



УДК 547.466'539.111:577.152.351:542.98

© 1993 В. А. Солошонок, И. Ю. Галаев*,
В. К. Швядас*, Е. В. Козлова*, Н. В. Котик,
И. П. Шишкина, С. В. Галушко, А. Б. Роженко, В. П. Кухарь

ГОМОХИРАЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

I. ПРЕПАРАТИВНЫЙ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ *L*- И *D*-ФЕНИЛГЛИЦИНОВ

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев;

* Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва

Предложен биокаталитический метод получения гомохиральных *o*- и *n*-фторзамещенных фенилглицинов энантиоселективным гидролизом их *N*-фенилацетильных или *N*-ацетильных производных под действием пенициллинацилазы из *Escherichia coli* или аминокислотазы из *Streptovercillium olivoreticuli*. *L*-Форму аминокислоты и негидролизованый *D*-энантиомер исходного производного разделяли методами экстракции и хроматографии. Кислотный гидролиз *D*-энантиомеров *N*-фенилацетильных производных фторзамещенных фенилглицинов приводит к частичной (до 15%) рацемизации. При существенно более высокой (на два порядка) концентрации фермента и увеличении продолжительности реакции пенициллинацилаза может быть использована как катализатор гидролиза *D*-энантиомера *N*-фенилацетильного производного, не сопровождающегося сколько-нибудь заметной рацемизацией.

Фторсодержащие аминокислоты (ФАК) в настоящее время рассматриваются как один из наиболее перспективных классов низкомолекулярных биорегуляторов [1—3]. Это обусловлено не только биологической активностью самих ФАК, но и возможностью их включения в более сложные молекулы пептидов или даже белков [4]. Для детального изучения биологического действия ФАК и их введения в пептидный синтез необходимы оптически чистые формы этих соединений, что подчеркивает актуальность поиска удобных методов получения гомохиральных ФАК.

Недавно мы начали работу в области асимметрического синтеза ФАК с применением хиральных вспомогательных реагентов — Ni(II)-комплексов оснований Шиффа аминокислот [5]. Однако получение элементоорганических аналогов природных аминокислот лишь одним методом имеет ряд объективных ограничений, связанных как с реакционной способностью используемых реагентов, так и с возможностью получения требуемых ФАК в больших количествах. Поэтому использование для получения гомохиральных ФАК методов асимметрического синтеза и инженерной энзимологии как в качестве самостоятельных подходов, так и в виде общего химико-энзиматического метода будет более перспективным и реалистичным.

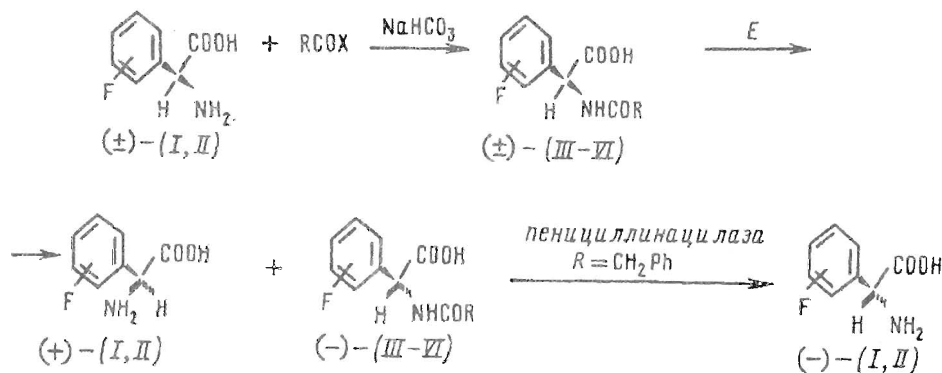
Интерес к фторированным аналогам фенилглицина связан с их применением в синтезе новых β -лактамных антибиотиков (пенициллинов и цефалоспоринов) [6—12], а также в синтезе анальгетиков [13] и подсластителей [14].

