

Katalytische C-H-Aminierung – jetzt auch ein Fall für Enzyme**

Jean-Pierre Mahy,* Jennifer Ciesielski und Philippe Dauban*

Biokatalyse · C-H-Aminierungen · Nitrene ·
P450-Enzyme · Zielgerichtete Evolution

Die Natur ist schon immer eine Inspirationsquelle für Wissenschaftler gewesen. Der Aufbau komplexer Naturstoffe hat immer wieder die Kreativität von Synthesechemikern herausgefordert und zur Entwicklung vielfältiger chemischer Reaktionen geführt. Erst kürzlich hat sich die katalytische C-H-Aminierung als eine leistungsfähige Methode für die Funktionalisierung von Biomolekülen im Zuge von Totalsynthesen erwiesen.^[1,2] Eine wichtige Rolle dabei spielte der Entwurf von Reagentien, die den selektiven Einschub eines Metallnitrens in eine bestimmte C-H-Bindung ermöglichen. Bemerkenswerterweise kommt diese Reaktion nicht in der Natur vor, sondern C-N-Bindungen werden in Biosynthesen üblicherweise durch die Aminierung von funktionellen Gruppen geknüpft.

Biomimetische Modelle zur Nachbildung natürlicher Enzyme erlangten auch eine große Aufmerksamkeit. Ein charakteristisches Beispiel hierfür ist Monooxygenase, welche die regioselektive und stereoselektive C-H-Hydroxylierung von Alkanen mit O₂ über Eisen-Oxo-Spezies in Gegenwart von NADPH katalysiert.^[3] Nach dem Vorbild dieser Metalloenzyme wurden bioinspirierte Katalysatoren^[4] für die Oxidation von C-H-Bindungen in späten Synthesestadien entwickelt.^[5]

Der Großteil der Forschung konzentriert sich auf eine Nachahmung der Natur. Umgekehrt würde es sich aber auch lohnen, den Einfallsreichtum der Natur bei von Synthesechemikern konzipierten Reaktionen herauszufordern. In diesem Sinne ist die katalytische C-H-Aminierung eine hervorragende Plattform für eine nichtnatürliche enzymatische

Reaktion insbesondere im Zusammenhang mit der Implementierung von nachhaltigen Verfahren. Der jüngste Fortschritt in der zielgerichteten Entwicklung von Enzymen hat sich erfolgreich mit dieser Thematik auseinandergesetzt.^[6] Hier beschreiben wir daher zwei Untersuchungen, die eine Alternative zur klassischen Bildung von C-N-Bindungen bieten und den Weg für die Anwendung der Biokatalyse bei der katalytischen C-H-Funktionalisierung bereiten.

Bahnbrechende Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Breslow und Mansuy stellten die Leistungsfähigkeit von Fe³⁺-Porphyrynen in der Katalyse des Nitren-Transfers unter Beweis.^[7] Schon bald nach der Veröffentlichung dieser Ergebnisse wurde das erste und – vor den beiden Meldungen, die hier hervorgehoben werden, – einzige Beispiel einer intramolekularen Aminierung mittels eines nativen Cytochrome (Cyt)-P450-Katalysators beschrieben. So wurde festgestellt, dass das Iminiodan **1** in Gegenwart des Enzyms Fe³⁺-CytP450-LM₂ zum Aminierungsprodukt **2** cyclisiert (Schema 1).^[8] Es ist von großer Wichtigkeit zu erwähnen, dass so-



Schema 1. Wegweisende Untersuchungen zur porphyrinkatalysierten C-H-Aminierung.

wohl porphyrinkatalysierte Prozesse als auch eine P450-vermittelte Umwandlung auf Fe³⁺-Spezies angewiesen waren. Diese P450-Reaktion war einzigartig, allerdings erwiesen sich die geringe Wechselzahl (2.2) und schlechte Atomökonomie als nachteilig. Weitere Probleme waren die Unlöslichkeit von Iminiodanen und die Hydrolyse von Eisen-Imido-Komplexen, die insbesondere bei intermolekularen Reaktionen in einem Oxen-Transfer anstelle der Nitren-Addition resultierte. Derartige Probleme haben Fortschritte in diesem Bereich für über 30 Jahren verhindert.

