

Diss. ETH No. 15380

Regio- and Stereoselective Hydroxylations with *Sphingomonas* sp. HXN-200

A dissertation submitted to the

Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Dongliang Chang

M. Sc. in Chemistry, Institute of Chemistry, Guangzhou

Academia Sinica, P. R. China

born July 5, 1975

Citizen of P. R. China

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bernard Witholt, examiner

Dr. Zhi Li, co-examiner

Prof. Dr. Erick M. Carreira, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Peter, chairman

Zürich, 2003

Abstract

Sphingomonas sp. HXN-200 was found to be highly effective and regioselective for the hydroxylations of *N*-substituted azetidines and piperidines, giving the corresponding 3-hydroxy azetidines and 4-hydroxypiperidines in 91-98% yield, respectively. High yield (70-83%) preparations have also been achieved by using frozen/thawed cells as biocatalyst. Hydroxylations of *N*-*tert*-butoxycarbonyl azetidine and *N*-benzyl piperidine were carried out in bioreactor on 1 L scale affording the corresponding hydroxylated products in 2.140 g and 2.072 g, respectively, providing convenient and practical syntheses of 3-hydroxyazetidines and 4-hydroxypiperidines. For the first time, lyophilized cells were used successfully in hydroxylation without the addition of cofactor.

The strain HXN-200 was also found to be able to hydroxylate *N*-benzyl pyrrolidin-2-one and *N*-*tert*-butoxycarbonyl pyrrolidin-2-one with high regioselectivity and excellent enantioselectivity, affording (*S*)-4-hydroxy-pyrrolidin-2-ones in 99.9% and 92% ee, respectively. Simple crystallization increased the ee of (*S*)-4-hydroxy-*N*-*tert*-butoxycarbonyl pyrrolidin-2-one from 92% to 99.9%. High activity, excellent regioselectivity, and moderate enantioselectivity were also observed in the hydroxylation of *N*-benzyl piperidin-2-one and *N*-*tert*-butoxycarbonyl piperidin-2-one with *Sphingomonas* sp. HXN-200, which afforded the corresponding (*R*)-4-hydroxy-piperidin-2-ones in 31% ee and 68% ee, respectively. High yield preparations of the (*R*)-4-hydroxy-piperidin-2-ones are demonstrated both in shaking flask and bioreactor.

Sphingomonas sp. HXN-200 can also be employed to catalyze the *trans*-dihydroxylation of *N*-substituted 1,2,5,6-tetrahydropyridines and 3-pyrrolines giving the corresponding 3,4-dihydroxypiperidines and 3,4-dihydroxypyrrolidines, respectively, with high activity and enantioselectivity. The *trans*-dihydroxylation reaction is sequentially catalyzed by a monooxygenase and an epoxide hydrolase in the strain *via* an epoxide intermediate. Preparative *trans*-dihydroxylation of *N*-Phenoxycarbonyl 1,2,5,6-tetrahydro-pyridine and *N*-benzyloxy-carbonyl 3-pyrrolines with frozen/thawed cells of *Sphingomonas* sp. HXN-200 afford (+)-(3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-piperidine and (+)-(3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-pyrrolidine in 96% ee both with 60% and 80% yield, respectively. These results represent first example of enantioselective *trans*-dihydroxylation with non-terpene substrates and with bacterial catalyst, thus significantly extending this methodology in practical synthesis of valuable and useful *trans*-diols.

Abstract

Hydrolysis of *N*-benzyloxycarbonyl-3,4-epoxy-pyrrolidine and cyclohexene oxide with the epoxide hydrolase of *Sphingomonas* sp. HXN-200 gave the corresponding vicinal *trans*-diols in 95% ee and 87% ee, respectively, representing the first example of enantioselective hydrolysis of a meso-epoxide with a bacterial epoxide hydrolase. Enantioselective hydrolysis of racemic epoxide *N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxypiperidine with *Sphingomonas* sp. HXN-200 afforded 34% of (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxy piperidine in >99% ee. Further hydrolysis of (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxypiperidine with the same strain afforded (-)-(3*S*, 4*S*)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-dihydroxy-piperidine in 96% ee and 92% yield. Thus, (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-dihydroxy-piperidine can be accessed by double hydrolysis whereas the (+)-enantiomer can be obtained by dihydroxylation with *Sphingomonas* sp. HXN-200.

