	0.136
4	3.651	1.310	0.002	3.783	65.572	0.131
5	3.644	1.540	0.003	3.775	65.255	0.130

Die zunehmende räumliche Nähe von Ester- und Arylcarbinolteil des Moleküls wirkt sich offenbar negativ auf die enantiotopische Aufspaltung durch Ausbildung des Solvatationskomplexes aus.

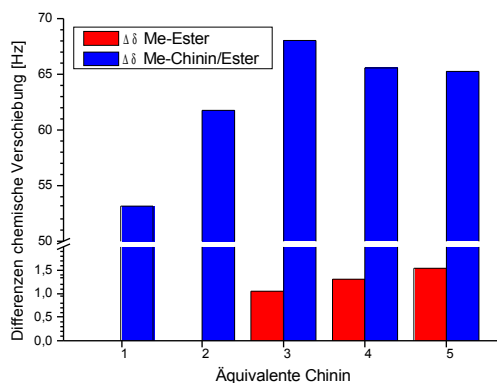


Abb. 95. Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

Für die Aminhomologen  $\beta$ -Phenylalaninmethylester (235) und Phenylglycinmethylester (277) ergibt sich für die Verkürzung zwischen Methylester- und Benzylamingruppierung eine ähnliche Auswirkung auf die enantiotopische Aufspaltung, auch wenn diese vom Absolutwert her eine andere Entwicklung zeigen als die Hydroxyester 380 und 381. Die Signale sind auch bei Zusatz von fünf Äquivalenten Chinin nicht basisliniengetrennt. Die ermittelten Verschiebungen sind im Folgenden tabellarisch und graphisch aufgeführt.

Tab. 42. Chemische Verschiebung für Phenylalaninmethylester

Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
1	3.588	-	-	3.613	12.666	0.025
2	3.598	-	-	3.692	46.808	0.094
3	3.608 / 3.605	1.670	0.003	3.704	48.149	0.096
4	3.668 / 3.664	1.908	0.004	3.828	79.810	0.160
5	3.595 / 3.588	3.469	0.007	3.739	72.056	0.144

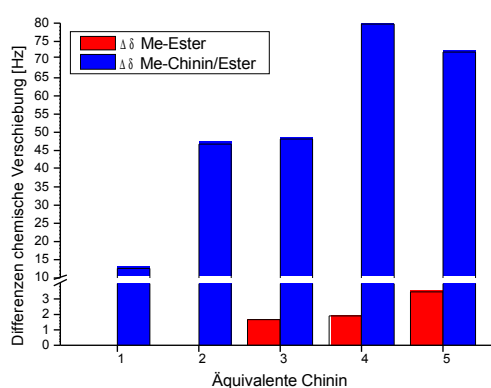
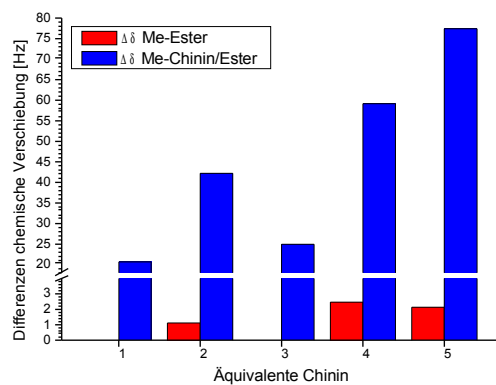


Abb. 96. Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

Im Fall des Phenylglycinmethylesters (**277**) setzt bei Zusatz von 3 Äquivalenten Chinin eine Änderung der Solvationswechselwirkung ein, da die enantiotopische Aufspaltung nicht mehr zu detektieren ist und die Distanz zwischen Methylester- und Methylethersignal ein Minimum durchläuft. Wird die Anzahl der Chininäquivalente weiter erhöht, kann erneut eine Aufspaltung beobachtet werden.

Tab. 43. Chemische Verschiebung für Phenylglycinmethylester

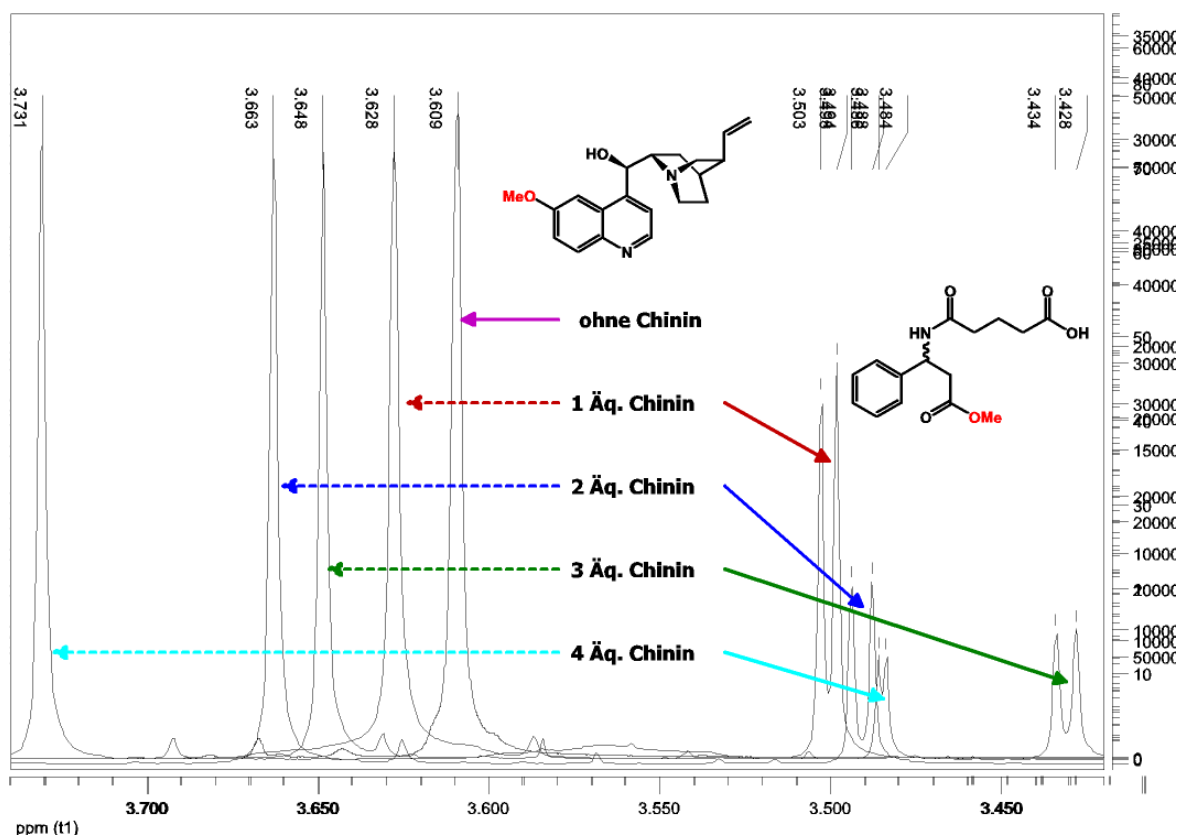
Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
1	3.582	-	-	3.624	20.680	0.042
2	3.614 / 3.612	1.110	0.002	3.699	42.210	0.085
3	3.610	-	-	3.660	24.940	0.050
4	3.604 / 3.599	2.470	0.005	3.723	59.18	0.119
5	3.579 / 3.575	2.136	0.004	3.734	77.409	0.155



**Abb. 97.** Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

Die Analyse der Solvatationskomplexbildung zwischen (-)-Chinin und den *N*-Glutaryl-aminosäuremethylestern von Phenylglycin **283** und  $\beta$ -Phenylalanin **239** ergab wiederum ein zu den Hydroxycarbonsäureestern und Aminosäureestern verschiedenes Bild.

Im Falle des  $\beta$ -Phenylalaninderivats **239** durchläuft die durch die Komplexbildung bewirkte enantiotopie Aufspaltung der Methylesterprotonen ein Maximum bei einem Verhältnis von Alkaloid **379** zu Ester von circa 2:1, um sich danach rapide zu verringern. Bei keinem Verhältnis ist eine Basislinientrennung des aufgespaltenen Signals zu beobachten.



**Abb. 98:** Enantiotopie Aufspaltung für den *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester

Die aus den Spektren ermittelten chemischen Verschiebungen der betrachteten Methylestergruppierung und der relative Abstand zur Methoxyethergruppierung des Chinins sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt und graphisch illustriert.

Tab. 44. Chemische Verschiebung *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester

Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
0	3.609	-	-	-	-	-
1	3.502 / 3.498	2.315	0.004	3.648	72.735	0.146
2	3.493 / 3.487	3.020	0.006	3.662	84.615	0.169
3	3.433 / 3.428	2.872	0.005	3.627	96.940	0.194
4	3.486 / 3.483	1.148	0.003	3.731	122.490	0.245

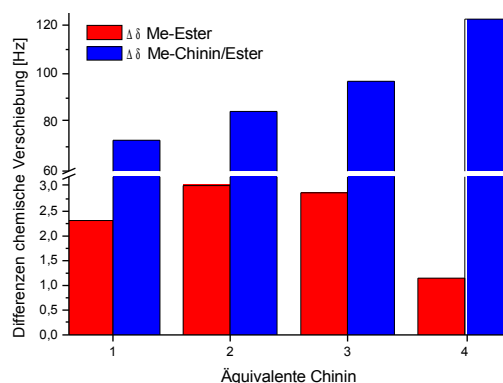


Abb. 99. Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

Während sich bei den  $\beta$ -Hydroxycarbonsäureestern die Verkürzung des Abstandes zwischen Ester- und Arylcarbinolgruppierung negativ auf die enantiotopie Aufspaltung auswirkt, verstärkt die Distanzverringerng zwischen Benzylamid- und Estergruppierung die Aufspaltung der *N*-Acyl-Aminosäure-methylestersignale. Für das Phenylglycinderivat erfolgt ein langsamer Anstieg mit zunehmender Anzahl an Chininäquivalenten, wobei im Bereich zwischen 2-3 Äquivalenten nahezu Stagnation zu beobachten ist. Eine vollständige Basislinientrennung der enantiotopen Signale ist ab einem Verhältnis von Chinin zu Ester von 3:1 zu beobachten.