Известно лишь несколько примеров биокаталитического получения оптически чистых фторфенилглицинов (I), (II). Так, для получения *L*- и *D*-*n*-фторфенилглицинов использовали обладающий ацилазной активностью гомогенат клеток

Escherichia coli, с помощью которого был проведен энантиоселективный гидролиз *L*-формы *N*-ацильного производного; *D*-изомер аминокислоты был получен химическим гидролизом оставшегося в реакционной смеси *N*-ациламида [15]. Кроме того, исследовали влияние заместителей в фенильном кольце ароматических аминокислот на субстратную специфичность оксидаз *L*- и *D*-аминокислот, в том числе и рацематов фторзамещенного фенилглицина [16, 17].

В настоящей работе нами предложен удобный препаративный метод получения энантиомерно чистых *L*- и *D*-изомеров *o*- и *p*-фторзамещенных фенилглицинов (I), (II) энантиоселективным гидролизом их *N*-фенилацетильных и *N*-ацетильных производных под действием пенициллинацилазы из *E. coli* и аминоацилазы из *Streptovorticillium olivoreticuli* соответственно.

Фторсодержащие *N*-фенилацетил- и *N*-ацетилфенилглицины (III)—(VI) синтезированы с хорошим выходом ацилированием рацематов соответствующих аминокислот фенилацетилхлоридом или укусным ангидридом соответственно в присутствии NaHCO_3 (см. схему). Получаемые этим способом *N*-ацилфенилглицины (III)—(VI) могут быть использованы для энзиматического разделения без дополнительной очистки.

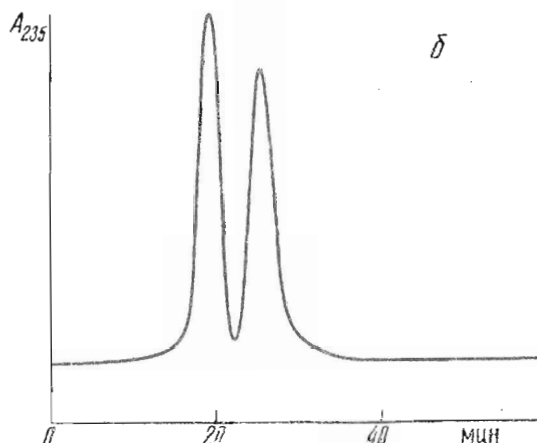
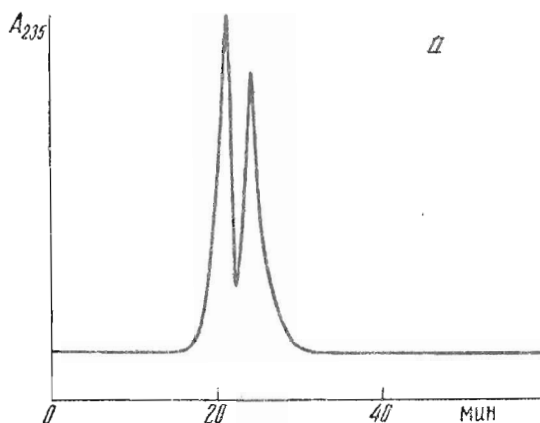


(I) — 2F; (II) — 4F; (III) — 2F, R = CH_2Ph ; (IV) — 4F, R = CH_2Ph ; (V) — 2F, R = CH_3 ; (VI) — 4F, R = CH_3 ; X = Cl, OCOCH_3 ; E — аминоацилаза, пенициллинацилаза

Энантиомерный состав *o*-фторфенилглицина установлен при помощи ВЭЖХ на хиральных сорбентах, содержащих остатки *L*-пролина и *L*-гидроксипролина, по предложенному нами ранее методу [18]. Однако этот метод оказался неприменимым для определения оптической чистоты *p*-фторфенилглицина. Достаточно эффективное разделение энантиомеров (I), (II) удалось осуществить на хиральном сорбенте с остатками *L*-валина (рисунок). Более подробно результаты исследования хроматографического поведения фторзамещенных фенилглицинов будут обсуждены в отдельной работе.

