

PhD értekezés tézisei

***$\beta$* -Aminosav származékok enzim katalizált  
kinetikus rezolválása**

Fitz Mónika

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum  
Gyógyszerkémiai Intézet  
Szeged

2009

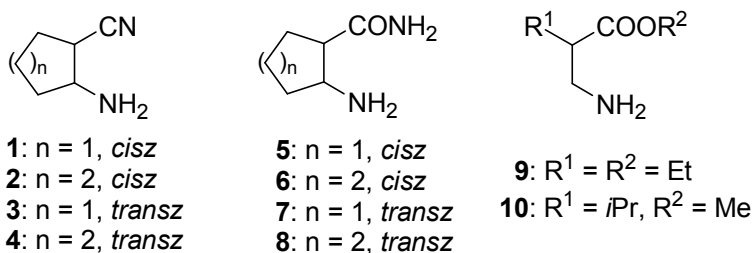
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Fülöp Ferenc tanszékvezető egyetemi tanár

## A. Előzmények és célkitűzések

Az alifás és aliciklusos  $\beta$ -aminosavak és származékaik egyedülálló kémiai és biológiai tulajdonságaiknak köszönhetően intenzív kutatás tárgyai. A legismertebb példa a ciszpentacin [(1*R*,2*S*)-2-amino-ciklopentán-1-karbonsav] és szintetikus származékai, melyek hatékony gombaellenes szereknek bizonyultak. A  $\beta$ -aminosavak fontos intermedierjei a  $\beta$ -laktámoknak és egyes heterociklusoknak; valamint építőkövei számos biológiailag aktív vegyületnek, így például a daganatellenes taxánoknak.  $\beta$ -Aminosavak  $\alpha$  peptidekbe történő beépítése módosíthatja azok szerkezetét, biológiai hatását és ellenállóvá teszi a peptidet a proteolitikus bontással szemben. A  $\beta$  peptidek másodlagos szerkezete, foldingja intenzíven kutatott terület. A  $\beta$ -aminonitrilek, -karboxamidok és a  $\beta$ -amino észterek a megfelelő  $\beta$ -aminosavak értékes prekursorai.

Doktori munkám fontos célja volt aliciklusos *cisz* és *transz*- $\beta$ -aminociklopentán- és ciklohexán-karbonitrilek (**1-4**) és a megfelelő karboxamidok (**5-8**) enzimatisz kinetikus rezolválási módszereinek kidolgozása (1. ábra). Az enantiomertiszta  $\beta$ -aminosav származékok előállítására mellett fontosnak tartottuk megfigyelni a lipázok szerves oldószerben mutatott szelektivitását. További célunk volt az általunk kapott eredmények összehasonlítása a megfelelő  $\beta$ -aminoészterek rezolválása során nyert irodalmi adatokkal. Terveink közt szerepelt az etil 3-amino-2-etilpropanoát **9** és a metil 3-amino-2-izopropilpropanoát **10** lipáz-katalizált *N*-acilezés útján történő rezolválása is (1. ábra).

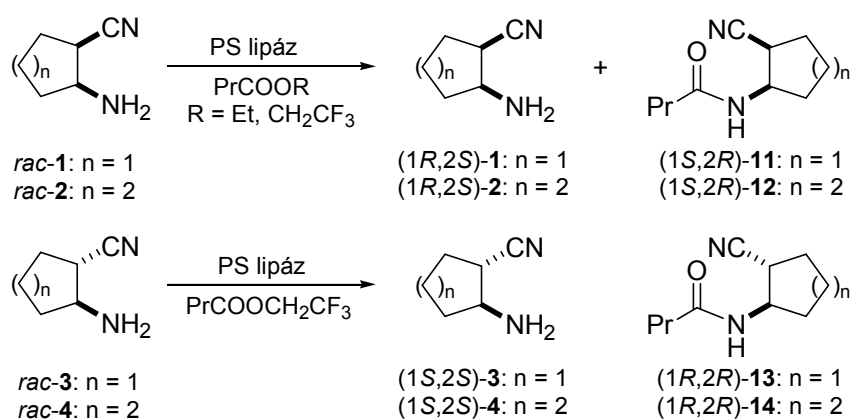


1. ábra

Az előkísérletek során tanulmányoztuk az alkalmazott enzim, az acil donor és az oldószer reakció sebességre valamint az enantioszelektivitásra (*E*) gyakorolt hatását, majd az eredmények összegzése után elvégeztük a modellvegyületek gramm-mennyiségű rezolválását az optimalizált körülmények között.