### III. Allgemeiner Teil

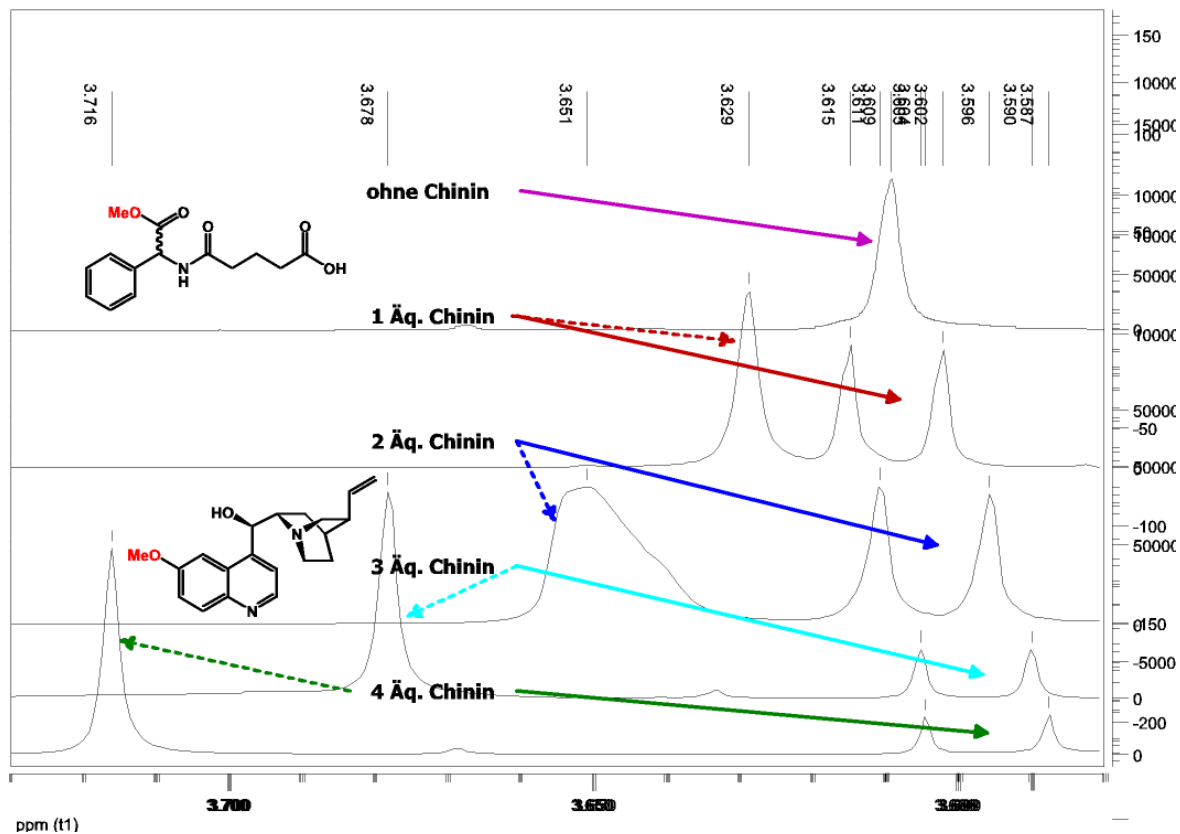
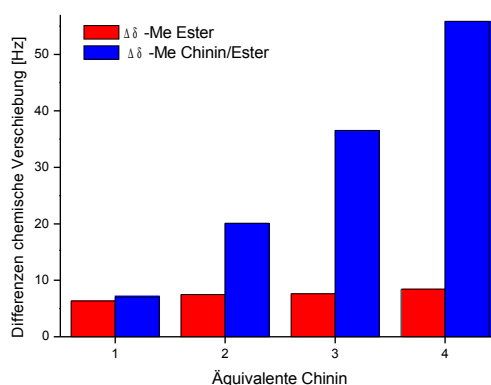


Abb. 100. Enantiotope Aufspaltung für den *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylester

Die ermittelten chemischen Verbindungen sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tab. 45. Chemische Verschiebung *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylester

Äq. Chinin	$\delta$ Me <sub>Ester</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub>		$\delta$ Me <sub>Chinin</sub>	$\Delta\delta$ Me <sub>Ester</sub> /Me <sub>Chinin</sub>	
	[ppm]	[Hz]	[ppm]	[ppm]	[Hz]	[ppm]
0	3.624	-	-	-	-	-
1	3.615 / 3.602	6.354	0.013	3.629	6.988	0.014
2	3.610 / 3.595	7.506	0.015	3.651	20.094	0.041
3	3.605 / 3.589	7.587	0.016	3.678	36.529	0.073
4	3.604 / 3.587	8.453	0.017	3.715	55.833	0.111



**Abb. 101.** Graphische Darstellung der Differenzen der chemischen Verschiebung

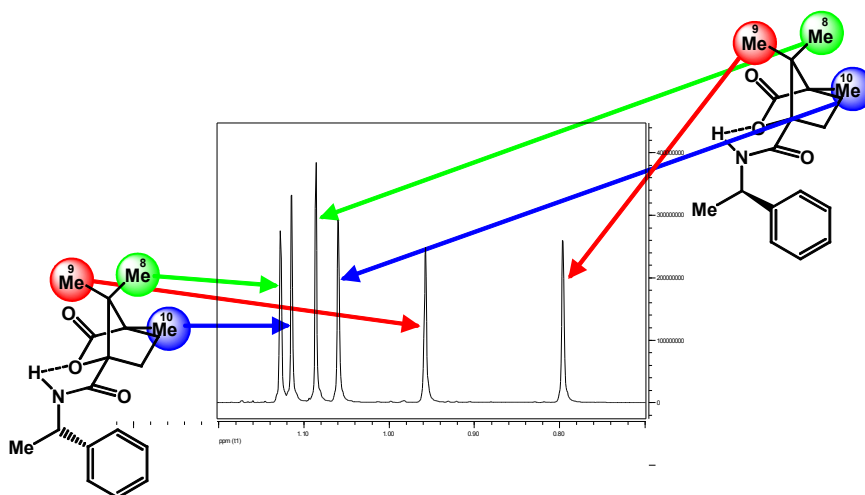
Trotz der strukturellen Verwandtschaft zwischen Hydroxycarbonsäureestern (**380,381**), Aminosäureestern (**235,277**) und *N*-Glutaryl-aminosäureestern (**239,283**) ergeben sich für die Interaktion mit dem chiralen Solvatisierungsreagenz (-)-Chinin (**379**) stark voneinander abweichende Ergebnisse, die auf die unterschiedlichen attraktiven Wechselwirkungen zwischen CSA und Neutralsubstanz, Amin und Carbonsäure zurückzuführen sind. Die unterschiedlichen Affinitäten und Geometrien der untersuchten Substanzen bewirken ein differenziertes Komplexierungsverhalten. So hat auch der Abstand zwischen stereogenem Zentrum und Sonde einen entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß der enantiotopen Aufspaltung. Die Verwendung von chiralen Solvatisierungsreagenzien stellt, wie am Beispiel des Chinins gezeigt, ein zwar einfach anzuwendendes, aber nicht für jedes Mitglied einer Substratklasse geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse dar. Von den untersuchten Substraten ergab sich nur für den 3-Phenyl-3-hydroxy-propionsäuremethylester (**380**) und den *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylester (**283**) eine ausreichende enantiotope Aufspaltung, die in basisliniengetrennten Signalen resultierte und damit eine hinreichende Genauigkeit zur Ermittlung der Enantiomerenverhältnisse erlaubt.

### III.2.3.2.2. Derivatisierung zu Diastereomeren mit (-)-Camphansäurechlorid

Eine Derivatisierung des Analyten in Diastereomere ist die meistverwendete Methode zur kernresonanzspektroskopischen Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen. Aus der Vielzahl der verfügbaren Reagenzien wurde (-)-Camphansäurechlorid (**246**) ausgewählt und auf seine Eignung zur Selektivitätsbestimmung der enzymatischen Hydrolyse durch die Glutaryl-Acylase hin untersucht. Für einige der untersuchten Substrate waren bereits die chemischen Verschiebungen der Camphanoylderivate literaturbekannt, so daß eine direkte Korrelation mit den erhaltenen

### III. Allgemeiner Teil

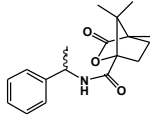
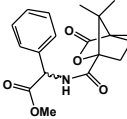
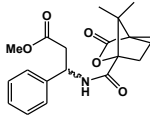
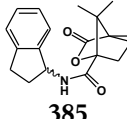
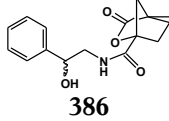
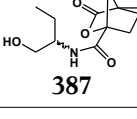
Versuchsergebnissen erfolgen konnte [265],[266]. (-)-Camphansäure verfügt über drei isolierte Methylgruppen, welche bei einer Derivatisierung der Carboxylfunktion mit chiralen Molekülen eine für die jeweiligen Enantiomere unterschiedliche Abschirmung erfahren. Dies resultiert in einer mehr oder weniger ausgeprägten chemischen Verschiebung der diastereotopen Methylsingulets. Durch eine Konformationsanalyse mittels Kernresonanzspektroskopie und molekulardynamischen Simulationen wurde am Beispiel des 1-Phenylethylamin-camphanoylderivats (**382**) die Ursache der enantiotopen Aufspaltung detailliert untersucht [265]. So ist die Rotation um die Bindung zwischen Carbonsäureamidfunktion und dem bicyclischen System durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidproton und dem Lactonsauerstoff weitgehend eingefroren. Diese Ausrichtung maximiert auch die  $\sigma$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Lacton- und Amidgruppierung. Die Methylgruppe des Phenylethylrestes richtet sich in beiden Diastereomeren antiperiplanar zur Carbonylgruppe der Amidfunktion aus. Dies führt zur einer unterschiedlichen konformationellen Ausrichtung des Phenylsubstituenten in Bezug auf die Methylgruppen des Camphanoylrestes. Die magnetische Anisotropie des aromatischen Systems stellt trotz der räumlichen Distanz die eigentliche Ursache für die beobachtete starke Aufspaltung der diastereotopen Methylgruppen dar. Im Fall des (*R*)-1-Phenylethylamin-camphanoylderivates befinden sich diese im magnetisch abschirmenden „Kegel“ des Aromaten und erfahren dadurch eine Hochfeldverschiebung.



**Abb. 102.** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der diastereomeren *N*-Camphanoyl-1-phenylethylamide

Zur Untersuchung der durch Derivatisierung mit dem chiralen Auxiliar bewirkten diastereotopen Aufspaltung wurde eine Reihe Camphanoylamide mit leicht variierenden Strukturmotiven synthetisiert und die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Methylgruppen in den Positionen 8,9 und 10 des Camphanoylrestes bestimmt. Die ermittelten Daten sind im Folgenden tabellarisch zusammengefaßt.

Tab. 46. Chemische Verschiebungen der diastereomeren Camphanoylamide

Camphanoylamid	$\delta$ 8-Me [ppm]		$\Delta\delta$ 8-Me	$\delta$ 9-Me [ppm]		$\Delta\delta$ 9-Me	$\delta$ 10-Me [ppm]		$\Delta\delta$ 10-Me
 382	1.086 (R)	1.128 (S)	0.042	0.796 (R)	0.957 (S)	0.161	1.060 (R)	1.115 (S)	0.055
 383	0.973 (S)	1.038 (R)	0.065	0.740 (S)	0.975 (R)	0.235	1.021 (S)	1.045 (R)	0.024
 384	0.990	1.023	0.033	0.750	0.873	0.123	1.038	1.045	0.007
 385	1.112	1.168	0.056	0.921	0.976	0.055	1.106	1.146	0.040
 386	1.091	1.091	0.000	0.827	0.865	0.038	1.073	1.084	0.011
 387	1.116	1.116	0.000	0.932	0.939	0.007	1.108	1.108	0.000

Am ausgeprägtesten ist die diastereotope Aufspaltung für die Protonen der Methylgruppe in Position 9, welche selbst bei dem keinen Phenylring enthaltende *N*-Camphanoylderivat des 2-Aminobutanols (**387**) noch zu beobachten ist. Eine breite Aufspaltung erfolgt für Derivate **382-385**, die sich formal vom Benzylamin ableiten, da hier eine entsprechende Positionierung des Aromaten in Bezug auf die Methylgruppen erfolgen kann. Das Derivat des „sterisch fixierten“ 1-Aminoindans **385** weist in der Reihe der Benzylaminderivate die geringsten Verschiebungen für 9-Me auf, was auf eine Einschränkung der Rotationsfreiheit des Phenylsubstituenten zurückzuführen ist.