Sphingomonas sp. HXN-200 was found to contain an NADH-dependent soluble alkane monooxygenase that is different from the well-known membrane-bound three-component alkane hydroxylase system (AlkB system) in *Pseudomonas putida* GPo1. The soluble alkane monooxygenase was purified and characterized as a P450 enzyme, namely P450pyr. The P450pyr monooxygenase was purified by a) 40-60% ammonium sulphate cut of cell-free extracts, b) hydrophobic interaction chromatography, and c) anion exchange chromatography. Subsequently, the *N*-terminal sequence of the purified P450pyr enzyme was determined and the molecular weight was established by as 47.3KDa by MS. The Component B was purified by a) anion exchange chromatography, and b) gel filtration chromatography. The molecular weight of component B is determined as 11.2KDa by MS. The purified P450pyr is not active by itself. However, combine with other components restores the activity of the monooxygenase. The 47-kDa P450pyr shows a clear absorption peak at 449nm in the CO difference spectrum.

The homology model of P450pyr was established based on the sequence identity and the existing X-ray structure of P450terp. The sequence alignment of P450pyr was obtained with ClustalX and used to generate the 3D homology model *via* automated protein homology modeling server – SWISS-MODEL. The heme-binding signature of the P450pyr was then found to be FGFGI HRCVG (AA359-368). The homology model of P450pyr was used to characterize substrate/enzyme complexes. Docking of the substrates on to the structural model of P450pyr with AutoDock program generated the preferred conformations of substrates inside the catalytic pocket of the enzyme. The results allowed the identification of the

Abstract

preferred substrate bound conformation and its related crucial residues at enzyme active site. The calculated preferences of the hydroxylation site and its stereoselectivity for substrates were in good consistence with the experimental outcomes.

Zusammenfassung

Es wurde festgestellt, dass *Sphingomonas* sp. HXN-200 sehr effektiv sowie auch regioselektiv N-substituierter Azetidine und Peridine hydroxyliert: diese Biokatalyse liefert die Produkte der Hydroxylierung, 3-Hydroxyazetidine and 4-Hydroxypiperidine mit Ausbeuten zwischen 91-98%. Ähnlich hohe Ausbeuten (70-83%) wurden mit gefrorenen/aufgetauten Zellen als Biokatalysatoren erreicht. Die Hydroxylierung von *N-tert*-butoxycarbonyl azetidinen und *N*-benzylpiperidinen wurden im 1 L Bioreaktor durchgeführt und ergaben 2.140 g bzw. 2.072 g der entsprechenden hydroxylierten Produkte. Damit stellt die Biokatalyse eine einfache und praktische Synthesemöglichkeit von 3-Hydroxyazetidinen und 4-Hydroxypiperidinen dar. Zum ersten Mal wurden gefriergetrocknete Zellen erfolgreich bei einer Hydroxylierung ohne Zusatz von Kofaktoren eingesetzt.

Weiterhin wurde festgestellt, dass der Stamm HXN-200 *N*-Benzylpyrrolidin-2-one und *N-tert*-Butoxycarbonylpyrrolidin-2-one mit hoher Regio- und Enantioselektivität zu (*S*)-4-Hydroxy-pyrrolidin-2-onen mit 99.9% bzw. 92% Enantiomerenüberschuss (ee) hydroxylieren konnte. Mit Hilfe der Kristallisation konnte der ee von (*S*)-4-Hydroxy-*N-tert*-butoxycarbonylpyrrolidin-2-on von 92% auf 99.9% erhöht werden. Hohe Aktivität, sehr gute Regio-selektivität, sowie mittelmässige Enantioselektivität wurden bei der Hydroxylierung von *N*-Benzylpiperidin-2-on und *N-tert*-Butoxycarbonylpiperidin-2-on durch *Sphingomonas* sp. HXN-200 beobachtet. Diese ergaben die entsprechenden (*R*)-4-Hydroxy-piperidin-2-onen mit 31% ee und 68% ee. (*R*)-4-Hydroxy-piperidin-2-one wurden erfolgreich im Bioreaktor und im Schüttelkolben mit grossen Ausbeuten dargestellt.

Sphingomonas sp. HXN-200 kann auch für die katalytische *trans*-Dihydroxylierung von *N*-substituierten 1,2,5,6-Tetrahydropyridinen und 3-Pyrrolinen zu 3,4-Dihydroxypiperidinen und 3,4-Dihydroxypyrrolidinen, ebenfalls mit hoher Aktivität und Selektivität, verwendet werden. Die *trans*-Dihydroxylierungsreaktion wird erst durch eine Mono-oxygenase und anschliessend durch eine Epoxidhydrolase über ein Epoxidzwischenprodukt in HXN-200 katalysiert. Die preparative *trans*-Dihydroxylierung von *N*-Phenoxycarbonyl 1,2,5,6-tetrahydro-pyridin und *N*-Benzyloxycarbonyl 3-pyrrolin durch gefrorene/aufgetaute *Sphingomonas* sp. HXN-200 Zellen führte zu (+)-(3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxypiperidin und (+)-(3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxypyrrolidine mit 96% ee und Ausbeuten mit 60% bzw. 80%. Zum ersten Mal wurde mit diesen Ergebnisse eine enantioselektive *trans*-Dihydroxylierung mit einem bakteriellen Katalysator mit nicht-terpenen Substraten demonstriert. Daher stellt dies

