

PhD értekezés tézisei

**β -Szubsztituált β -aminosav enantiomerek direkt
enzimatis úton történő előállítása**

Tasnádi Gábor

Témavezetők:

Dr. Forró Enikő és Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Szegedi Tudományegyetem

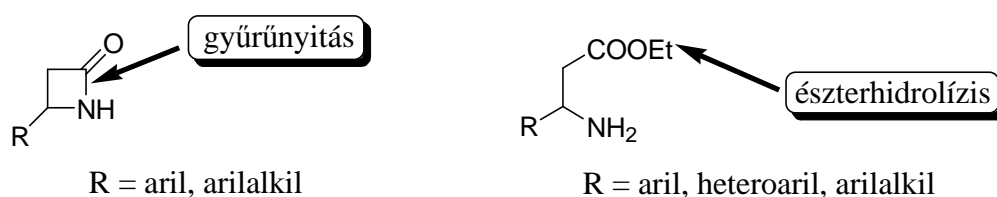
Gyógyszerkémiai Intézet

2010

1. Előzmények és célkitűzések

A β -aminosavak és β -laktámok biológiai és kémiai jelentősége az irodalomból jól ismert. A természetes eredetű ciszpentacin [(1*R*,2*S*)-2-aminociklopentánkarbonsav] és szintetikus származékai hatékony gombaellenes szereknek bizonyultak. Számos biológiailag aktív vegyület létezik, mely szerkezeti elemként tartalmaz enantiomer β -aril-, β -heteroaril- vagy β -arilalkil- β -aminosavat. Az antitrombotikus hatással rendelkező fibrinogén-receptor antagonisták közül az elarofiban, az (*S*)-3-amino-3-(3-piridil)propionsav származéka, sikeresen jutott túl a humán klinikai vizsgálatok 2-es fázisán. A JanuviaTM (szitagliptin-foszfát) a közelmúltban az elsőként bevezetett, a 2-es típusú diabetes kezelésében alkalmazott dipeptidil-peptidáz IV inhibitor. Szerkezetében egy β -arilalkil-szubsztituált β -aminosav enantiomer, az (*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorfenil)butánsav található. β -Aminosavakból módosított peptidek állíthatók elő, melyek megnövekedett biológiai aktivitást, illetve a proteolitikus enzimekkel szembeni nagyobb ellenállóságot mutathatnak. A β -aminosavak enantiomertiszta formában történő előállítására kidolgozott aszimmetrikus szintézismódszerek mellett egyre hangsúlyozottabb a racém vegyületek rezolválására irányuló biokatalitikus módszerek iránti érdeklődés.

Korábban már sikeresen alkalmaztak lipázokat karbociklusos β -laktámok és β -aminosav észterek rezolválására. Aciklusos β -laktámok szerves közegben történő gyűrűnyitását, valamint aciklusos β -aminosav észterek szerves közegben történő hidrolízisét viszont kevésbé vizsgálták. Doktori munkám célja volt 4-aril- és 4-arilalkil-szubsztituált β -laktámok enzim-katalizált gyűrűnyitási lehetőségeinek tanulmányozása, továbbá β -aril-, β -heteroaril- és β -arilalkil- β -aminosav észterek enantioszelektív enzimatis hidrolízisének kidolgozása (1. ábra).



1. ábra

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A racém kiindulási vegyületek szintézisét irodalmi módszerek felhasználásával valósítottuk meg. Az **1a-i** β -laktámokat klórszulfonil-izocianát megfelelő alkénekre történő addíciójával nyertük. Az **5a-i** β -aminosav észtereket módosított Rodionov-szintézissel nyert β -aminosavak észterezésével, énaminok redukciójával vagy β -laktámok sósavas etanolos gyűrűnyitásával állítottuk elő. Az enzim-katalizált reakciók előkísérletei félmikrométerben folytak. A reakciók előrehaladásának és az izolált termékek enantiomertisztaságának ellenőrzése királis oszloppal felszerelt gázkromatográffal vagy nagy hatékonyságú folyadékkromatográffal történt, a minta szükség szerinti derivatizálása után. A preparatív-mennyiségű rezolválások során nyert enantiomereket optikai forgatás, olvadáspont, elemi analízis valamint NMR adatokkal jellemeztük.