Die für die Methylgruppen in Position 8 und 10 ermittelte Aufspaltung variiert mit der Natur der Substituenten, ist aber abgesehen vom Aminoindanderivat erheblich geringer als für Position 9.

Die Aufspaltung der Singulets der Aminosäuremethylester **383** und **384** beträgt jeweils nur 0.006 ppm.

Problematisch für die Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse ist die Tatsache, daß bei einigen der Camphanoylderivaten die Signale der Methylgruppen sehr dicht beieinander liegen und nicht

### III. Allgemeiner Teil

vollständig basisliniengetrennt sind. Zumindest eines der Methylsignale für Position 9 erfährt aber eine derartige Hochfeldverschiebung, daß es immer weitgehend isoliert betrachtet werden kann. Ähnlich der in II.2.3.1. beschriebenen Vorgehensweise zur kernresonanzspektroskopischen Umsatzbestimmung kann durch Relation mit einem anderen isoliert vorliegenden charakteristischen Signal, z.B. dem des Protons am stereogenen Zentrums, der Anteil des jeweiligen Diastereomers in der untersuchten Probe ermittelt werden.

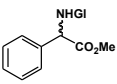
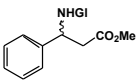

$$\text{Anteil betrachtetes Diastereomer} = \frac{\frac{1}{3} \cdot \text{Integral der diastereotopen Methylprotonen an Position 9}}{\text{Integral des Protons am stereogenen Zentrum}}$$

Die Selektivitätsbestimmung der Hydrolyse der ausgewählten *N*-Glutarylderivate von 1-Phenylethylamin **168**, Phenylglycinmethylester **283** und  $\beta$ -Phenylalaninmethylester **239** erfolgte durch Derivatisierung des Lyophilisats der bei der Umsatzbestimmung isolierten wäßrigen Phase, welche das freigesetzte Produktamin enthält.

#### III.2.3.3. Experimentelle Bestimmung von Umsatz und Enantioselektivität

Die zur näheren Untersuchung ausgewählten *N*-Glutarylamide von 1-Phenylethylamin **168**, Phenylglycinmethylester **283** und  $\beta$ -Phenylalaninmethylester **239** wurden bei 27°C und pH 7.0 mit Glutaryl-Acylase versetzt und der enzymatischen Hydrolyse unterworfen. Reaktionsabbruch, Aufarbeitung und Umsatzbestimmung erfolgten wie unter III.2.3.1. beschrieben. Die Enantiomerenverhältnisse und die absolute Konfiguration wurden durch Derivatisierung mit (-)-Camphorsäurechlorid und Korrelation der NMR-Integrale ermittelt. Das Enantiomerenverhältnis in der unveränderten Eduktfraktion aus der Hydrolyse des *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylesters (**283**) wurde durch Zusatz von circa drei Äquivalenten Chinin bestimmt.

Tab. 47. Daten zur *E*-Wert Bestimmung

Substrat	Integral -CO-CH <sub>2</sub> -	Umsatz [%]	Integral Me-9	<i>ee<sub>P</sub></i>	<i>E</i> -Wert
	7.15	44.1	2.76	84 ( <i>S</i> )	22.8
	4.95	19.1	2.37	58 ( <i>R</i> )	4.3
	4.89	18.2	2.64	76 ( <i>R</i> )	8.7

Das Enantiomerenverhältnis des nicht umgesetzten Phenylglycinmethylesterderivats **283** wurde zu 83:17 oder 66%  $ee_S$  ( $R$ ) bestimmt, rechnerisch resultiert hieraus ein  $E$ -Wert von 22.6.

Die aus den kernresonanzspektroskopischen Daten berechneten  $E$ -Werte deuten darauf hin, daß die GA unter den gegebenen Reaktionsbedingungen bei den gewählten Substraten nur eine mäßige Enantioselektivität aufweist. Im Fall des Phenylglycinmethylesterderivats **283** wurden die Enantiomerenverhältnisse sowohl produkt- als auch eduktseitig durch Derivatisierung bzw. Zusatz des CSA (-)-Chinin (**379**) ermittelt und führten zu fast identischen  $E$ -Werten. Fehlerbehaftet ist diese Methode zur Selektivitätsbestimmung vor allem durch den manuellen Integrationsvorgang. Nachteilig an der kernresonanzspektroskopischen Umsatz- und Selektivitätsbestimmung ist weiterhin die Benötigung einer relativ großen Substanzmenge von ungefähr 10 mg je Analyse, und eine eventuelle Veränderung der zu analysierenden Proben durch die zwischengeschalteten Aufarbeitungsschritte.

#### III.2.4. Umsatz- und Selektivitätsbestimmung durch chromatographische Methoden

Chromatographische Methoden spielen eine dominierende Rolle in der Analytischen Chemie, allen voran die Gas- und die Hochleistungsflüssigchromatographie. Das allgemeine Trennprinzip besteht auf einem Verteilungsgleichgewicht zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Während die mobile Phase in der Gaschromatographie weitgehend auf die Gase Stickstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Argon und deren Mischungen beschränkt ist, eignen sich prinzipiell alle flüssigen Medien für die HPLC. Deren Zusammensetzung werden durch die Beschaffenheit der stationären Phase und das zu lösende Trennproblem bestimmt. Die stationäre Phase selbst ist meist auf eine inerte Kieselgelmatrix fixiert, im einfachsten Fall stellt das Kieselgel selbst die stationäre Phase dar. Als Trägermaterial finden auch unterschiedlich funktionalisierte Polymerharze Verwendung, die jedoch bezüglich Druck- und Temperaturstabilität eingeschränkt sind. Für spezielle Anwendungszwecke, wie extreme Temperatur- oder pH-Bereiche, steht eine Anzahl weiterer inerte Matrices wie Aluminium- oder Zirconiumoxid [267] zur Verfügung. Speziell in der HPLC hat sich eine breite Palette unterschiedlichster auf dem Träger fixierter organischer Stationärphasen etabliert; diese reichen von einfachen Methylgruppen bis zu komplexen Naturstoffen wie Vancomycin [268], von Phenylsulfonsäuren bis zu Polybutadien.

Eine weitere wichtige Rolle kommt der Detektionsmethodik zu. Diese reicht von der Bestimmung des Brechungsindex über Wärme- und elektrische Leitfähigkeit, UV/vis und Fluoreszenzspektroskopie bis zu Ionisations- und Massenspektrometrie.

Die Vorteile der Gaschromatographie liegen in der meist guten Trennleistung (>10000 theoretische

### III. Allgemeiner Teil

---

Böden), der hohen Detektionsempfindlichkeit, der minimalen Analytenmenge und der guten Kombinierbarkeit mit anderen Methoden, wie etwa der Massenspektrometrie. Einschränkungen ergeben sich durch die Notwendigkeit einer Mindest-Flüchtigkeit, welche die Analyse wäßriger Systeme und stark polarer Substanzen extrem einschränkt.

Die hohe Flexibilität bezüglich stationärer und mobiler Phase erlaubt die Lösung der überwältigenden Mehrheit von Trenn- und Analyseproblemen mittels der Hochleistungsflüssigchromatographie. Eine Vielzahl verfügbarer Detektionsmethoden kompensiert die im Vergleich zur GC größeren benötigten Analytmengen.

Von der Entwicklung einer gaschromatographischen Methode zur Umsatzbestimmung wurde aufgrund der wäßrigen Natur des zu analysierenden Systems und der polaren Natur der Produkte und Edukte abgesehen. Die Möglichkeit der Selektivitätsbestimmung durch Ermittlung der Enantiomerenverhältnisse wurde exemplarisch am 1-Phenylethylamin untersucht. Weder für das freie Amin noch seine Acetyl- oder Trifluoracetyl-derivate konnte an einer chiralen  $\beta$ -Cyclodextrinphase eine detektierbare Separation der Enantiomere erreicht werden. Aufgrund dieser Tatsachen wurde zur chromatographischen Umsatz- und Selektivitätsbestimmung vollständig auf Methoden der Hochleistungsflüssigchromatographie zurückgegriffen. Für die Untersuchung der Selektivität der GA wurde die Anzahl der Substrate im Vergleich zur kernresonanzspektroskopischen Selektivitätsbestimmung um drei erhöht, so daß diese neben den *N*-Glutaryl-derivaten von 1-Phenylethylamin **168**, Phenylglycinmethylester **283** und  $\beta$ -Phenylalaninmethylester **239** noch die Derivate von Phenylglycinol **303**, 1-(2-Naphthyl)-ethylamin **172** und Amphetamin **158** umfaßte.

#### **III.2.4.1. Vorgehensweise zur Umsatzbestimmung mittels HPLC**

Um eine möglichst exakte Analyse der enzymatischen Hydrolyse durch die GA vorzunehmen, sollten die Proben weitestgehend unverändert untersucht werden. Bei diesen handelte es sich um wäßrige Lösungen polarer organischer Substanzen. Die Analyse kann prinzipiell durch Umkehrphasen-Chromatographie (RPC) erfolgen, jedoch ergeben sich aufgrund der zu untersuchenden Systeme spezielle Anforderungen an die Methodenentwicklung.

Das Trennprinzip der RP-Chromatographie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht der Analysesubstanzen zwischen einer mehr oder weniger hydrophilen mobilen und einer hydrophoben stationären Ölphase. Die Ölphase besteht zumeist aus an Kieselgel fixierten Octadecyl- oder, weniger häufig, Octylresten. Weiteren Einfluß auf das Verteilungsgleichgewicht haben die Silanolaktivität des Kieselgels und dessen Zusammensetzung, d.h. verschiedene in der

Matrix enthaltene Metallionen. Dies führt zu einem unterschiedlichen Trennverhalten gleicher Umkehrphasen verschiedener Hersteller - im Extremfall erfolgt sogar eine Umkehrung der Elutionsabfolge [269].

Die enzymatische Umsetzung von Glutarylaminen durch die GA führt formal gesehen zur Ausbildung eines Ionenpaares, einem Carboxylat und einem Ammoniumion. Da auch die nichtumgesetzten Edukte eine Carbonsäurefunktionalität beinhalten, bilden diese mit dem durch die Hydrolyse freigesetzten Amin ein weiteres Ionenpaar, welches aufgrund der elektrostatischen Anziehung gemeinsam eluiert [270]. Die Ausbildung von Ionenpaaren kann durch geeignete Modifizierung der mobilen Phase minimiert werden. Dies kann durch Verwendung gepufferter Laufmittel, den Zusatz von Ionenpaarreagenzien wie Alkylsulfonsäuren oder Tetraalkylammoniumsalzen [271], oder eine Kombination beider Verfahren erfolgen [272]. Die freigesetzte Glutarsäure selbst weist eine den Ionenpaarreagenzien ähnliche Struktur auf. Bei der Wahl eines entsprechenden Puffers ist darauf zu achten, daß dieser über schlechte Ionenpaarreagenz-Eigenschaften und eine ausreichende Pufferkapazität für das zu analysierende System verfügt.