## B. Eredmények és értékelésük

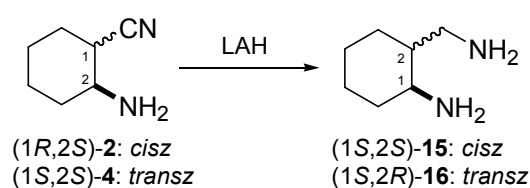
Az aliciklusos  $\beta$ -aminonitrilek **1-4**, enantioszelektív *N*-acilezési reakciójában (2. ábra) a PS lipázt, a CAL-A és a CAL-B enzim preparátumokat vizsgáltuk, melyek közül a PS lipáz lehetővé tette a modellvegyületek rezolválását TBME-ben 2 ekvivalens 2,2,2-trifluoretil-butiráttal (*E* > 200).



2. ábra

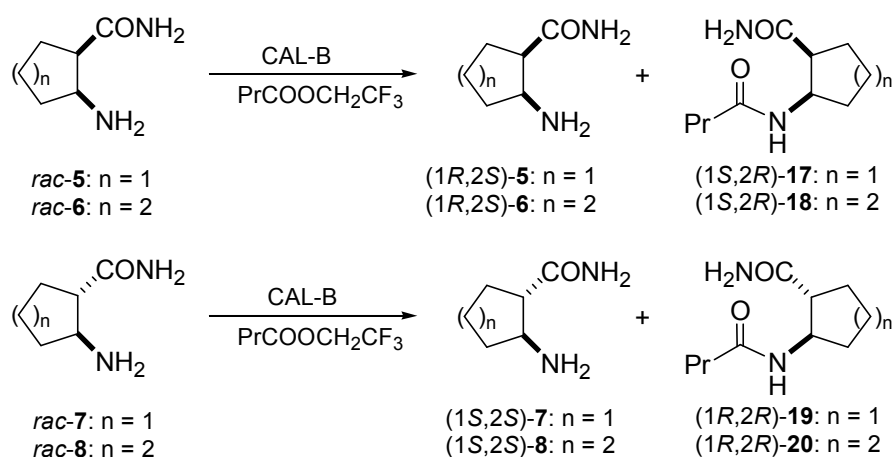
A **2** vegyület PS lipáz-katalizált (50 mg/ml) *N*-acilezési reakciójában az aktivált észter (2,2,2-trifluoretil-butirát) előnyeit vizsgáltuk más acildonorokkal (pl. etil-acetát) összehasonlítva. A reakció 50%-os konverzió közelében tapasztalható lelassulása kivédhető volt nagyobb mennyiségű (75 mg/ml) PS lipáz alkalmazásával, így lehetővé vált a **2** vegyület rezolválása rövid idő alatt (4 h). A **2** CAL-B-katalizált *N*-acilezés útján történő rezolválása tett kísérlet TBME-ben és ionos folyadékokban is sikertelen volt. A *transz* izomerek TBME-ben való oldékonyságát két módon tudtuk növelni: TAA koszolvensként való alkalmazásával (**3** esetében), illetve a hőmérséklet emelésével (**4** esetében).

Az **1-4** modellvegyületek optimalizált körülmények közt elvégzett gramm-mennyiségű rezolválási során előállítottuk az *N*-acilezett (1*S*,2*R*)-**11**, (1*S*,2*R*)-**12**, (1*R*,2*R*)-**13** és (1*R*,2*R*)-**14**, illetve az el nem reagált enantiomereket nagy enantiomerfelesleggel ( $ee \geq 98\%$ ), melyeket oszlopkromatográfia útján választottuk szét. Igazoltam, hogy az (1*R*,2*S*)-**2** és (1*S*,2*S*)-**4** enantiomerek LAH-tal végzett redukció során (1*S*,2*S*)-**15**, (1*S*,2*R*)-**16** diaminokká alakíthatóak, az enantiomerfelesleg (ee) jelentős csökkenése nélkül (3. ábra). Ezen eredmények bizonyították az enzim acilezés *R* szelektivitását.



