



## acib

### Austrian Centre of Industrial Biotechnology

Programm: COMET – Competence Centers for Excellent Technologies

Programmlinie: K2-Zentrum

COMET-Einzelprojekt, Laufzeit und Projekttyp:

Novel Activation Reactions, 01/2015 – 06/2019, single-firm

## Enzymatische Synthese von phosphorylierten Zuckern

Die ATP-abhängige enzymatische Phosphorylierung basiert auf der Transphosphorylierungsaktivität von Phosphatasen. Rasche Produktbildung und hohe Ausbeuten, stabile Enzyme, milde Reaktionsbedingungen und einfache Reaktionsbedingungen kennzeichnen die Herstellung von monophosphorylierten primären und sekundären Alkoholen.

Bisherige Probleme durch Produkt-Hydrolyse und das als Nebenprodukt anfallende anorganische Monophosphat konnten durch den Einsatz neuer Technologien gelöst werden. Die nun entwickelten Protokolle ermöglichen die Synthese von hochwertigen phosphorylierten Mono- und Oligosacchariden mit großer Bedeutung für die Stoffwechsel- und Pharma-Forschung im multi-g-Maßstab.

### Einleitung

Die Synthese von wertvollen Phosphat-(Mono)estern, wie zum Beispiel Zuckerphosphaten, Nukleotiden, Metaboliten und modifizierten Pharma-Wirkstoffen (Prodrugs), kann entweder durch langwierige chemische Reaktionen oder unter milden enzymatischen Reaktionsbedingungen erfolgen.

Traditionellerweise werden im enzymatischen Verfahren Kinasen zusammen mit einem zweiten Enzym für die Regeneration von ATP verwendet. Obwohl Kinasen im präparativen Maßstab eingesetzt werden, zeigen sie signifikante Nachteile: sie sind sehr substrat-spezifisch und die Effizienz der ATP-Regenerationssysteme ist begrenzt.

Bereits vor Jahrzehnten wurde entdeckt, dass Phosphatasen auch in der Lage sind, im (umgekehrten) Transphosphorylierungsmodus unter Einsatz von günstigen hochenergetischen Phosphatdonoren (P-Donor), wie zum Beispiel Pyrophosphat (PPi), hervorragende Ergebnisse zu erzielen. Das Wegfallen eines Recyclingsystems

und das breite Substratspektrum von Phosphatasen macht Phosphatasen zu einer attraktiven Alternative zu Kinasen und ermöglicht die Synthese einer breiten Palette an Phosphat-Monoestern.

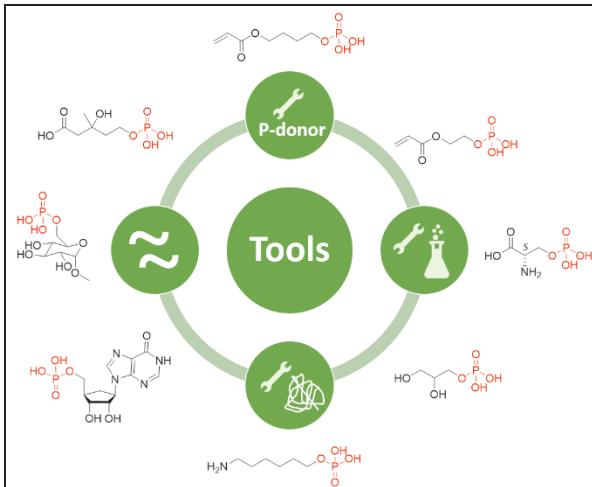
Allerdings führt die enzymkatalysierte Hydrolyse des gebildeten Phosphatesters zum Produktabbau und zu schwer kontrollierbaren Reaktionszeiten.

### Plattform an Reaktionstechniken

Um dieses Problem zu lösen, haben acib-Forscher eine Technologieplattform aus unterschiedlichen Strategien entwickelt.

Diese umfassen Reaktions-Engineering, Protein-Engineering, Continuous Flow Synthese und Phosphatdonor-Engineering (Abb. 1). Das Protokoll ermöglicht die flexible Anpassung der Reaktionsbedingungen an die Substanz- und/oder Produkteigenschaften und die Prozessparameter. Die Enzyme sind einfach zugänglich, hochproduktiv, (Umsatzzahlen im Bereich von  $10^5$ )

und ermöglichen eine rasche Massenproduktion von Phosphat-Estern mit Raum-Zeit Ausbeuten von einigen hundert g/L\*h.



**Abb. 1: Technologieplattform und Produktbeispiele**

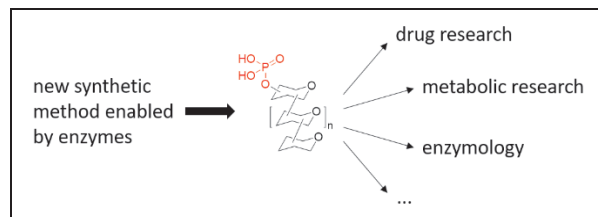
### Phosphorylierung von Zuckern

Die erfolgreiche Etablierung dieser Technologie führte zur Entwicklung eines Syntheseprotokolls für die regioselektive Phosphorylierung von Mono- und Oligosacchariden. Diese Verbindungen sind von großem Interesse für die Medikamentenentwicklung und die Stoffwechselforschung, sie sind allerdings nur begrenzt verfügbar. Die bestehenden chemischen Verfahren erfordern den Einsatz von giftigen Aktivierungsreagenzien und eine Reihe von Schutz- und Entschützungs-Reaktionen, was den Gesamtprozess sehr langwierig gestaltet. Die von acib entwickelten Techniken ermöglichen die Isolierung

von multi-g-Mengen dieser Verbindungen mit bemerkenswerten Raum-Zeit Ausbeuten unter Verwendung von kostengünstigen Reagenzien und milden Reaktionsbedingungen. Damit ist es gelungen, die Menge an toxischem Abfall um 75% zu reduzieren.

### Stand der Technik und Ausblick

Die hier entwickelte Technologie ermöglicht die einfache Synthese von wertvollen phosphorylierten Molekülen wie zum Beispiel biologisch bedeutenden Mono- und Oligosacchariden (Abb. 2), die nach kurzen Reaktionszeiten im multi-g-Maßstab isoliert werden können. Damit bietet diese Methode eine wichtige Alternative zu klassischen chemischen Syntheseverfahren, da sie kostengünstige Reagenzien (anorganisches Pyrophosphat) und milde (physiologische) Reaktionsbedingungen einsetzt und keine Schutzgruppenchemie erfordert. Dies, und der hohe Wert der Produkte lässt vielversprechende kommerzielle Anwendungen erwarten.



**Abb. 2: Anwendungspotential von wertvollen phosphorylierten Zuckern**

#### Kontakt und Information

K2-Zentrum acib

acib GmbH  
Heinrichstrasse 28, 8010 Graz  
T +43-316-380-5332  
E kurt.faber@acib.at, www.acib.at

#### Projektkoordination

Prof. Kurt Faber

#### Projektpartner

Organisation	Land
Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Chemie	Österreich
BASF SE	Deutschland

Weitere Informationen zu COMET – Competence Centers for Excellent Technologies: [www.ffg.at/comet](http://www.ffg.at/comet)

Diese Success Story wurde von der Konsortialführung/der Zentrumsleitung zur Verfügung gestellt und zur Veröffentlichung auf der FFG-Website freigegeben. Für die Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität der Inhalte übernimmt die FFG keine Haftung.