Zusammenfassung

eine wichtige Erweiterung der Methoden der angewandten Synthese nützlicher *Trans*-Diole dar.

Die Hydrolyse von *N*-benzyloxycarbonyl-3,4-epoxy-pyrrolidin und Cyclohexenoxiden mit der Epoxidhydrolase von *Sphingomonas* sp. HXN-200 ergaben die entsprechenden vicinalen *trans*-Diole mit 95% ee bzw. 87% ee. Dies stellt erstmals ein Beispiel für die enantioselektive Hydrolyse eines meso-Epoxide mithilfe einer bakteriellen Epoxidhydrolase. Die enantioselektive Hydrolyse racemischer Epoxide wie *N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxypiperidin mit *Sphingomonas* sp. HXN-200 ergab 34% (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxy piperidin in >99% ee. Die Hydrolysis von (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-epoxypiperidin mit dem gleichen Kulturstamm ergab (-)-(3*S*, 4*S*)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-dihydroxy-piperidine mit 96% ee und 92% Ausbeute. Also ist (-)-*N*-phenoxycarbonyl-3,4-dihydroxy-piperidin über doppelte Hydrolyse zugänglich, während das (+)-Enantiomer über die Dihydroxylierung mit *Sphingomonas* sp. HXN-200 erreicht werden kann.

Es wurde festgestellt, dass *Sphingomonas* sp. HXN-200 eine lösliche, NADH-abhängige Alkan-monooxygenase (AM) enthält, welche sich von dem bekannten *Pseudomonas putida* GPo1 Alkanhydroxylasesystem unterscheidet, das sich durch ein membrangebundenes Dreikomponentensystem auszeichnet. Diese lösliche AM wurde gereinigt und als P450pyr charakterisiert, das den P450 Enzymen zuzuordnen ist. P450pyr wurde zunächst bei a) 40-60% Ammoniumsulfatkonzentrationen aus Zellfreiextrakten gewonnen und mit b) hydrophober Interaktionschromatographie und c) Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Danach wurde die *N*-terminale Sequenz des gereinigten P450pyr Enzyms bestimmt und das Molekulargewicht mit 47.3 kDa mit Hilfe der Massenspektroskopie (MS) ermittelt. Die B-Komponente wurde mit a) Anionenaustauschchromatographie und b) Grössenausschluss chromatographie gereinigt. Das Molekulargewicht der B-Komponente wurde mit MS mit 11.2 kDa bestimmt. Reines P450pyr ist alleine nicht aktiv, jedoch kann man durch Kombination mit anderen Komponenten seine ursprüngliche Monooxygenase-aktivität wiederherstellen. Das 47.3 kDa grosse P450pyr zeigt einen definierten Absorptionspeak bei 449 nm im CO-Differenzspektrum.

Das Homologiemodel von P450pyr wurde aufgrund der Sequenzidentität und der vorhandenen Kristallstruktur von P450terp konstruiert. Der Mehrfachsequenzvergleich von P450pyr wurde mit ClustalX ermittelt und dazu benutzt ein dreidimensionales

Zusammenfassung

Homologiemodel *via* dem automatisierten “protein homology modeling server – SWISS-MODEL,, erstellt. Die Hämbindungssequenz von P450_{pyr} wurde als wie folgt bestimmt: FGFGI HRCVG (AA359-368). Das Homologiemodel von P450_{pyr} dazu benutzt, Enzym-/Substratkomplexe zu charakterisieren. Das Docking von Substraten an das Strukturmodel von P450_{pyr} mit AutoDock ergab die vom Enzym bevorzugten Substratkonformationen in der katalytischen Tasche des Enzyms. Diese Resultate erlaubten die Identifikation der bevorzugten Substratkonformation im gebundenen Zustand und die in diesem Zusammenhang wichtigen Aminosäurereste im katalytischen Zentrum des Enzyms. Die berechnete Bevorzugung der Hydroxylierungsstelle und seiner Stereoselektivität für die Substrate stimmten gut mit den experimentellen Ergebnissen überein.