Für die Detektion der zu analysierenden Substanzen standen ein Brechungsindex-, ein Lichtstreuungs- und ein UV-Absorptionsdetektor zur Verfügung [273]. Die Verwendung des Brechungsindexdetektor ist nicht an die Existenz von Chromophoren in den zu detektierenden Molekülen gebunden. Nachteilig sind jedoch die geringe Stabilität des erhaltenen Signals aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit der Meßgröße und der Bedarf an relativ großen Mengen an Analyt ( $\sim 0.7 \text{ mg/mL}$ ). Der Lichtstreuungsdetektor ist ebenso universell verwendbar wie der Brechungsindexdetektor, jedoch ergeben sich aufgrund des Detektionsprinzips durch die Auswahl der mobilen Phase Einschränkungen bezüglich der bestimmbar Substanzen. Eine weitere Einschränkung betrifft die Verwendung gepufferter Laufmittelsysteme, da diese zu Salzablagerungen in der Detektorzelle führen können. Die Verwendbarkeit des selektiven UV-Absorptionsdetektors ist an das Vorhandensein von Chromophoren gekoppelt. Die minimalen Nachweisgrenzen liegen aber bei vergleichbarer Linearität um drei Größenordnungen niedriger als beim Brechungsindexdetektor. Die variable Wellenlängeneinstellung verbessert zusätzlich die Nachweisempfindlichkeit, da am Punkt des Absorptionsmaximums gemessen werden kann.

Unter den vorher aufgeführten Gesichtspunkten wurden Methoden für die Umsatzbestimmung verschiedener Glutaryl-Acylase-vermittelter Reaktionen entwickelt. Eine in der Literatur beschriebene Methode zur simultanen Bestimmung von Glutarsäure, Phenylephrin und

### III. Allgemeiner Teil

---

Benzylalkohol konnte, bedingt durch die Struktur der Analyten und der UV-Transparenz der verwendeten Elutionsmittel, nicht adaptiert werden [274].

Die Probenpräparation erfolgte durch Entnahme eines bestimmten Reaktionsvolumens und Mischen mit vier Volumen Acetonitril zur Enzymdenaturierung.

Als stationäre Phasen fanden ein octyl- und drei octadecyl-derivatisierte Kieselgele verschiedener Hersteller Verwendung. Die isokratische Elution wurde mit binären Laufmittelmischungen aus Acetonitril oder Methanol als organischer Komponente und 0.1 M Natriumphosphat- oder Ammoniumacetatpuffern sowie 40 mM Ameisensäurelösung definierter pH-Werte durchgeführt. Der in Vorversuchen verwendete Triethylammoniumacetatpuffer besaß keine ausreichende Pufferkapazität, um die Ionenpaarbildung in den untersuchten Proben zu unterbinden.

Durch die Beschränkung auf UV-aktive Substrate erfolgte die Detektion von Edukt und freigesetztem Amin durch Messung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge zwischen 254 und 291 nm. Aus dem Quotienten der für Amin und Glutarylderivat ermittelten Absorption wurde anhand einer Kalibrationskurve der Umsatzgrad bestimmt. Im Fall der vom Benzylamin abgeleiteten Substrate unterscheiden sich die Absorptionsmaxima von acyliertem und freiem Amin erheblich, so daß eine einfache Korrelation der Absorptionsintegrale nicht mehr vertretbar ist. Zusätzlich wird die Lage der Absorptionsmaxima noch von der Zusammensetzung des Lösungsmittels und dem pH-Wert beeinflusst.

#### **III.2.4.2. Vorgehensweise zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse mittels HPLC**

Die chromatographische Trennung optischer Antipoden beruht auf der Wechselwirkung mit einer chiralen stationären Phase. Die Anzahl der kommerziell verfügbaren chiralen Stationärphasen ist beträchtlich, wobei sich das Gros dieser von diversen Naturstoffen wie Kohlenhydraten, Aminosäuren oder Alkaloiden ableitet [275]. Die Art der attraktiven Wechselwirkungen ist vielfältig. Diese reichen von einfachen Wasserstoffbrückenbindungen über  $\pi\pi$ -Interaktionen [276] bis zur Komplexbildung mit Übergangsmetallionen [277]; oftmals ergeben sich Synergien und die Selektivität der Stationärphase kann durch die Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflusst werden.

Von den untersuchten chiralen Stationärphasen (3,5-Dinitrobenzoyl)-L-phenylglycin, L-Hydroxyprolin, permethyliertes  $\beta$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -Cyclodextrin und Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) zeigten die beiden Letzteren die besten Enantioseparationen für die untersuchten Produktamine und die umfangreichste Kompatibilität mit verschiedensten Laufmittelsystemen. Mit Ausnahme des Phenylglycinols (**299**) konnten alle Proben ohne weitere

Derivatisierung analysiert werden. Im Fall des Phenylglycinols (**299**) stört anscheinend die vicinale Anordnung zweier stark polarer Substituenten die Wechselwirkung mit der chiralen Stationärphase. Eine Überführung in das Peracetylderivat zur Verminderung des polaren Charakters des Analyten ermöglichte eine erfolgreiche Trennung der Enantiomere.

Die Probenpräparation erfolgte durch Lyophilisierung der für die Umsatzbestimmung verwendeten Proben. Das Lyophilisat wurde anschließend mit einem bestimmten Volumen der mobilen Phase versetzt und die erhaltene Lösung analysiert.

### III.2.4.3. Umsatzbestimmung der Hydrolyse verschiedener *N*-Acyl-*p*-nitroanilide

Analog zu den in III.2.2.1. beschriebenen Untersuchungen wurde die enzymatische Hydrolyse verschiedener *N*-Acyl-*p*-nitroanilide bei 30°C und pH 8.0 durchgeführt und der jeweilige Umsatz mittels HPLC quantifiziert. Dabei wurde die UV-Absorption für Anilid und Nitroanilin bei  $\lambda = 254$  nm ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Der Umsatz wurde zu

$$\text{Umsatz} = \frac{\text{Absorption } p\text{-Nitroanilin}}{\text{Absorption Nitroanilid} + \text{Absorption } p\text{-Nitroanilin}}$$

definiert. In Parallelversuchen wurden auch Vergleichsproben mit Albumin aus Rinderserum als katalytisch inaktivem Referenzprotein untersucht, um das Ausmaß einer möglichen Spontanhydrolyse quantifizieren zu können.

Neben Glutaryl- (**69**) wurden auch Succinyl- (**70**), Adipoyl- (**71**) (Adp-PNA) und 5-Glutamyl-*p*-nitroanilid (**20**) (Gm-PNA) auf ihre Hydrolyse durch GA hin untersucht.

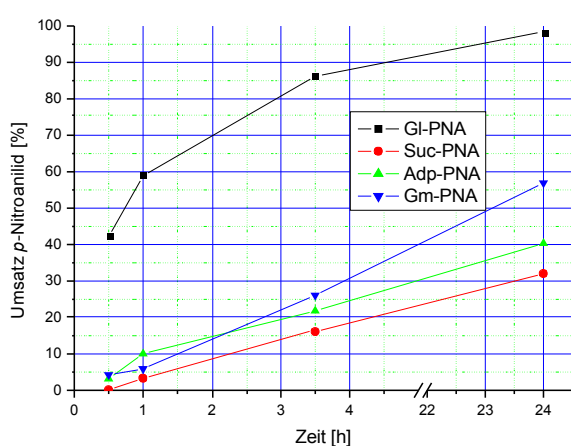


Abb. 103. Gemessener Umsatzverlauf

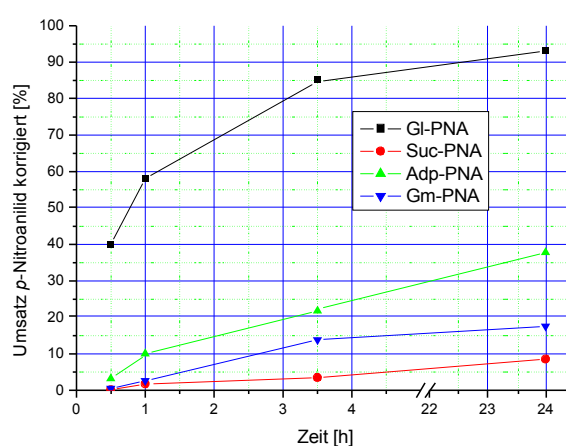


Abb. 104. Korrigierter Umsatzverlauf

Die für die Referenzproben ermittelten „Umsatz“-Werte wurden von den entsprechenden Umsätzen der mit GA inkubierten Proben subtrahiert um den Anteil der chemischen Hydrolyse zu eliminieren.

### III. Allgemeiner Teil

Ein signifikantes Maß an spontaner Hydrolyse war vor allem bei den Succinyl- und Glutamyl-Resten zu beobachten. Mit fortschreitender Reaktionszeit erfolgte eine zunehmende Enzymdeaktivierung, so daß im Fall der Bernstein- und Glutaminsäurederivate (**70,20**) zum Ende der Anteil der unkatalysierten Hydrolyse dominierte. Ein weitaus geringeres Maß an nicht-enzymatischer Hydrolyse wurde für den Glutaryl- und Adipoyl-Rest beobachtet.

Zur Berechnung der relativen Hydrolyserate wurden die korrigierten Umsatzwerte für 0.5 und 1 Stunde auf den entsprechenden Wert für Gl-PNA **69** bezogen und diese gemittelt. Die für die Berechnung berücksichtigten Meßwerte entsprechen bezüglich der Reaktionszeit in etwa den Meßreihen der Umsatzbestimmung durch die Freisetzung von *p*-Nitroanilin (**19**).

Tab. 48. Ermittlung der relativen Hydrolyserate

Substrat	Umsatz [%]		Umsatz korrigiert [%]		Relativer Umsatz [%]		Gemittelter Umsatz [%]
	0.5 h	1.0 h	0.5 h	1.0 h	0.5 h	1.0 h	
Glutaryl-PNA	42.15	58.85	40.05	58.12	100	100	100
Succinyl-PNA	0.14	3.31	0.09	1.55	0.22	2.67	1.45
Adipoyl-PNA	3.19	10.04	3.19	10.04	7.97	17.27	12.62
Glutamyl-PNA	4.24	5.94	0.46	2.61	1.15	4.49	2.82

Ein Vergleich der mittels HPLC quantifizierten relativen Hydrolyseraten mit jenen, welche durch Freisetzung von PNA **19** ermittelt wurden, zeigt auf den ersten Blick eine relativ große Übereinstimmung. Jedoch ist zu berücksichtigen, daß die Hydrolysen in einem jeweils anderen pH- und Temperaturbereich durchgeführt wurden, und in einem Fall die spontane Hydrolyse nicht quantitativ erfaßt werden konnte.