Vor kurzem haben zwei Arbeitsgruppen über Möglichkeiten berichtet, diese Beschränkungen zu umgehen, wobei sie sich auf eine Modifizierung der Reaktionsbedingungen konzentrierten. So führte eine Kombination von Aziden mit modifizierten P450-Enzymen, die ein reduziertes Fe²⁺-Zentrum enthalten, zu einer effizienten intramolekularen benzylichen C-H-Aminierung unter anaeroben Bedingun-

[*] Prof. Dr. J.-P. Mahy

Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay UMR8182
CNRS, Laboratoire de Chimie Bioorganique et Bioinorganique
Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex (Frankreich)
E-Mail: jean-pierre.mahy@u-psud.fr

Dr. J. Ciesielski, Dr. P. Dauban

Centre de Recherche de Gif-sur-Yvette
Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR2301 CNRS
Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette (Frankreich)
E-Mail: philippe.dauban@cnrs.fr

[**] Wir bedanken uns bei der French National Research Agency (Programm CHARMMMAT ANR-11-LABX-0039), bei der Europäischen Gemeinschaft (Siebtes Rahmenprogramm; PIEF-GA-2013-623255), beim Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay sowie beim Institut de Chimie des Substances Naturelles für die gewährte Förderung.

gen.^[9,10] Arnold et al. konnten zeigen,^[9] dass eine Veränderung von zwei Aminosäuren, Threonin 268 und des axial koordinierenden Cystein 400, entscheidend für den Wechsel der Reaktivität ist. Es wird vermutet, dass diese Aminosäuren eine entscheidende Rolle in der Bildung von Fe^V-Oxo-Spezies durch die Spaltung der O-O-Bindung spielen, die möglicherweise durch ein Molekül Wasser unterstützt wird (Abbildung 1). In Kombination mit 12 anderen Mutationen indu-

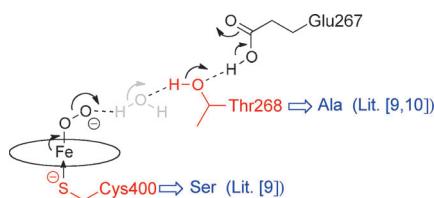
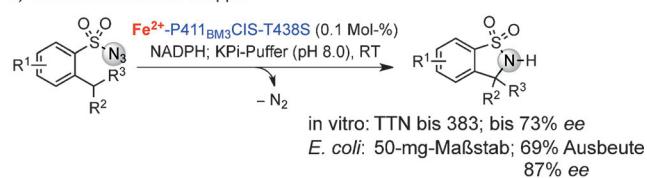


Abbildung 1. Einfluss von T268 und C400 auf die Bildung von Fe^V-Oxo-Spezies.

zieren diese Modifikationen die intramolekulare Aminierung von Benzolsulfonylazid-Derivaten in 73 % Ausbeute mit einer Gesamtwechselzahl (TTN) von 140. Dieses Ergebnis konnte durch Einbau einer T438S-Mutation verbessert werden, sodass die Mutante P411_{BM3}CIS-T438S *in vitro* das gewünschte Produkt mit 73 % *ee* und einer Gesamtwechselzahl von 383 (Schema 2a) liefert. Es sollte erwähnt werden, dass

a) Studie aus Arnolds Gruppe:^[9]



b) Studie aus Fasans Gruppe:^[10]



Schema 2. Katalysierte C-H-Aminierung mit P450-Mutanten. KPi = Kaliumumphosphat.

eine Expression des P411_{BM3}CIS-T438S-Katalysators in *E. coli* eine enantioselektive intramolekulare C-H-Aminierung in Zellen im 50-mg-Maßstab ermöglicht. So konnte Benzo-sultam mit 69 % Ausbeute und 87 % *ee* isoliert werden.

Die Untersuchung von Fasan et al. liefert ein alternatives enzymatisches Katalysatorsystem für die C-H-Aminierung.^[10] Abweichend von den Ergebnissen der Untersuchungen von Arnold zeigten Fasan et al., dass auch cysteingebundene P450-Enzyme effiziente Katalysatoren für diese Reaktion sein können. Hinsichtlich der C-H-Aminierung wurde P450_{BM3}-FL#62 als das optimale Enzym identifiziert. Allerdings variierte die Wechselzahl in Bezug auf dem Substituti-

onsmuster am Substrat (Schema 2b). Somit lieferten Substrate mit tertiärer und sekundärer benzylischer Position das gewünschte aminierte Produkt mit Gesamtwechselzahlen von 47 bzw. 388, während das nichtsubstituierte Substrat mit primärer benzylischer Position (CH₃) mit einer Gesamtwechselzahl von lediglich 5 ergab. Sie fanden auch heraus, dass ein sperriger Substituent am aromatischen Ring die Effizienz der Reaktion erhöht. Bei diesen Untersuchungen wurde das entsprechende Sulfonamid oftmals als Nebenprodukt gebildet. Mechanistische Untersuchungen zeigten, dass das in der heterolytischen Spaltung von Sauerstoff involvierte Threonin 268 eine analoge Rolle bei der Protonierung von Eisen-Imido-Spezies unter Bildung von Sulfonamid und Eisen-Oxo-Spezies spielen könnte. Entsprechend wurde die Hydrophobie des aktiven Zentrums erhöht, was die katalytische Aktivität beim Nitren-Transfer verbesserte. Das mutierte Enzym P450_{BM3}-FL#62 (T268A) zeigte dabei die optimalen Umsatzhäufigkeiten und Ausbeuten. Es konnten Enantioselektivitäten bis 91 % *ee* erzielt werden. Schließlich erwies sich dieser Prozess im präparativen Maßstab als sehr effektiv (30-mg-Maßstab; 42 % Ausbeute).