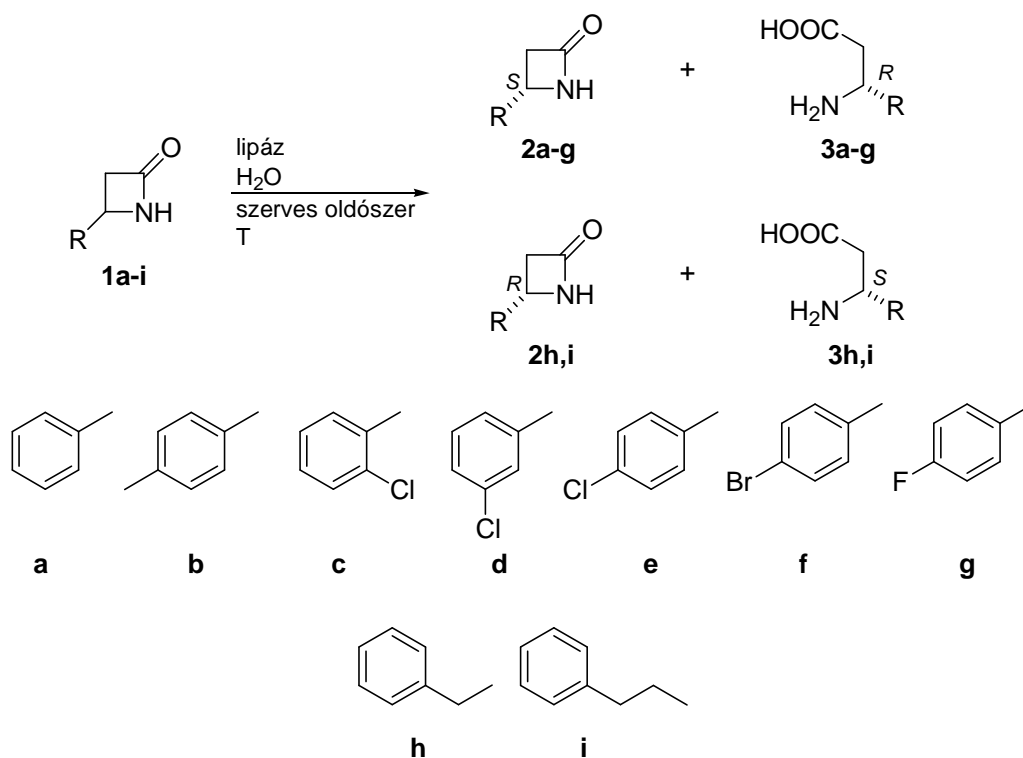
Előkísérletek során tanulmányoztuk az enzimek, különböző szerves oldószerek, a hőmérséklet, az enzim-mennyiség és különböző additívek enantioszelektivitásra és reakciósebességre kifejtett hatását. Az eredmények összegzése után elvégeztük a célvegyületek preparatív-mennyiségű rezolválásait.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. β -Laktámok enzim-katalizált gyűrűnyitása^{I,II,VII}

3.1.1. A 4-fenil-2-azetidion (**1a**) és a 4-feniletíl-2-azetidion (**1i**) enantioszelektív gyűrűnyitására (2. ábra) végzett előkísérletek során megállapítottuk, hogy különböző immobilizált *Candida antarctica* B lipázok (CAL-B), vagyis a Lipolase, a Novozym 435 és a Chyrazyme L-2 kiváló enantioszelektivitással ($E > 200$) katalizálják a 4-fenil-2-azetidion (**1a**) gyűrűnyitását diizopropil-éterben (*i*-Pr₂O), 60 °C-on, 1 ekv. víz jelenlétében. Ugyanakkor a 4-feniletíl-2-azetidion (**1i**) esetében alacsony E értéket (~ 11) tapasztaltunk a fenti CAL-B készítmények és reakciókörülmények jelenlétében, amit a hőmérséklet 45 °C-ra történő csökkentésével sem sikerült megnövelnünk. Egyéb enzimek, így a *Candida antarctica* A lipáz (CAL-A), az AK lipáz (*Pseudomonas fluorescens*), az AY lipáz (*Candida rugosa*) és a sertés hasnyálmirigy lipáz (PPL)

mindkét szubsztrát esetén nagyon alacsony aktivitást és szelektivitást mutatott (konv. $\leq 3\%$, $E \leq 2$).