Tendenziell bestätigte sich jedoch die kinetische Kontrolle der Hydrolyse von Succinyl-*p*-nitroanilid (**70**). Der mittels HPLC bestimmte relative Umsatz von 1.45% bei 30°C korreliert sehr gut mit einer linearen Abnahme der in 2.2.2.1. ermittelten relativen Hydrolyserate von 2.4% bei 25°C auf 0.9% bei 37°C. Auch die Umsetzung des 5-Glutamylderivats **20** erfolgt bedingt durch elektrostatische Repulsionen in der Glutarylbindetasche des Enzymes mit einer um etwa zwei Größenordnungen geringeren Geschwindigkeit. Dieser Befund unterscheidet sich von den von *Biffi* [109] mit der *Recordati*-GA durchgeführten Hydrolyseexperimenten, die für die Umsetzung von Gm-PNA **20** und Gl-PNA **69** ein Geschwindigkeitsverhältnis von 0.023 : 0.025 ermittelten. Vermutlich liegt die Ursache in der unterschiedlichen Beschaffenheit der Glutarylbindetasche, da die Enzyme der verschiedenen Hersteller mit großer Wahrscheinlichkeit auf Genen aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen basieren.

Die Hydrolyse des Adipinsäureamids **71** erfolgt mit nur circa 13% der für das Glutarylderivat beobachteten Geschwindigkeit, aber um den Faktor 9 schneller als das Bernsteinsäureanalogon **70**. Zwar ist der Abstand zwischen Carboxyl- und Amidfunktion groß genug, um eine starke polare Wechselwirkung mit den Aminosäureresten am Boden der Glutarylbindetasche, und damit einen stabilen Enzym-Substrat-Komplex, zu ermöglichen. Jedoch scheint sich die Amidfunktion nun in einer ungünstigen Position bezüglich des katalytisch aktiven Serinrestes, zu befinden.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen der Hydrolyse und der Quantifizierung der Hintergrundreaktionen zeigen jedoch beide Umsatzbestimmungsmethoden ein befriedigend ähnliches Bild der Abhängigkeit zwischen struktureller Variation und Umsatzgeschwindigkeit der Acylkomponente von GA-Substraten.

#### III.2.4.4. Umsatz- und Selektivitätsbestimmung der Hydrolyse chiraler Glutarylamide

Zur Ermittlung der Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse durch die Glutaryl-Acylase wurde die Umsetzung von sechs verschiedenen chiralen Substraten näher untersucht. Die Struktur der Glutarylamide ist hierbei jeweils diskret variiert, um den Einfluß verschiedener Substituenten sowie deren Distanz zum stereogenen Zentrum auf die Enantiomerelektivität der enzymatischen Hydrolyse bestimmen zu können.

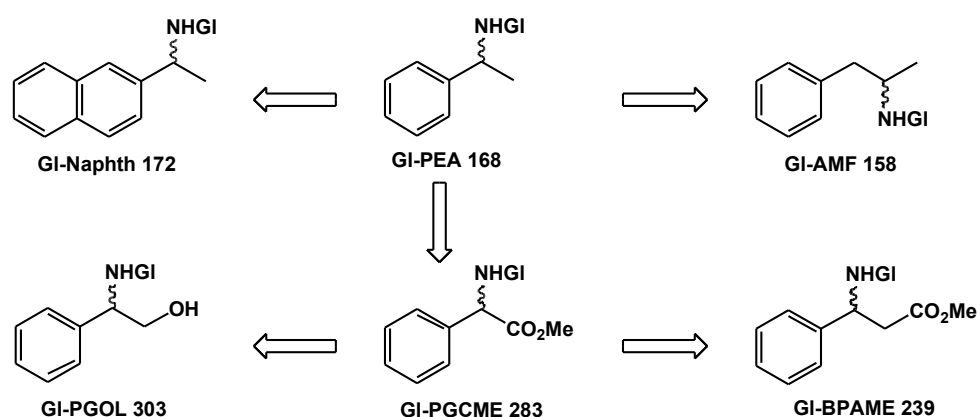


Abb. 105. Variation der Substituenten

Für einige Substrate wurde zusätzlich der Einfluß von pH-Wert und dem Kosolvens Methanol auf die Enantioselektivität der enzymatischen Amidhydrolyse untersucht. Die Hydrolysen wurden in thermostatierten Reaktoren bei jeweils konstantem pH-Wert durchgeführt, mit 0.1 M Natriumcarbonat-Lösung als alkalischem Titrationsmedium. Die Umsatz- und Enantiomerenverhältnisse aus in bestimmten zeitlichen Abständen entnommenen Proben sind im Folgenden graphisch dargestellt. Diese repräsentieren den Mittelwert aus jeweils mindestens drei separaten Messungen. Aus den erhaltenen Daten läßt sich der *E*-Wert berechnen, der die

### III. Allgemeiner Teil

---

Enantioselektivität des Enzyms im untersuchten Reaktionssystem widerspiegelt.

#### III.2.4.4.1. Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-phenylethylamin

Für die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-phenylethylamin (**168**) wurde die Abhängigkeit des Umsatzes und der Enantioselektivität vom pH-Wert des Reaktionsmediums untersucht.

##### III.2.4.4.1.1. pH-Abhängigkeit des Umsatzverlaufs

Zunächst wurde der Umsatzverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert des Reaktionsmediums bei 37°C untersucht. Dabei wurde der pH-Wert zwischen 7.0 und 8.5 variiert.

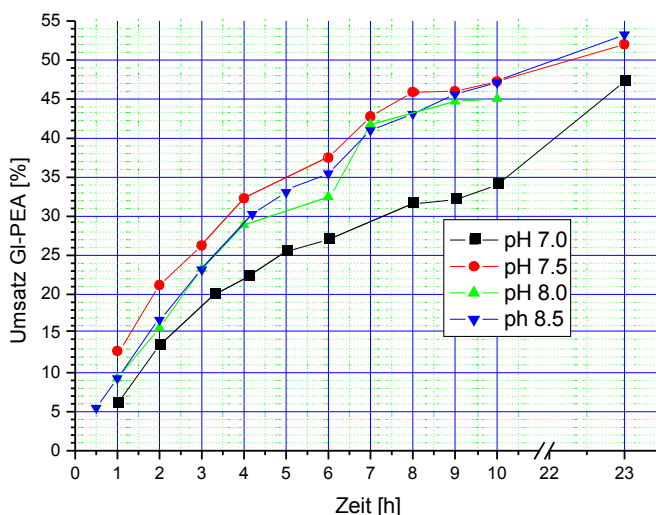


Abb. 106. Hydrolyse von Gl-PEA bei verschiedenen pH-Werten

Hierbei zeigt sich, daß die Umsatzgeschwindigkeit bei pH 7.0 erwartungsgemäß am niedrigsten ist. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit für die Hydrolyse von Gl-PEA (**168**) wird bei pH 7.5 beobachtet, während die Werte für pH 8.0 und 8.5 etwas geringer und voneinander nur wenig verschieden sind. Gemäß den Herstellerangaben liegt das pH-Optimum für die Hydrolyse von Gl-7-ACA (**18**) bei 8.0, so daß die Differenz der pH-Optima auf unterschiedliche Wechselwirkungen der jeweiligen Aminteils des Substrats zurückzuführen sein könnte.

##### III.2.4.4.1.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0

Die Bestimmung des Umsatzes und der Enantioselektivität bei pH 7.0 und 37°C erfolgte in drei Ansätzen. In einem Langzeitversuch wurde das Ausmaß der Enzymdeaktivierung von GA untersucht. Die Entwicklung des Umsatzes und der Enantioselektivität bei Nachdosierung von GA

wurde in einem weiteren Langzeitversuch bestimmt. Aufgrund des geringen Verbrauches an Titrationsmedium erfolgte die Probenahme im Abstand von mehreren Stunden.

### 1. Ansatz, Laufzeit 33 Stunden

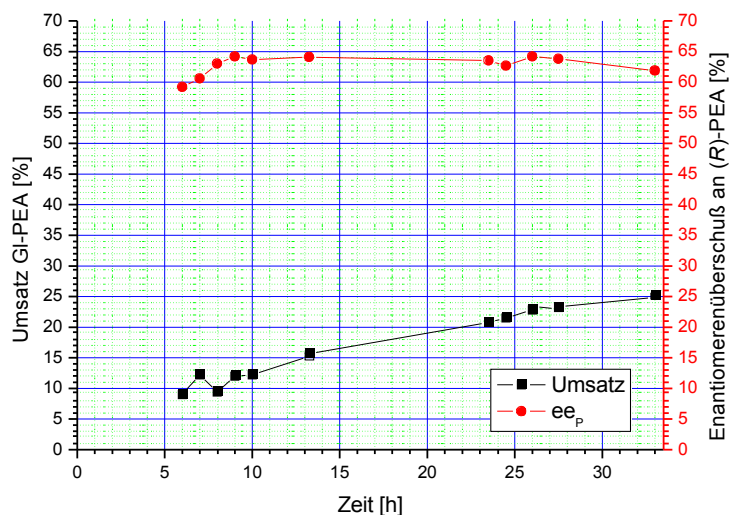


Abb. 107. Hydrolyse von GI-PEA, pH 7.0, Ansatz 1

Für den ersten Ansatz ergibt sich aus den ermittelten Umsatz- und Enantiomerenverhältnissen ein durchschnittlicher *E*-Wert von 5.0.

### 2. Ansatz, Laufzeit 117 Stunden

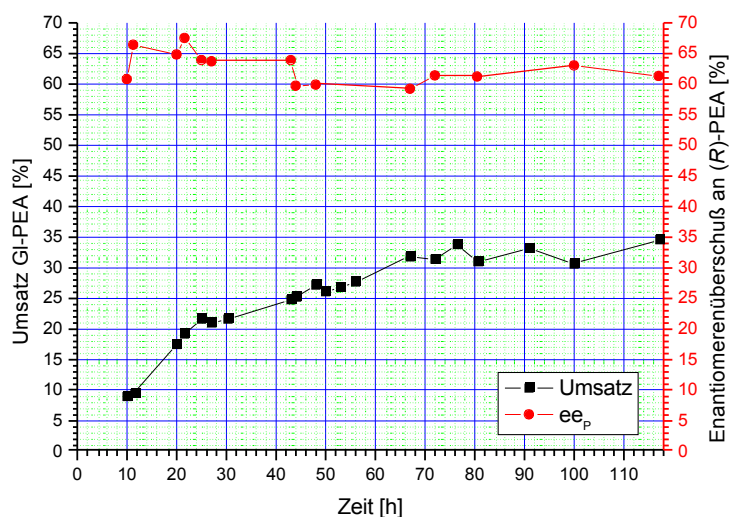


Abb. 108. Hydrolyse von GI-PEA, pH 7.0, Ansatz 2

Für den zweiten Ansatz ergibt sich aus den experimentellen Umsatz- und Enantiomerenverhältnissen ein gemittelter *E*-Wert von 5.3. Der Umsatz stagnierte ab circa 60 Stunden Reaktionszeit, was auf eine nahezu komplette Enzymdeaktivierung hindeutete.