**3. ábra**

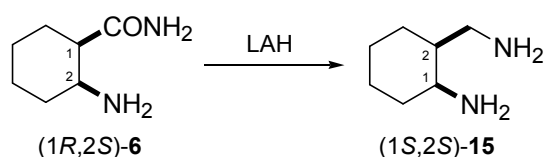
A nagy polaritású alicikus  $\beta$ -aminokarboxamidok **5-8** TBME-ben való feloldása koszolvens hozzáadását és hőmérsékletemelést (48 °C) igényelt. Ezen szubsztrátok 2 ekvivalens 2,2,2-trifluoetil-butiráttal való enantioszelektív acilezésére a CAL-B (50 mg/ml) bizonyult legmegfelelőbb katalizátornak (4. ábra).



**4. ábra**

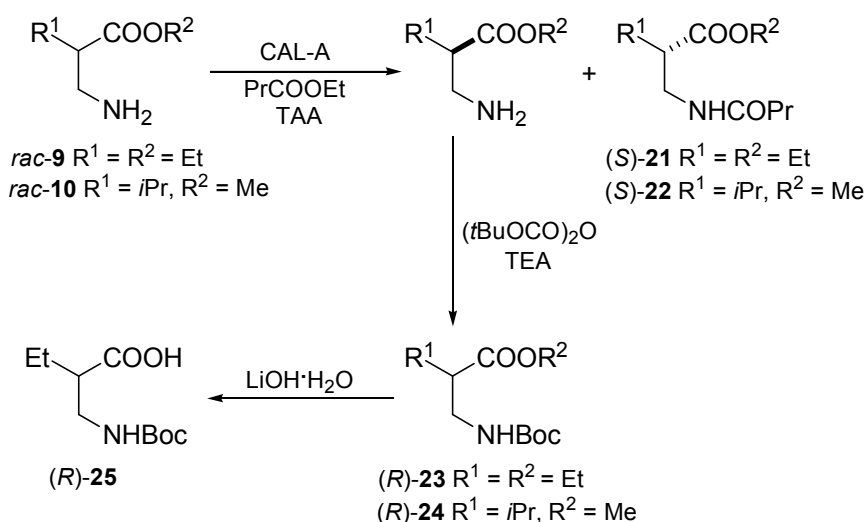
A koszolvens hatását tanulmányozva a TAA bizonyult a legmegfelelőbbnek. A TAA mennyiségének növelésével viszont az acilezési reakció lelassult. Az **5**, **7** és **8** *N*-acilezése TBME/TAA (1/1) elegyben kiváló enantioszelektivitással ( $E > 200$ ) játszódtott le; míg a **6** esetében a TBME/TAA (4/1) elegyben igen szerény eredményeket ( $E = 40$ ) kaptunk, ezért a rezolválását két lépésben végeztük.

Az el nem reagált aminokarboxamidok - (1*R*,2*S*)-**5**, (1*R*,2*S*)-**6**, (1*S*,2*S*)-**7** és (1*S*,2*S*)-**8** - valamint az acilezési reakció során képződött butiramid enantiomerek a reakcióelegyből nagy enantomertisztaságban ( $ee \geq 95\%$ ) voltak kinyerhetőek oszlopkromatográfia útján. Az (1*R*,2*S*)-**6** LAH-os redukciójával (1*S*,2*S*)-**15** keletkezik, mely a CAL-B *R* szelektivitását igazolja (5. ábra).



**5. ábra**

A **9** szubsztrát 2 ekvivalens vinil-butiráttal CAL-A (50 mg/ml) katalízissal DIPE-ben 25 °C-on végzett *N*-acilezésének eredménye alapján ( $E = 4$ ) további optimalizálásra volt szükség (6. ábra). Kisebb mennyiségű CAL-A (25 mg/ml) és etil-butirát (0,55 ekvivalens) alkalmazása alacsony hőmérsékleten (4 °C) kis mértékben javította az eredményeket ( $E = 6,7$ ). Az oldószer vizsgálata során bebizonyosodott az oldószer enzimes acilezésre gyakorolt hatása: poláris oldószerekben (acetonitril, TAA) a reakció kiváló szelektivitással ( $E > 200$ ), de lassan (26 illetve 40%-os konverzió 25 nap után) ment végbe. A reakció gyorsítása céljából a hőmérséklet és az enzim mennyiségének hatását tanulmányoztuk, és azt találtuk, hogy 50 mg/ml CAL-A-val, 4 °C-on és TAA-ban végezve a reakció gyorsabban és csak némileg alacsonyabb szelektivitással játszódtott le (46% konverzió 15 nap után;  $E = 63$ ).