2. ábra

3.1.2. A kipróbált oldószerek közül az **1a** vegyület gyűrűnyitása *i*-Pr₂O-ben (konv. = 39% 2 h után) és toluolban (konv. = 18% 2 h után) bizonyult enantioszelektívnek ($E > 200$), utóbbiban azonban a reakció lassabban játszódott le. Az **1i** vegyület esetén az oldószer típusának nem volt hatása az enantioszelektivitásra.

3.1.3. Megállapítottuk, hogy a reakcióelegyhez adagolt 1 ekv. trietilamin (Et₃N), *N,N*-diizopropiletilamin (*i*-Pr₂EtN), valamint 2-oktanol nem gyakorolt jelentős hatást sem az enantioszelektivitásra, sem a reakciósebességre egyik modell vegyület esetében sem. Kis léptékű kísérlet esetén a reakció lejátszódott hozzáadott víz nélkül is. Ennek oka, hogy az enzim felületén (< 5%), illetve az oldószerben (< 0.1%) található víz mennyisége elegendő a hidrolízis végbemeneteléhez.

3.1.4. A 4-fenil-2-azetidionon (**1a**) lipáz-katalizált gyűrűnyitási reakciójának sebessége egyértelműen növekedett az enzim mennyiségének növelésével, miközben az enantioszelektivitás minden esetben kiváló ($E > 200$) maradt. A legmagasabb reakciósebességet 75 mg mL^{-1} enzim hozzáadásával érték el, de gazdaságossági okokból a preparatív-mennyiségű rezolválásokat 30 mg mL^{-1} Lipolase enzimmel hajtottuk végre.

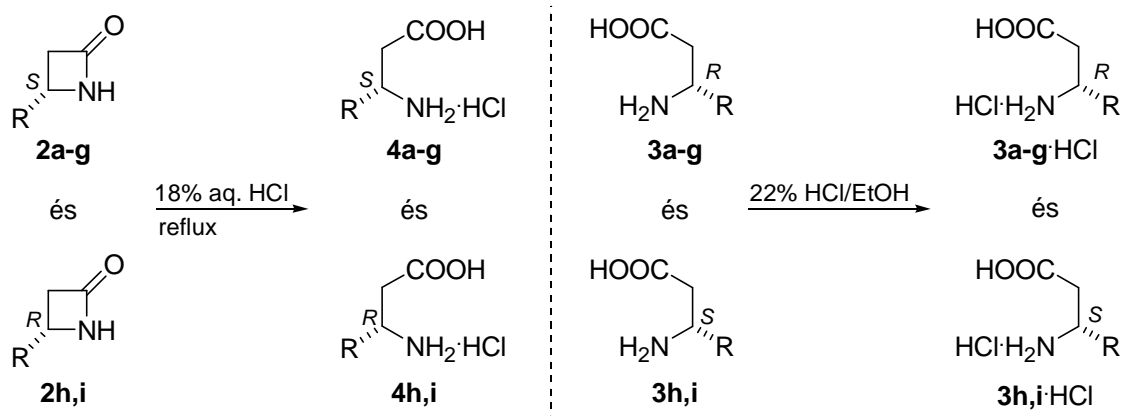
3.1.5. Előállítottuk az *N*-Boc-4-feniletil-2-azetidiont (*N*-Boc-**1i**) és megkíséreltük a Lipolase (50 mg mL^{-1})-katalizált gyűrűnyitást *i*-Pr₂O-ben, 45 °C -on, azonban alacsony enantioszelektivitást tapasztaltunk (konv. = 94% 24 h után, $E = 3$).

3.1.6. Megállapítottuk, hogy a 4-fenil-2-azetidionon (**1a**) Lipolase-katalizált gyűrűnyitása kiváló enantioszelektivitással ($E > 200$) ment végbe szuperkritikus szén-dioxidban (scCO₂), 14 MPa nyomáson és 70 °C -on. A termék **3a** β-aminosavat ($ee \geq 98\%$) és a **2a** el nem reagált β-laktámot ($ee > 99\%$) könnyen választottuk szét 120 h után a **2a** vegyület scCO₂-os extrakciójával, majd az enzim meleg vizes mosásával, mellyel a **3a** aminosav enantiomert nyertük.