3. Ansatz, Reaktionszeit 138 Stunden, GA Nachdosierung nach 48 und 96 Stunden

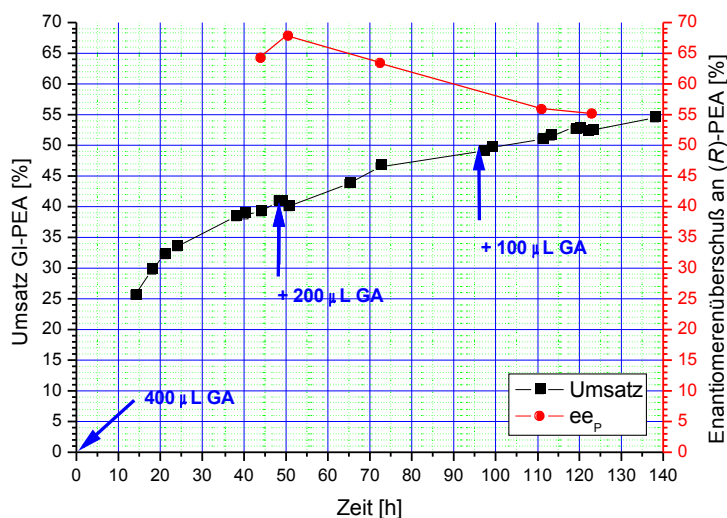


Abb. 109. Hydrolyse von GI-PEA, pH 7.0, Ansatz 3

Für den dritten Ansatz ergibt sich aus den bestimmten Umsatz- und Enantiomerenverhältnissen ein gemittelter *E*-Wert von 7.0. Die Nachdosierung von GA beim Erreichen des Stagnationsbereiches führte zwar zur Steigerung des Umsatzes, jedoch in geringerem Umfang als erwartet.

III.2.4.4.1.3. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0

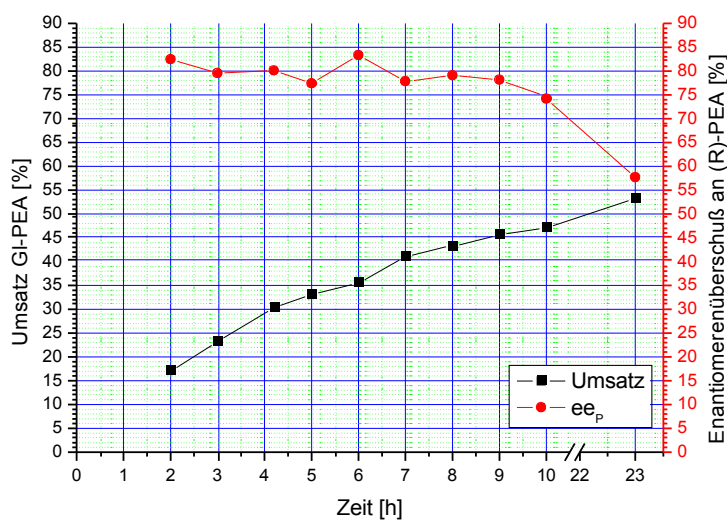


Abb. 110. Hydrolyse von GI-PEA bei pH 8.0

Für die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-phenylethylamin (**168**) bei pH 8.0 und 37°C ergibt sich eine deutliche Veränderung der Enantioselektivität. So lag der ermittelte durchschnittliche *E*-Wert bei 13.7 anstatt nur um 5.0 – 7.0 bei pH 7.0.

#### III.2.4.4.2. Untersuchung der Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylester durch GA

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinmethylester (**283**) erfolgte bei pH 8.0 und 37°C, mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Methanol als Kosolvens.

##### 1. Hydrolyse ohne Kosolvens Methanol

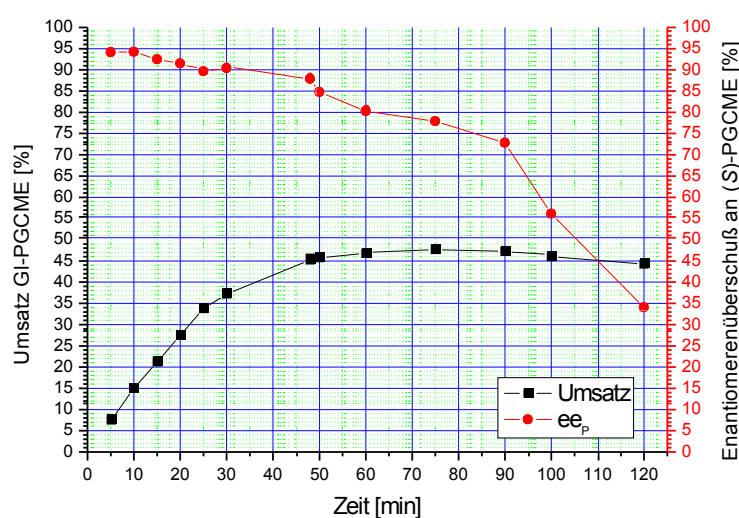


Abb. 111. Hydrolyse von Gl-PGCME, pH 8.0 ohne Kosolvens

Der Umsatz durchlief bei circa 75 Minuten Reaktionszeit ein Maximum um danach abzufallen, was nur auf die zunehmende chemische Esterhydrolyse des primär freigesetzten Phenylglycinmethylesters (**277**) zurückzuführen ist. Das entstandene Phenylglycin wurde als weiteres Signal im Chromatogramm detektiert.

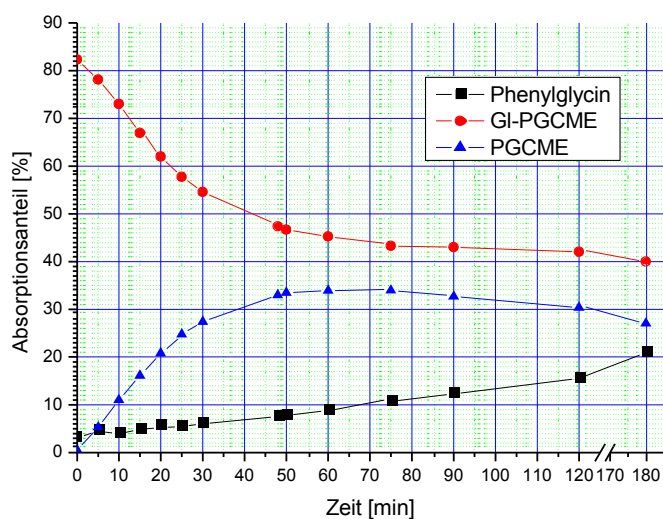


Abb. 112. Absorptionsverlauf, pH 8.0 ohne Kosolvens

Zur Berechnung der Enantioselektivität wurden daher nur die Meßwerte für den weitgehend linearen Reaktionsverlauf zwischen 5 und 30 Minuten berücksichtigt; aus diesen resultiert ein *E*-Wert von 33.8.

#### 2. Hydrolyse mit Methanol als Kosolvens

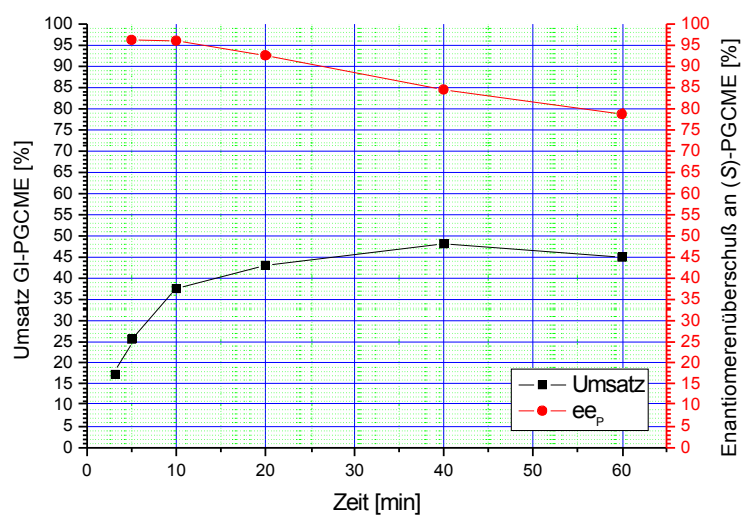


Abb. 113. Hydrolyse von GI-PGCME, pH 8.0 mit Kosolvens

Der Zusatz von 10% Methanol als Kosolvens bei der Hydrolyse von *N*-Glutarylphenylglycinmethylester (**283**) hatte zwei positive Effekte. Zum Einen erfolgte eine signifikante Steigerung der Enantioselektivität, da der gemittelte *E*-Wert 71.7 beträgt, zum Anderen wurde die chemische Folgehydrolyse des freigesetzten Phenylglycinmethylesters (**277**) erheblich verlangsamt.

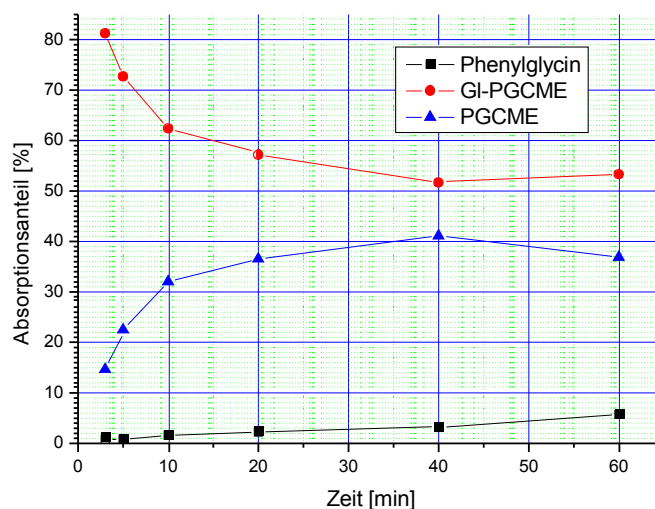


Abb. 114. Absorptionsverlauf , pH 8.0 mit Kosolvens

### III.2.4.4.3. Untersuchung der Hydrolyse von *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester durch die GA

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester (**239**) erfolgte entsprechend den Untersuchungen des Phenylglycinderivats (**283**) bei pH 8.0 und 37°C, jeweils mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Methanol als Kosolvens.

#### 1. Hydrolyse ohne Kosolvens Methanol

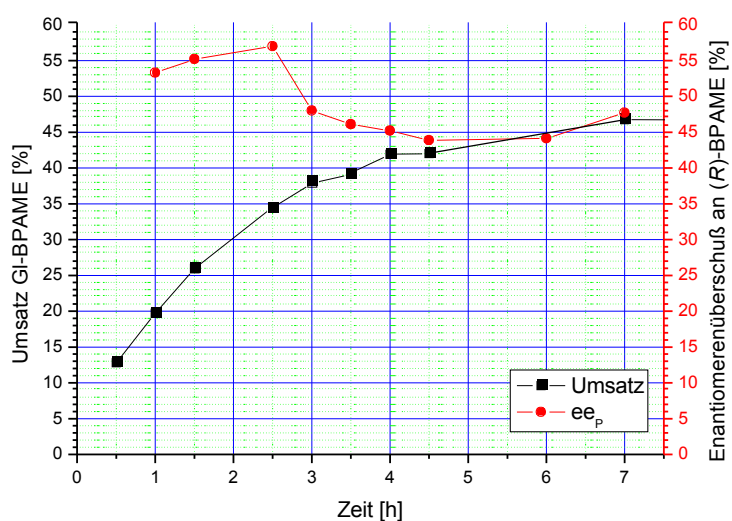


Abb. 115. Hydrolyse von GI-BPAME, pH 8.0 ohne Kosolvens

Die Hydrolyse von *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester (**239**) erfolgt mit mäßiger

### III. Allgemeiner Teil

Enantioselektivität. Da auch bei diesem Substrat eine konkurrierende chemische Hydrolyse des Methylrestes **235** erfolgt, wurden zur Berechnung der  $E$ -Werte nur die Meßwerte bis 2.5 Stunden Reaktionszeit berücksichtigt. Aus diesen resultiert ein gemittelter  $E$ -Wert von 4.3.