При действии аминоацилазы из *S. olivoreticuli* с высокой энантиоселективностью протекает гидролиз *L*-энантиомеров *N*-ацетил-*o*-фтор- и *N*-ацетил-*p*-фторфенилглицинов, а в присутствии пенициллинацилазы из *E. coli* такому же превращению подвергаются *L*-энантиомеры *N*-фенилацетильных производных *o*- и *p*-фторфенилглицинов. В обоих случаях эффективность действия фермента мало зависит как от наличия, так и от расположения атома фтора в ароматическом цикле.

Для получения (—)-изомеров *o*- и *p*-фторфенилглицинов из соответствующих (—)-амидов исследованы кислотный и ферментативный гидролиз *N*-фенилацетильной группировки. Установлено, что гидролиз (—)-изомера фенилацетильного производного в кипящей 6 н. соляной кислоте сопровождается значительной рацемизацией (—)-изомера (до 15% *S*-формы). Попытки снизить



Разделение энантимеров *p*-фторфенилглицина (а) и *o*-фторфенилглицина (б)

степень рацемизации путем уменьшения температуры реакции до 20°C и использования смеси (1 : 1) концентрированных HCl и HCOOH оказались безуспешными; изменение условий реакции приводит лишь к значительному ее замедлению при той же степени рацемизации (12—15% *S*-формы).

Хотя пенициллинацилаза обладает высокой энантиоселективностью по отношению к подобным субстратам, повышение концентрации фермента в реакционной смеси на два порядка до $(5-8) \cdot 10^{-7}$ М и увеличение продолжительности реакции с 4—6 ч до 5—7 сут позволяет количественно гидролизовать и *R*-форму субстрата в мягких условиях без заметной рацемизации. Выход, данные элементного анализа, углы вращения и величины температур плавления *L*- и *D*-изомеров приведены в таблице.

Таким образом, нами разработана удобная препаративная методика получения *L*- и *D*-энантиомеров фторзамещенных фенилглицинов с помощью пенициллинацилазы из *E. coli* и аминокислоты из *S. olivoreticuli*. Пенициллинацилаза успешно использована как катализатор ступенчатого гидролиза рацемической смеси: на первом этапе проводится энантиоселективный гидролиз более реакционноспособного *L*-энантиомера фенилацетильного производного, а затем, при существенно более высокой концентрации биокатализатора, в мягких условиях и без сколько-нибудь заметной рацемизации — отщепление фенилацетильной группы от менее реакционноспособного *D*-энантиомера.

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат аминоксилазы из *S. olivoreticuli* (КФ 3.5.1.14) с активностью 250—300 ед./мг белка и $3 \cdot 10^{-6}$ М препарат пенициллинацилазы (КФ 3.5.1.11) из *E. coli*. Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли титрованием фенолметилсульфонилфторидом [19].

Рацематы *o*- и *n*-фторфенилглицинов — препараты производства Serva (ФРГ), остальные реактивы — отечественного производства марки ч. д. а.

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker WP-200 (ФРГ) в CD_3COCD_3 . В качестве внутренних стандартов использовали гексаметилдисилазан (1H) и CCl_3F (^{19}F). Химические сдвиги (δ) приведены в миллионных долях, КССВ — в герцах.

Энантиомерную чистоту фторзамещенных фенилглицинов определяли с помощью энантиоселективной хроматографии на колонке (4,6×250 мм) Si 100 Polyol Chiral Val-Cu, 5 мкм (Serva, Германия), подвижная фаза — 2,5 мМ $CuSO_4$ (0,75 мл/мин, 35° С, детекция при 235 нм).

Величины удельного оптического вращения измеряли на приборе Perkin — Elmer 241 (Великобритания).

Растворы упаривали в вакууме (40 мм рт. ст.) при температуре ниже 50° С.