3.1.7. Az **1a-g** 4-aril-szubsztituált β-laktámok esetén a preparatív-mennyiségű rezolválásokat Lipolase enzimmel, *i*-Pr₂O-ben, 1 ekv. víz hozzáadásával, 60 °C -on hajtottuk végre. A **2a-g** el nem reagált laktámot és a **3a-g** termék aminosavat minden esetben szerves-vizes extrakcióval választottuk szét. A jó termeléssel (41-49%) előállított enantiomereket magas $ee (\geq 95\%)$ jellemezte.

Az **1h,i** 4-arilalkil-szubsztituált β-laktámok esetén a preparatív-mennyiségű rezolválásokat Lipolase enzimmel, *i*-Pr₂O-ben, 0,5 ekv. víz hozzáadásával, 45 °C -on, két lépésben hajtottuk végre, és nagy enantiomerfelesleggel ($\geq 87\%$), de alacsony termeléssel (27-36%) nyertük a termék **3h,i** β-aminosavakat és a **2h,i** el nem reagált β-laktámokat.

3.1.8. A **2a-i** el nem reagált β-laktámok vizes sósavas gyűrűnyitásával, valamint a **3a-i** termék β-aminosavak sósavas etanolos kezelésével az ee csökkenése nélkül nyertük a megfelelő **4a-i** és **3a-i**·HCl β-aminosav hidrokloridokat (3. ábra).