#### 2. Hydrolyse mit Methanol als Kosolvens

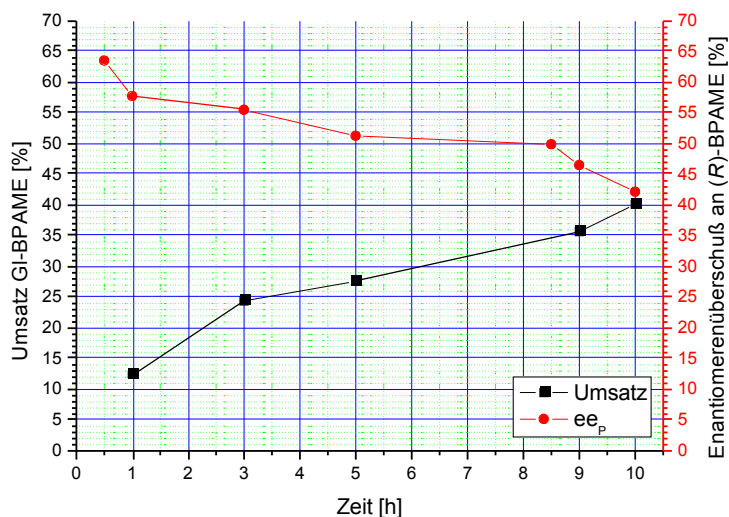


Abb. 116. Hydrolyse von Gl-BPAME, pH 8.0 mit Kosolvens

Die Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse von *N*-Glutaryl- $\beta$ -phenylalaninmethylester (**239**) wurde durch den Zusatz von Methanol nicht signifikant beeinflusst, der gemittelte  $E$ -Wert liegt bei 3.9. Allerdings war durch die verlängerte Reaktionszeit mit einem höheren Anteil an freiem  $\beta$ -Phenylalanin (**56**) durch chemische Hydrolyse zu rechnen.

#### III.2.4.4.4. Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol (**303**) wurde auf ihre Enantioselektivität hin bei pH 7.0 und 8.0 untersucht. Bei pH 8.0 wurde zusätzlich der Einfluß des Kosolvens Methanol ermittelt. Zur Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse erfolgte eine Derivatisierung durch Peracetylierung des Lyophilisats der für die Umsatzbestimmung präparierten Proben.

##### III.2.4.4.4.1. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 7.0

Die Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol (**303**) wurde bei 37°C durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine GA-Nachdosierung nach 12 und 29 Stunden.

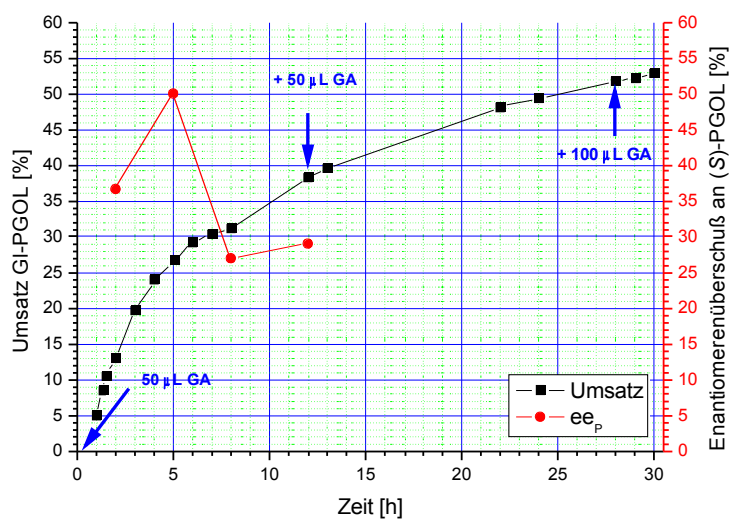


Abb. 117. Hydrolyse GI-PGOL, pH 7.0

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol (**303**) verlief mit nur sehr mäßiger Enantioselektivität, der gemittelte *E*-Wert beträgt 2.5.

#### III.2.4.4.2. Umsatz und Enantioselektivität bei pH 8.0

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol (**303**) bei pH 8.0 wurde wieder mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Methanol als Kosolvens bei 25°C durchgeführt.

##### 1. Hydrolyse ohne Kosolvens Methanol

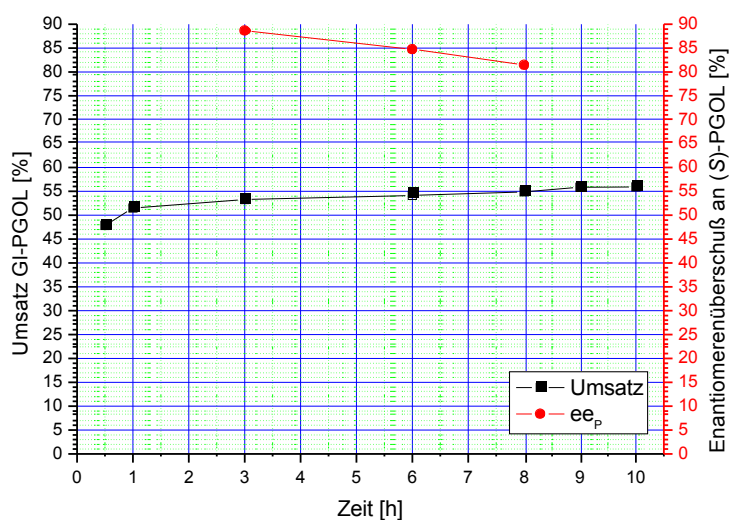


Abb. 118. Hydrolyse von GI-PGOL, pH 8.0 ohne Kosolvens

Die Anhebung des pH-Wertes von 7.0 auf 8.0 führte zu einer enormen Steigerung der

Enantioselektivität, der gemittelte  $E$ -Wert lag nun bei 108.6.

#### 2. Hydrolyse mit Methanol als Kosolvens

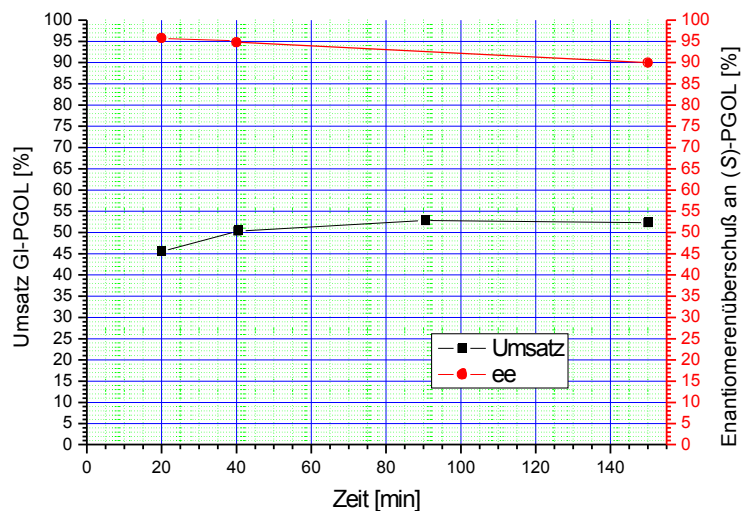


Abb. 119. Hydrolyse von GI-PGOL, pH 8.0 mit Kosolvens

Die Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylglycinol (**303**) erfuhr durch den Zusatz von Methanol nur eine sehr geringe weitere Steigerung der Enantioselektivität, der gemittelte  $E$ -Wert beträgt 119.3.

Insgesamt erfolgte ein sehr rascher Umsatz bis circa 50%, danach verlangsamte sich die enzymatische Hydrolyse erheblich. Die für das Produkt **299** ermittelten Enantiomerenüberschüsse liegen anfangs sehr hoch. Die hochselektive Hydrolyse von (*S*)-GI-PGOL ermöglicht die kinetische Racematspaltung dieser und ähnlicher Komponenten.

III.2.4.4.5. Untersuchung der Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin durch GA

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin (**172**) bei pH 8.0 wurde mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Methanol als Kosolvens bei 25°C durchgeführt.

## 1. Hydrolyse ohne Kosolvens Methanol

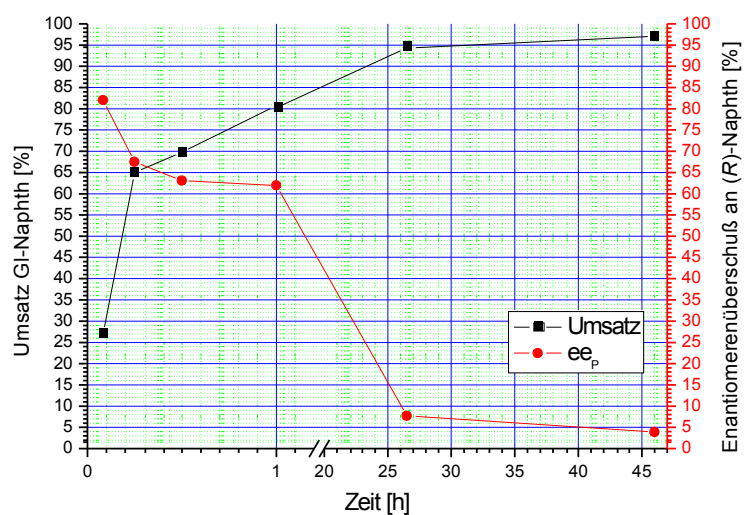


Abb. 120. Hydrolyse von Gl-Naphth, pH 8.0 ohne Kosolvens

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin (**172**) verlief mit moderater Enantioselektivität, der *E*-Wert beläuft sich auf 13.0.

## 2. Hydrolyse mit Methanol als Kosolvens

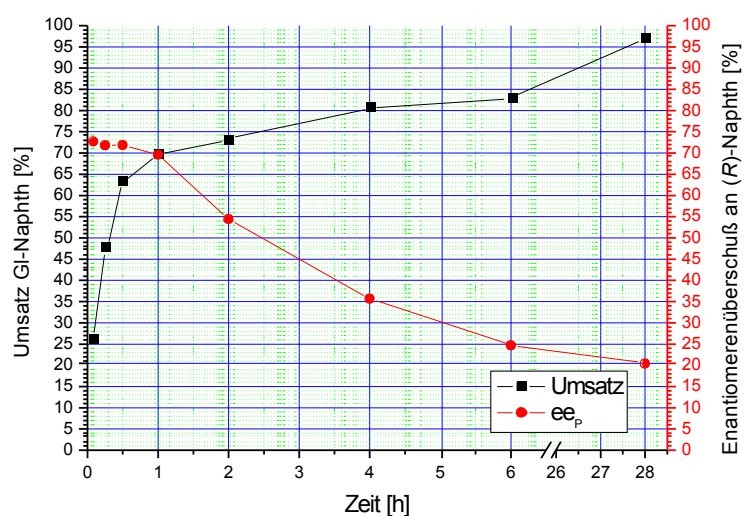


Abb. 121. Hydrolyse von Gl-Naphth, pH 8.0 mit Kosolvens

Die Hydrolyse von *N*-Glutaryl-1-(2-naphthyl)-ethylamin (**172**) erfuhr durch den Zusatz von

### III. Allgemeiner Teil

Methanol keine Steigerung der Enantioselektivität, sondern verringerte sich geringfügig. Der gemittelte  $E$ -Wert beträgt 10.1.