Ацилирование *o*- и *n*-фторфенилглицинов. Смесь 15 ммоль *o*- или *n*-фторфенилглицина и 57 ммоль $NaHCO_3$ нагревали в 170 мл водного ацетона (1 : 1) до полного растворения. К полученному раствору при $-8 + -5^\circ C$ в течение 30 мин прибавляли при перемешивании раствор 34 ммоль хлорангидрида фенилуксусной кислоты или уксусный ангидрид в смеси ацетон — вода (1 : 1). Полученную смесь продолжали перемешивать 2 ч при $-5 + 0^\circ C$, затем еще 1 ч при 20° С. Реакционную смесь фильтровали, маточник экстрагировали эфиром и подкисляли 2 н. HCl до pH 2. Продукт экстрагировали этилацетатом (3×100 мл). Этилацетатные вытяжки упаривали, остаток кристаллизовали из толуола. Получили *N*-фенилацетильные и *N*-ацетильные производные *o*- и *n*-фторфенилглицинов (III, IV и V, VI) (таблица). Строение этих веществ подтверждено данными ЯМР-спектров (приведены сигналы 1H -ЯМР и сигнал $CF_{аром}$ (1H) ^{19}F -ЯМР-спектра). (III): 3,62 (с, 2H, CH_2), 5,83 (м, 1H, CH), 7,10—7,55 (м, 9H, $CH_{аром}$), 7,85 (д, 1H, J 7, NH); ^{19}F : -117,1. (IV): 3,62 (с, 2H, CH_2), 5,51 (м, 1H, CH), 7,05—7,55 (м, 9H, $CH_{аром}$), 7,85 (д, 1H, J 7, NH); ^{19}F : -114,2. (V): 1,97 (с, 3H, CH_3), 5,86 (м, 1H, CH), 7,10—7,55 (м, 4H, $CH_{аром}$), 7,86 (м, 1H, J 7, NH); ^{19}F : -117,3. (VI): 1,97 (с, 3H, CH_3), 5,53 (м, 1H, CH), 7,08—7,18 (м, 2H, $CH_{аром}$), 7,45—7,55 (м, 2H, $CH_{аром}$), 7,85 (уш. д, 1H, J 8, NH); ^{19}F : -114,2.

О протекании ферментативного гидролиза при высоких концентрациях (0,01—0,5 М) ацильных производных (III—VI) судили по образованию свободных аминокислот, которые количественно определяли с помощью *o*-фталевого альдегида [20], учитывая коэффициенты молярного поглощения для *o*- и *n*-фторфенилглицинов (5600 и 5400 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ соответственно).

За ходом катализируемого пенициллинацилазой гидролиза *N*-фенилацетил-*o*- и *n*-фторфенилглицинов при низких концентрациях (50—500 мкМ) субстрата следили по изменению поглощения при длинах волн 220 и 222 нм (разностные молярные коэффициенты поглощения 400 и 500 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ соответственно).

Препаративное получение *L*-энантиомеров *o*- или *n*-фторфенилглицина (+)-(I, II) и *D*-энантиомеров их *N*-ацетильных производных (—)-(V, VI). К 0,2 М раствору рацемата (V) или (VI) при pH 7,6—7,7 прибавляли препарат аминоксилазы из расчета 0,02 мг/мл. После окончания гидролиза *L*-изомеров *N*-ацетильных производных реакционную смесь подкисляли соляной кислотой до pH 4,0, трижды экстрагировали равным объемом этилацетата. Водный слой упаривали, остаток растворяли в дистиллированной воде, аминокислоту выделяли на дауксе-50 (H^+ -форма). Выход и характеристики для *L*-изомеров аминокислот (+)-(I, II) приведены в таблице. Органический слой упаривали, к