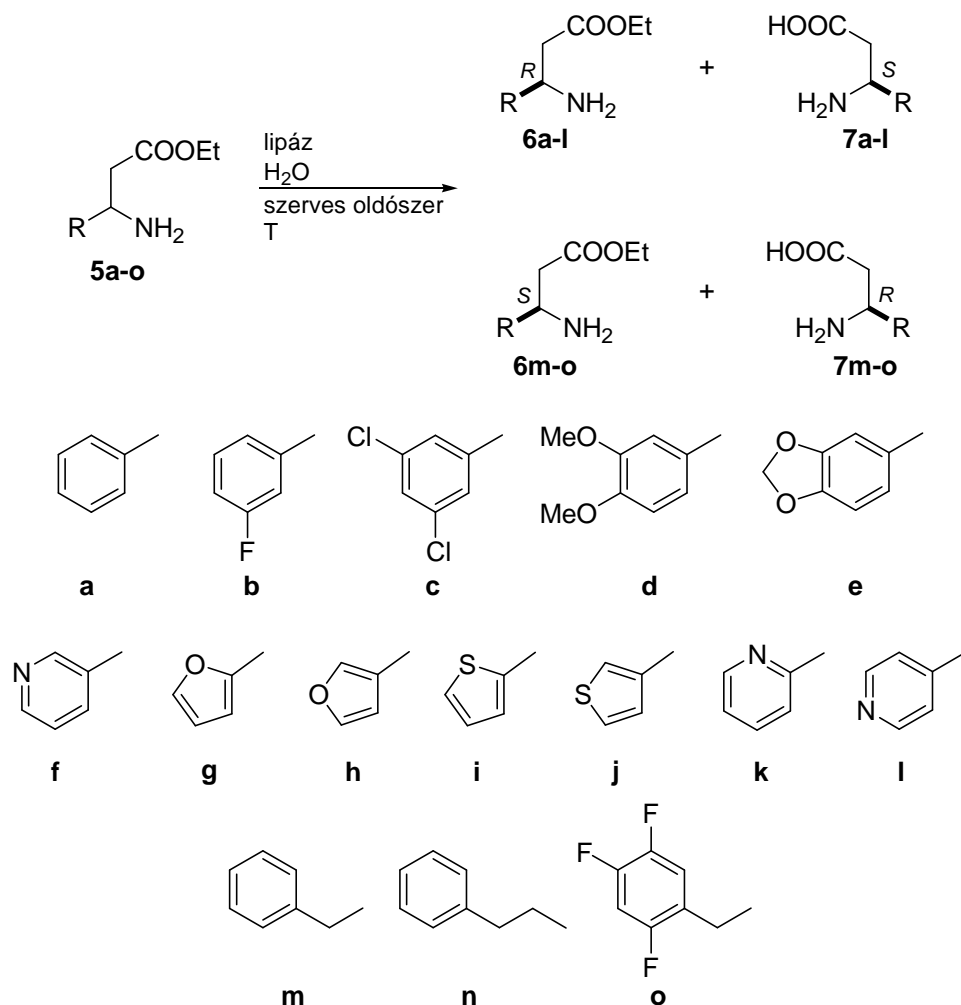


3. ábra

3.1.9. Az abszolút konfigurációkat az enantiomerek optikai forgatóképességeinek irodalmi adatokkal történő összehasonlításával állapítottuk meg. Amennyiben nem állt rendelkezésre forgatási adat, a GC kromatogramok összehasonlítása alapján feltételeztük a Lipolase szelektivitását. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a Lipolase *R*-szelektivitással katalizálta az **1a-g** 4-aryl-szubsztituált β -laktámok, míg *S*-szelektivitással az **1h,i** 4-arylalkil-szubsztituált β -laktámok gyűrűnyitását. (Az arilalkil-szubsztituált vagyületek esetén a Cahn-Ingold-Prelog egyezmény értelmében a szubsztituensek prioritása megváltozik, aminek köszönhetően az enzim látszólag ellentétes szelektivitást mutat.)

3.2. β -Aminosav észterek enzim-katalizált hidrolízise^{III-VI}

3.2.1. Az etil-(3-amino-3-fenilpropionát) (**5a**), az etil-[3-amino-3-(3-piridil)propionát] (**5f**) és az etil-(3-amino-4-fenilbutanoát) (**5m**) enantioszelektív hidrolízisére (4. ábra) végzett előkísérletek során megállapítottuk, hogy a PS lipáz (*Burkholderia cepacia*) készítmények magas enantioszelektivitást (**5a,m** esetében $E > 200$; **5f** esetében $E = 100$) mutatattak *i*-Pr₂O-ben (**5a,f** esetén) vagy *tert*-butil-metil-éterben (*t*-BuOMe) (**5m** esetén), 0.5 ekv. vízzel, 45 °C-on.



4. ábra

Azonban az **5m** β -arilalkil-szubsztituált vegyület esetén az 50%-os konverzió eléréséhez szükséges idő (72 h) többszöröse volt az **5a,f** β -aril- és β -heteroaril-szubsztituált vegyületek hidrolízise során tapasztalt reakcióidőkhöz (5 h, illetve 17 h) képest. A hőmérsékletet 45 °C-ról 25 °C-ra csökkentve, **5m** vegyület hidrolízisének reakciósebessége lecsökkent, míg **5f** vegyület esetében 25 °C-on az enantioszelektivitás nagy mértékben megnőtt ($E > 200$). Így a további kísérleteket az etil-(3-amino-3-fenilpropionát)-tal (**5a**) és az etil-(3-amino-4-fenilbutanoát)-tal (**5m**) 45 °C-on, míg az etil-[3-amino-3-(3-piridil)propionát]-tal (**5f**) 25 °C-on végeztük.

3.2.2. Az oldószer-vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy az **5a,f** aril- és heteroaril-szubsztituált vegyületek hidrolízise magas enantioszelektivitással ($E > 100$) ment végbe *i*-Pr₂O-ben, *t*-BuOMe-ben, *n*-hexánban és toluolban. Az **5m-o** arilalkil-szubsztituált

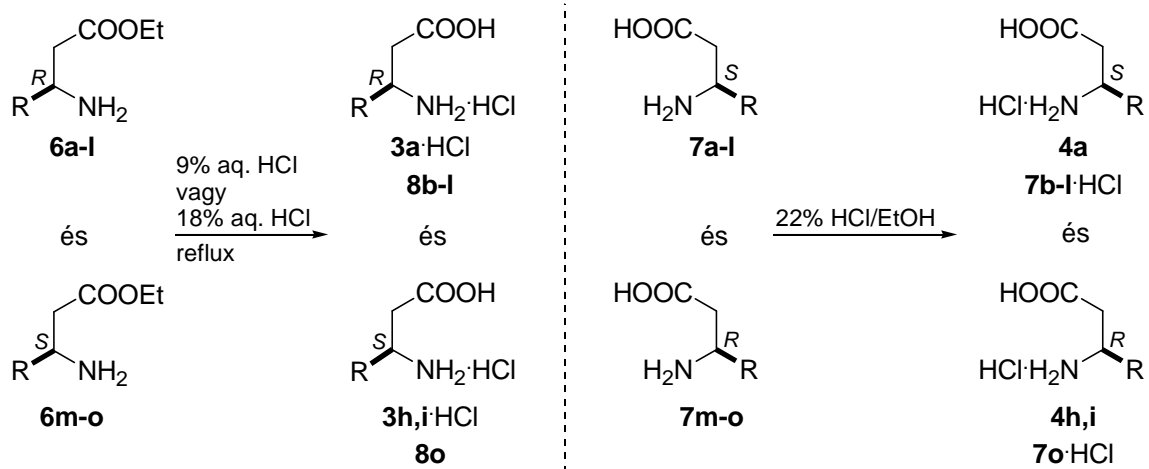
vegyületek esetén jelentősebb oldószerhatást figyeltünk meg: **5m** vegyület hidrolízise magas szelektivitással ment végbe *i*-Pr₂O-ben és *t*-BuOMe-ben is, míg az etil-(3-amino-5-fenilpentanoát) (**5n**) és az etil-[3-amino-4-(2,4,5-trifluorfenil)butanoát] (**5o**) esetén magasabb enantioszelektivitást és reakciósebességet kaptunk *i*-Pr₂O-ben, mint *t*-BuOMe-ben, ezért **5n,o** vegyületek preparatív-mennyiségű hidrolízisét *i*-Pr₂O-ben végeztük.