#### III.2.4.4.6. Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von *N*-Glutaryl-Amphetamin

Die enzymatische Hydrolyse von *N*-Glutaryl-Amphetamin (**158**) bei pH 8.0 wurde unter Zusatz von 10% (v/v) Methanol als Kosolvens bei 25°C durchgeführt.

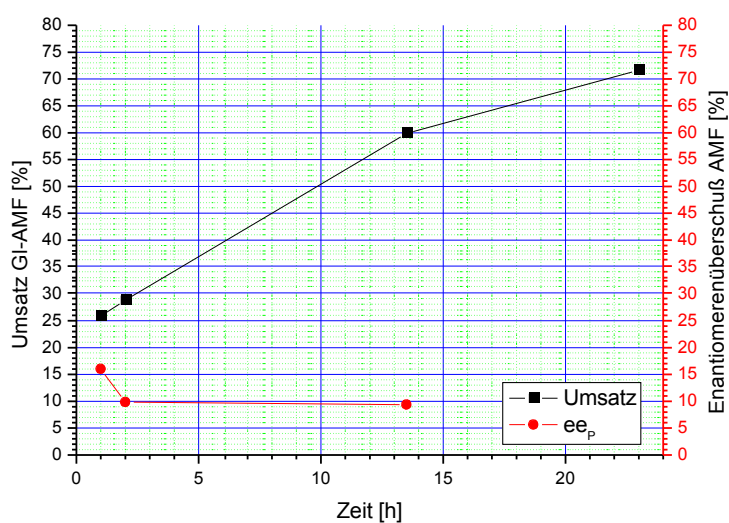


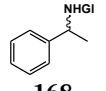
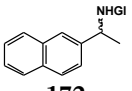
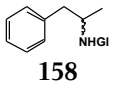
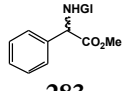
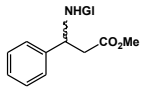
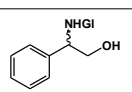
Abb. 122. Hydrolyse von Gl-AMF, pH 8.0 mit Kosolvens

Die Enantioselektivität der Hydrolyse von *N*-Glutaryl-Amphetamin (**158**) ist nahezu vernachlässigbar, der gemittelte  $E$ -Wert beträgt nur 1.4.

## III.2.4.4.7. Interpretation der ermittelten Enantioselektivität

Aus den ermittelten Daten lassen sich Faktoren identifizieren, welche die Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse durch die Glutaryl-Acylase beeinflussen. Im Folgenden sind experimentellen Befunde nochmals tabellarisch zusammengefaßt.

Tab. 49. Enantioselektivität der Umsetzung verschiedener Substrate

Substrat	<i>E</i> -Wert im Reaktionsmedium		
	pH 7.0	pH 8.0	pH 8.0, 10% MeOH
 168	5.0 – 7.0	13.7	/
 172	/	13.0	10.1
 158	/	/	1.4
 283	/	33.8	71.7
 239	/	4.3	3.9
 303	2.5	108.6	119.3

Der Einfluß des Reaktionsmediums auf die Enantioselektivität der hydrolytischen Umsetzungen durch die GA wurde anhand der Variation zweier Parameter untersucht, der Veränderung des pH-Werts [209] und dem Zusatz eines Kosolvens [278]. Enzyme bestehen als biologische Makromoleküle aus Hunderten miteinander verknüpfter Aminosäuren, die eine Vielzahl von polaren und apolaren Funktionalitäten beinhalten. Jedes dieser Makromoleküle wurde im Laufe der Evolution für ganz bestimmte Mikroumgebungen adaptiert und besitzt daher ein charakteristisches pH- und Temperaturoptimum. Der pH-Wert bestimmt den Ionisationsstatus des Enzyms und damit zum Teil auch dessen Tertiärstruktur und konformative Dynamik, da diese unter anderem auch durch elektrostatische Wechselwirkungen der Aminosäurereste stabilisiert werden [52]. Erfolgt eine Beeinflussung der Faltung des aktiven Zentrums, so geht meist die ideale „Schloß und Schlüssel“-Beziehung [28] verloren, was in einer reduzierten Reaktionsgeschwindigkeit resultiert. Diese Verminderung findet stärker zu Lasten des favorisierten Enantiomers statt und führt somit zu

### III. Allgemeiner Teil

---

einer Verringerung der Enantioselektivität. Im Fall der Glutaryl-Acylase liegt das pH-Optimum der Hydrolyse des enantiomerenreinen GI-7-ACA **18** bei 8,0, und auch die ermittelten Enantioselektivitäten liegen bei pH 8,0 zum Teil beträchtlich höher als bei pH 7,0. Jedoch zeigt sich bei der Hydrolyse von GI-PEA **168**, daß für dieses Substrat die Maximalgeschwindigkeit bei einem pH-Wert von 7,5 erreicht wird. Eine vergleichende Betrachtung der Molekülstrukturen der Aminokomponenten PEA und 7-ACA **17** zeigt das erstere einen geringeren Raumbedarf und eine höhere Hydrophobizität aufweist.

Der Zusatz von organischen Lösungsmitteln zu wäßrigen Reaktionssystemen führt im Allgemeinen zu einer Verminderung der Enzymaktivität. Dies wird durch die Funktion des Wassers als „molekularem Schmierstoff“ erklärt, der einer Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen räumlich benachbarten Aminosäuren entgegenwirkt [56]. Wird nun der „Schmierstoff“ durch ein organisches Lösungsmittel ersetzt, vermindert sich durch verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen die Flexibilität des Proteins. Die starrere Konformation reduziert aber zugleich die Fähigkeit zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes zwischen Protein und dem nicht-favorisierten Enantiomer. Bei einer verringerten Gesamtaktivität sollte sich somit die Enantioselektivität erhöhen. Ein weiterer Effekt der Verwendung von Kosolventien besteht in der Erniedrigung der Durchtrittsbarriere zwischen hydrophilem Reaktionsmedium und dem stärker hydrophoben aktiven Zentrum. Mit einer Verminderung des hydrophilen Charakters des Reaktionsmediums gewinnt die Ausbildungsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes mehr Gewicht an der resultierenden Gesamtreaktionsgeschwindigkeit.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Enantioselektivität wird am deutlichsten bei der Umsetzung des Phenylglycinolderivats **303**. Von einem sehr geringen  $E=2.5$  springt der Wert auf 108,6. Deutlich, wenn auch weniger drastisch, verläuft die Entwicklung auch bei der Hydrolyse von GI-PEA **168**, wo ein Anstieg von 5,0 auf 13,7 zu verzeichnen ist. Der Effekt, der durch die Verwendung von Kosolventien hervorgerufen wird, ist am deutlichsten bei der Hydrolyse von GI-PGCME **283** zu beobachten. Hier erfolgt ein Anstieg des  $E$ -Werts von 33,8 auf 71,7, auch bei der Umsetzung von GI-PGOL **303** erfolgt eine weitere Steigerung der Enantioselektivität auf 119,3. Anscheinend gegenläufig ist die Tendenz bei der Hydrolyse von GI-Naphth **172**, hier ist ein geringer Abfall der Enantioselektivität zu beobachten. Diese Entwicklung resultiert vermutlich aus dem stark hydrophoben Charakter des Naphthylsubstituenten, der vom hydrophilen Reaktionsmedium quasi in die weniger hydrophile Enzymtasche gedrängt wird [52]. Die Kosolvonzugabe verringert die Hydrophilie des Reaktionsmediums und damit die repulsiven Wechselwirkungen mit dem Substrat GI-Naphth.

Den entscheidenden Einfluß auf Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse durch die GA haben jedoch die Art und Größe der Substituenten am stereogenen Zentrum. Als allgemeine Tendenz läßt sich für die Mehrzahl der Enzyme eine Korrelation zwischen dem Unterschied des sterischen Anspruchs der Substituenten am stereogenen Zentrum und der beobachteten Enantioselektivität feststellen. Je ausgeprägter der Größenunterschied, desto signifikanter die Enantiodifferenzierung. Diese Tendenz bestätigt sich auch bei den Umsetzungen durch die GA. Während die geringste Enantioselektivität bei der Umsetzung von GI-AMF **158**, formal ein benzylsubstituiertes Aminderivat, beobachtet wird ( $E=1.4$ ), erfolgt unter den gleichen Reaktionsbedingungen die Hydrolyse des naphthyl-substituierten Aminderivats GI-Naphth **172** weitaus selektiver ( $E=10.1$ ). Im Fall der *N*-Glutaryl-derivate von Phenylglycinmethylester **283** und  $\beta$ -Phenylalaninmethylester **239** resultiert die Verlängerung der Methylestersubstituenten um eine Methylengruppe (GI-PGCME  $\rightarrow$  GI-BPAME) in einem drastischen Abfall der beobachteten Selektivität ( $E=33.8$  und  $4.3$ ), der auch durch den Zusatz von Methanol nicht gesteigert werden kann ( $E=71.7$  und  $3.9$ ).

Ein weiterer Strukturfaktor, der großen Einfluß auf die Enantioselektivität besitzt, ist die Präsenz einer  $\alpha$ -ständigen Sauerstofffunktion [46]. So erhöht sich der  $E$ -Wert beim Übergang von GI-PEA **168** auf GI-PGCME **283** von  $13.7$  auf  $33.8$  und weiter auf  $108.6$  bei der Hydrolyse von GI-PGOL **303**. Dies deutet auf eine verstärkte Wechselwirkung, etwa durch Wasserstoffbrückenbindungen, in der unmittelbaren Nähe der katalytischen Triade/Di-Dyade hin.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Enantioselektivität positiv von einem ausgeprägten Größenunterschied der Substituenten und der Präsenz einer Sauerstofffunktion in  $\alpha$ -Position beeinflusst wird.

#### III.2.4.5. Kinetische Racematspaltung von Phenylglycinol

Motiviert durch die in III.2.4.4. ermittelte hohe Enantioselektivität der Hydrolyse von racemischem *N*-Glutaryl-phenylglycinol wurde eine präparative kinetische Racematspaltung im 200 mg-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde *N*-Glutaryl-phenylglycinol in einer 10%igen methanolischen Lösung bei pH 8.0 für 35 Minuten mit 800  $\mu$ L GA-Suspension inkubiert. Die Hydrolyse wurde bei 51% Umsatz gestoppt und der Reaktionsansatz aufgearbeitet. Die Lyophilisation der wäßrigen Phase ergab 350 mg eines Gemisches aus Natriumchlorid und (*S*)-Phenylglycinol-Hydrochlorid, dessen optische Reinheit zu 94% ee bestimmt wurde.