Свойства фторзамещенных фенилглицинов и их N-ацильных производных

Соединение	Т. пл., °С	Данные элементного состава: найдено/вычислено, %						[α] ²⁵ при λ, нм*					Выход, %
		C	H	N	F	589	578	546	436	365			
(±)-(III)	170—172	66,74 66,89	5,10 4,91	6,64 6,61	4,89 4,87								73
(±)-(IV)	177—178	67,01 66,89	5,03 4,91	6,67 6,61	4,77 4,87								61
(-)-(III)	132—134	67,00 66,89	4,99 4,91	6,62 6,61	5,00 4,87	-120,3	-124,9	-143,7	-265,3	-469,3			68
(-)-(IV)	165	66,93 66,89	5,11 4,91	6,61 6,61	4,91 4,87	-110,8	-115,9	-133,4	-246,8	-439,0			73
(±)-(V)	214—215	56,94 56,87	4,82 4,77	9,21 8,99	6,83 6,63								74
(±)-(VI)	184—185	56,73 56,87	4,79 4,77	9,17 8,99	6,79 6,63								75
(-)-(V)	176—177	56,88 56,87	4,93 4,77	9,09 8,99	6,77 6,63	-162,0	-168,8	-195,5	-365,3	-644,8			74
(-)-(VI)	169—171	56,75 56,87	4,80 4,77	9,11 8,99	6,70 6,63	-148,7	-157,3	-181,2	-336,3	-594,8			71
(+)-(I)	>300			11,18 11,23	8,31 8,28	108,9	113,5	129,7	232,9	394,7			86
(+)-(III)	>300			11,00 11,23	8,34 8,28	143,1	150,2	172,4	312,0	537,6			91
(-)-(I)	>300			11,21 11,23	8,24 8,28	-108,5	-113,2	-129,5	-232,0	-393,4			74
(-)-(III)**	>300			11,22 11,23	8,01 8,28	-144,1	-151,3	-173,7	-314,5	-542,3			81

* Углы вращения соединений (-)-(III), (-)-(IV), (-)-(V) и (-)-(VI) измерены в ацетоне, остальных — в б н. HCl, концентрации (%) следующие: (-)-(III) — 0,9, (-)-(IV) — 0,9, (-)-(V) — 0,6, (-)-(VI) — 1,0, (+)-(I) — 0,8, (+)-(II) — 0,9, (-)-(I) — 0,7, (-)-(II) — 1,0.
** Фирма Флюка (Швейцария) предлагает D-n-фторфенилглицин с [α]₅₄₆²⁰ — 165 ± 2° (с 1, HCl).

остатку прибавляли равный объем ацетона, нагревали до кипения, нерастворившийся материал отфильтровывали. Ацетон упаривали, остаток кипятили в бензоле, охлаждали и отфильтровывали осадок соответствующего *D*-изомера. Выход и характеристики *D*-изомеров *N*-ацетильных производных *o*- и *p*-фторфенилглицинов (—)-(V, VI) приведены в таблице.

*Препаративное получение L-энантиомеров аминокислот (+)-(I, II) и D-энантиомеров их N-фенилацетильных производных (—)-(III, IV) с помощью пенициллинацилазы проводили аналогичным образом, создавая в реакционной среде концентрацию фермента $(3-5) \cdot 10^{-9}$ М. Выход и характеристики D-изомеров N-фенилацетильных производных *o*- и *p*-фторфенилглицинов (—)-(III, IV) приведены в таблице. После упаривания бензольного раствора регенерировали фенилуксусную кислоту с выходом 93—97%.*