3.2.3. A reakcióelegyhez adott víz mennyiségének növelése (1 és 5 ekv.) kismértékben megnövelte az **5a,f** aril- és heteroaril-szubsztituált vegyületek esetén a reakciósebességet, míg az **5m** arilalkil-szubsztituált vegyület esetén az ellentétes hatás, a reakciósebesség csökkenése volt megfigyelhető. A szelektivitási érték **5a,m** vegyületek esetén változatlanul magas maradt, **5f** esetében azonban jelentősen lecsökkent ($E \leq 49$). A β -laktámok lipáz-katalizált gyűrűnyitása^{1,II} során tapasztaltakhoz hasonlóan a β -aminosav észterek hidrolízise is lejátszódott hozzáadott víz nélkül kis léptékű kísérlet esetén.

3.2.4. Az enzim mennyiségének növelésével minden modell vegyület hidrolízisének reakciósebessége növekedett. A legnagyobb reakciósebességet 75 mg mL⁻¹ enzim hozzáadásával értük el, de a preparatív-mennyiségű rezolválásokat 30 (**5a,f** esetén) ill. 50 (**5m** esetén) mg mL⁻¹ enzimmel hajtottuk végre.

3.2.5. Megállapítottuk, hogy az etil-(3-amino-4-fenilbutanoát) (**5m**) hidrolízisének reakciósebessége nem növekedett a reakcióelegyhez adagolt 1 ekv. Et₃N, *i*-Pr₂EtN vagy 2-oktanol hatására.

3.2.6. Az előkísérletek eredményeit felhasználva a β -aryl- (**5a-e**), a β -heteroaril- (**5f-l**) és a β -arylalkil- (**5m-o**) β -aminosav észterek preparatív-mennyiségű rezolválásait *i*-Pr₂O-ben vagy *t*-BuOMe-ben, PS lipáz jelenlétében, 0.5 ekv. vízzel 45 °C-on vagy 25 °C-on hajtottuk végre. Magas entiomerefelesleggel ($\geq 96\%$) és jó termeléssel (40-47%) nyertük a **7a-o** β -aminosavakat 50%-os konverzióval. A **6a-o** el nem reagált β -aminosav észtereket vizes sósavval a **3a,h,i**-HCl és **8b-l,o** aminosav hidrokloridokká alakítottuk (40-49%, $ee \geq 96\%$). A **7a-o** vegyületek sósavas etanolos kezelésével a **4a,h,i** és **7b-l,o**-HCl aminosav hidrokloridokat nyertük ($ee \geq 96\%$) (5. ábra).



5. ábra

3.2.7. Az abszolút konfigurációkat az enantiomerek vagy származékaik optikai forgatóképességeinek irodalmi adatokkal történő összehasonlításával állapítottuk meg. Amennyiben nem állt rendelkezésre forgatási adat, a (GC vagy HPLC) kromatogramok vagy az optikai forgatási értékek összehasonlítása alapján feltételeztük a PS lipáz szelektivitását. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a PS lipáz *S*-szelektivitással katalizálta a β -aril- (**5a-e**) és a β -heteroaril- (**5f-l**) β -aminosav észterek, míg *R*-szelektivitással a β -arilalkil- β -aminosav észterek (**5m-o**) hidrolízisét.