6. ábra

A **10** vegyület rezolválását (6. ábra) a **9** szusztrátra kidolgozott optimális körülmények között, lecsökkentett enzim mennyiséggel (25 mg/ml) végezve a reakció nagyon lassú volt (49%-os konverzió 35 nap után) és alacsony szelektivitást mutatott ( $E = 9$ ), ezért a **10** szubsztrát rezolválása csak két lépésben volt lehetséges.

A gramm-mennyiségű rezolválások leállítása után az el nem reagált (*R*)-**9** és (*R*)-**10** enantiomereket *N*-Boc-védett származékaikká [(*R*)-**23** (ee = 95%) és (*R*)-**24** (ee = 78%)] alakítottuk (6. ábra), majd oszlopkromatográfiásan elválasztottuk a butiramidoktól (*S*)-**21** (ee = 85%) és (*S*)-**22** (ee = 76%). Az (*R*)-**23** LiOH·H<sub>2</sub>O-tal végzett hidrolízise során a megfelelő *N*-Boc védett aminosav (*R*)-**25** képződött, mely az enzim *S* szelektivitását igazolta (6. ábra).

Az előállított 20 enantiomert (köztük 19 új) enantiomerfelesleggel, optikai forgatóképességükkel, olvadáspontjaikkal és <sup>1</sup>H-NMR spektrumukkal jellemeztük. A β-aminonitrilek és β-aminokarboxamidok esetében az előbbieken kívül <sup>13</sup>C-NMR spektroszkópia és elemi analízis szolgált az előállított enantiomerek leírására.

## Rövidítések

CAL-A	<i>Candida antarctica</i> A lipáza
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> B lipáza
DIPE	diizopropil-éter
LAH	lítium-tetrahydroaluminát
PS lipáz	<i>Burkholderia cepacia</i> lipáza
TAA	<i>terc</i> -amil-alkohol
TBME	<i>terc</i> -butil-metil-éter



## C. Az értekezés alapját képező közlemények\*

- I. **Fitz, M.**; Lundell, K.; Lindroos, M.; Fülöp, F.; Kanerva L. T.  
An effective approach to the enantiomers of alicyclic  $\beta$ -amino nitriles by using lipase catalysis  
*Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3690-3697. i.f.: 2.468
  
- II. **Fitz, M.**; Lundell, K.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T.  
Lipase-catalysed kinetic resolution of 2-aminocyclopentane- and 2-aminocyclohexanecarboxamides  
*Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1129-1134. i.f.: 2.468
  
- III. **Fitz, M.**; Forró, E.; Vigóczki, E.; Lázár, L.; Fülöp, F.  
Lipase-catalysed *N*-acylation of  $\beta^2$ -amino esters  
*Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1114-1119. i.f.: 2.468

\* A 2006-os impakt faktorokat tüntettem fel.

## D. Az értekezéssel kapcsolatos előadások

IV. **Fitz, M.**

A *cisz*- és *transz*-2-amino-ciklopentán- és -ciklohexánkarboxamidok enzim-katalizált kinetikus rezolválása

VII. Clauder Ottó Emlékverseny, Visegrád, 2004.

V. **Fitz, M.**

A *cisz*- és *transz*-2-amino-ciklopentán- és -ciklohexánkarboxamidok enzim-katalizált kinetikus rezolválása

„A Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért” Alapítvány tudományos előadóülése, 2005.

VI. **Fitz, M.**; Lundell, K.; Kanerva, L. T.; Fülöp, F.

Enzyme catalysed kinetic resolution of cyclic  $\beta$ -amino amides and  $\beta$ -amino nitriles

*7th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Delft, The Netherlands, 2005.

VII. **Fitz M.**; Lundell, K.; Kanerva, L. T.; Fülöp F.

Ciklusos  $\beta$ -amino nitrilek és  $\beta$ -aminosavamidok enzim-katalizált kinetikus rezolválása

*Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, 2005.