Препаративное получение D-энантиомеров (—)-(I, II). К 0,2 М раствору D-изомеров (III или IV) при pH 7,6—7,7 прибавляли пенициллинацилазу, создавая в реакционной среде концентрацию $(5-8) \cdot 10^{-7}$ М. После окончания гидролиза смесь подкисляли соляной кислотой до pH 4,0, упаривали, к остатку прибавляли дистиллированную воду, кипятили 3—5 мин с активированным углем и фильтровали. Маточник трижды экстрагировали равным объемом этилацетата. D-Изомеры (I или II) выделяли из водного слоя на дауэксе-50 (H⁺-форма). Из этилацетатных вытяжек регенерировали фенилуксусную кислоту с выходом 80—89%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кобаяси Е., Кумагане Н., Тагути Т.//Новое в технологии соединений фтора/Ред. Н. Исигава. М.: Мир, 1984. С. 526.
2. Кухарь В. П., Ягупольский Ю. Л., Сололонок В. А.//Успехи химии. 1990. Т. 59. № 1. С. 149—174.
3. Кухарь В. П., Сололонок В. А.//Успехи химии. 1991. Т. 60. № 8. С. 1680—1707.
4. Imperially B.//Adv. in Biotechnological Processes. V. 10. Synthetic Peptides in Biotechnology/Ed. A. Mizrahi. N. Y.: Alan R. Liss Inc., 1988. P. 97—131.
5. Сололонок В. А., Свистунова Н. Ю., Кухарь В. П., Гудима А. О., Кузьмина Н. А., Белоконь Ю. Н.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1992. № 5. С. 1172—1175.
6. McGregor D.//US Pat. 3579514. С. А. 1971. V. 75. 63805k.
7. Wiliner D.//US Pat. 3634418. С. А. 1972. V. 76. 99689k.
8. Holdrege C. T.//US Pat. 3634405. С. А. 1972. V. 76. 99653u.
9. Holdrege C. T.//US Pat. 3646024. С. А. 1972. V. 77. 34543j.
10. Holdrege C. T.//US Pat. 3687949. С. А. 1972. V. 77. 164721b.
11. Dunn G. L., Hoover J. R. T.//Brit. Pat. 1296081. С. А. 1973. V. 78. 844425p.
12. Holdrege C. T.//Can. Pat. 966853. С. А. 1975. V. 83. 164165x.
13. Negro A., Diez M. T., Alemany M. T.//Org. Prep. and Proc. Int. 1988. V. 20. № 4. P. 414—418.
14. Janucz J. M., Gardlik J. M., Young P. A., Burkes R. V., Stoll S. J., Estelle A. F., Riley C. M.//J. Med. Chem. 1990. V. 33. № 3. P. 1052—1061.
15. Cole M., Uffing K.//Brit. Pat. 1369462. С. А. 1975. V. 82. 84488u.
16. Niems A. H., Deluca D. C., Hellerman V.//Biochemistry. 1966. V. 5. № 1. P. 203—213.
17. Radda G. K.//Nature. 1964. V. 203. P. 936—938.
18. Galushko S. V., Shishkina I. P., Soloshonok V. A.//J. Chromatogr. 1992. V. 592. P. 345—348.
19. Швадас В. К., Марголин А. Л., Шерстюк С. Ф., Клесов А. А., Березин И. В.//Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 4. С. 546—553.
20. Галаев И. Ю., Швадас В. К., Арен А. К., Березин И. В.//Прикл. биохимия и микробиология. 1980. Т. 16. № 2. С. 281—283.

Поступила в редакцию
6.VIII.1992

После доработки
13.X.1992

V. A. Soloshonok, I. Yu. Galaev*, V. K. Švedas*,
E. V. Kozlova*, N. V. Kotik, I. P. Shishkina,
S. V. Galushko, A. B. Rozhenko, V. P. Kukhar

HOMOCHIRAL ORGANOELEMENT ANALOGUES OF NATURAL COMPOUNDS.

I. BIOCATALYTIC METHODS FOR PRODUCTION OF FLUORINE CONTAINING L- AND D-PHENYLGLYCINE ON PREPARATIVE SCALE

Institute of Bioorganic Chemistry and Petroleum Chemistry, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev;

* *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow*

A convenient method was developed for production of homochiral *o*- and *p*-fluorophenylglycine by the enantioselective hydrolysis of their N-acetyl or N-phenylacetyl derivatives with aminoacylase from *Streptovercillium olivoreticuli* or penicillin acylase from *Escherichia coli* to yield L-enantiomer. Acid deacylation of D-(N-phenylacetyl) derivatives is accompanied by partial (up to 15%) racemization. On the other hand, phenylacetyl derivatives of D-*p*- and D-*o*-fluorophenylglycine can be efficiently hydrolysed without racemization with the use of penicillin acylase in high concentrations.