4. Az értekezés alapját képező közlemények

- I. E. Forró, T. Paál, **G. Tasnádi**, F. Fülöp
A new route to enantiopure β -aryl-substituted β -amino acids and 4-aryl-substituted β -lactams through lipase-catalyzed enantioselective ring cleavage of β -lactams
Adv. Synth. Catal. **2006**, *348*, 917-923.
IF: 4.762
- II. **G. Tasnádi**, E. Forró, F. Fülöp
Candida antarctica lipase B-catalyzed ring opening of 4-arylalkyl-substituted β -lactams
Tetrahedron: Asymmetry **2007**, *18*, 2841-2844.
IF: 2.634
- III. **G. Tasnádi**, E. Forró, F. Fülöp
An efficient new enzymatic method for the preparation of β -aryl- β -amino acid enantiomers
Tetrahedron: Asymmetry **2008**, *19*, 2072-2077.
IF: 2.796
- IV. **G. Tasnádi**, E. Forró, F. Fülöp
Burkholderia cepacia lipase as an excellent enzyme for the enantioselective hydrolysis of β -heteroaryl- β -amino esters
Tetrahedron: Asymmetry **2009**, *20*, 1771-1777.
IF: 2.625
- V. **G. Tasnádi**, E. Forró, F. Fülöp
Improved enzymatic syntheses of valuable β -arylalkyl- β -amino acid enantiomers
Org. Biomol. Chem. **2010**, *8*, 793-799.
IF: 3.762 (2009)
- VI. **G. Tasnádi**, E. Forró, F. Fülöp
 β -Aryl- és β -heteroaryl- β -aminosav enantiomerek enzimatis úton történő előállítása
Magy. Kém. Foly. **2010**, közlésre elfogadva.
- VII. M. Utczás, E. Székely, **G. Tasnádi**, É. Monek, L. Vida, E. Forró, F. Fülöp, B. Simándi
Kinetic resolution of 4-phenyl-2-azetidinone in supercritical carbon dioxide
J. Supercrit. Fluids **2010**, bírálatra beküldve.

A megjelent közlemények összesített impakt faktora: 16.579

5. Az értekezéssel kapcsolatos külföldi és hazai előadások

- I. Vegyészkonferencia, 2005. június 28-30., Hajdúszoboszló, poszter előadás:
Forró Enikő, Paál Tihamér, **Tasnádi Gábor**, Fülöp Ferenc
4-aril-szubsztituált β -laktámok lipáz-katalizált enantioszelektív gyűrűnyitása
(P-27) (III. díj)
- II. Multi-step Enzyme Catalysed Processes, 2006. április 18-21., Graz, Ausztria,
poszter előadás:
Gábor Tasnádi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Enantioselective ring cleavage of 4-substituted β -lactams (P-65)
- III. Clauđer Ottó-emlékverseny, 2007. április 12-13., Budapest, szóbeli előadás:
Tasnádi Gábor
4-Szubsztituált β -laktámok enzim-katalizált gyűrűnyitási lehetőségeinek vizsgálata
(különdíj)
- IV. Training school in biocatalysis, 2007. április 28 – május 3., Siena, Olaszország,
szóbeli előadás:
Gábor Tasnádi
Enzyme-catalysed ring-opening of 4-substituted- β -lactams
- V. “Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért” Alapítvány 8. tudományos
előadó ülése, 2008. április 16., Szeged, szóbeli előadás:
Tasnádi Gábor
3-Amino-3-arilpropionsav enantiomerek enzimátikus úton történő előállítás
- VI. 20th International Symposium on Chirality, 2008. július 6-9., Genf, Svájc, poszter
előadás:
Gábor Tasnádi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Enantioselective hydrolysis of ethyl 3-amino-3-arylpropionates (P-2)
- VII. 16th European Symposium on Organic Chemistry, 2009. július 12-16., Prága,
Cseh Köztársaság, poszter előadás:
Gábor Tasnádi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Lipase PS-catalysed hydrolysis of β -heteroaryl-substituted β -amino esters (P2-
198)
- VIII. Foldamers: building blocks, structure and function, 2009. szeptember 24-26.,
Szeged, poszter előadás:
Gábor Tasnádi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
*An improved enzymatic method for the preparation of valuable β -arylalkyl- β -
amino acid enantiomers* (P-11)