Bei beiden Untersuchungen erfordert die C-H-Aminierung ein Reduktionsmittel. Kohlenmonoxid (CO) inhibiert den Prozess durch Bildung einer stabilen Fe^{II}-CO-Koordinationsverbindung. Diese Experimente sprechen für die Beteiligung einer Fe^{II}-Spezies, die mit dem Azid unter Bildung eines Fe^{IV}-Imido-Intermediats reagieren würde. Die C-H-Aminierung verläuft dann entweder über einen radikalischen Rückprall-Mechanismus oder über einen konzertierten Mechanismus wie zum Beispiel in übergangsmetallkatalysierten Reaktionen. Interessanterweise bestehen diese enzymatischen Prozesse einen Vergleich mit der klassischen C-H-Aminierung. Bei den analogen Rh-,^[11a] Co-,^[11b] und Ir-katalysierten^[11c] Reaktionen sind die Ausbeuten vergleichbar. Jedoch liegt die Gesamtwechselzahl im Bereich zwischen 30 und 50. Hinsichtlich der Enantioselektivität liegt der enzymatische Prozess allerdings zwischen der iridiumkatalysierten Reaktion (höchste Effizienz) und der rhodiumkatalysierten Reaktion (geringste Effizienz).

Zusammenfassend belegen diese beiden Untersuchungen, dass es möglich ist, C-H-Oxidasen zu konstruieren und diese in C-H-Aminasen umzuwandeln. Das Konzept der Abstimmung der nativen Reaktivität von Enzymen erlangt zunehmend an Aufmerksamkeit.^[12,13] Die hier dargestellten Ergebnisse bieten einen Einblick in die genaue Funktion der entscheidenden Aminosäuren T268 und C400 der Monoxygenase, auch wenn sie bezüglich des axialen Liganden C400 etwas widersprüchlich sind. Die Verwendung der Fe^{II}-Enzyme könnte auch die geringe Reaktivität des nativen Fe^{III}-P450-Enzyms bei katalytischen Nitren-Transfers erklären. Dies könnte entweder auf den Oxidationszustand oder auf die Geometrie des katalytisch aktiven Zentrums zurückgeführt werden. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Chemoselektivität der C-H-Funktionalisierung mittels spezifischer Mutationen gesteuert werden kann. Diese Zielsetzung ist gerade bei metallkatalysierten Reaktionen schwierig zu erreichen. Schließlich stellen diese enzymatischen Methoden eine Ausweitung der Biokatalyse auf künstliche Prozesse dar, was das Protein-Engineering und die Entwicklung neuer Reagentien

und umweltverträglicher Reaktionen anstoßen sollte. Falls es gelingt, ihre Praktikabilität nachzuweisen und ihren Anwendungsbereich zu verbessern, könnten diese enzymatischen Methoden in Zukunft die klassischen metallkatalysierten Prozesse ergänzen.

Eingegangen am 24. März 2014
Online veröffentlicht am 4. Juni 2014

-
- [1] a) F. Collet, R. Dodd, P. Dauban, *Chem. Commun.* **2009**, 5061; b) D. N. Zalatan, J. Du Bois, *Top. Curr. Chem.* **2010**, 292, 347.
 - [2] a) A. Hinman, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11510; b) J. Li, J. S. Cisar, C.-Y. Zhou, B. Vera, H. Williams, A. D. Rodriguez, B. F. Cravatt, D. Romo, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 510.
 - [3] P. R. Ortiz de Montellano, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 932.
 - [4] *Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes* (Hrsg: B. Meunier), Imperial College Press, London, **2000**.
 - [5] M. C. White, *Science* **2012**, 335, 807.
 - [6] a) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 144; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 138; b) T. K. Hyster, L. Knörr, T. R. Ward, T. Rovis, *Science* **2012**, 338, 500.
 - [7] a) R. Breslow, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6728; b) D. Mansuy, J.-P. Mahy, A. Dureault, G. Bedi, P. Battioni, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1161.
 - [8] E. W. Svastits, J. H. Dawson, R. Breslow, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6427.
 - [9] J. A. McIntosh, P. S. Coelho, C. C. Farwell, Z. J. Wang, J. C. Lewis, T. R. Brown, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9479; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9309.
 - [10] R. Singh, M. Bordeaux, R. Fasan, *ACS Catal.* **2014**, 4, 546.
 - [11] a) C. Fruit, P. Müller, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 1607; b) J. V. Ruppel, R. M. Kamble, X. P. Zhang, *Org. Lett.* **2007**, 9, 4889; c) M. Ichinose, H. Suematsu, Y. Yasutomi, Y. Nishioka, T. Uchida, T. Katsuki, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10058; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9884.
 - [12] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, 339, 307.
 - [13] M. L. Matthews, W.-C. Chang, A. P. Layne, L. A. Miles, C. Krebs, J. M. Bollinger, Jr., *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 209.