



УДК 542.91:547.466.416+572.152.3

© 1993 В. А. Солошонок, В. К. Швядас*,
В. П. Кухарь, И. Ю. Галаев*, Е. В. Козлова*,
Н. Ю. Свистунова

ГОМОХИРАЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

III. БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГОМОХИРАЛЬНЫХ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ (R)-, (S)-ФЕНИЛАЛАНИНОВ И (S, R)-, (R, S)-ФЕНИЛСЕРИНОВ

*Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев;
* Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва*

Предложен удобный биокаталитический метод получения гомохиральных S-, R-трео-β-(4-фтор-фенил)серина, 2-фтор-, 3-фтор-, 4-фтор- и 2, 3, 4, 5, 6-пентафторфенилаланина энантиоселективным гидролизом их рацемических N-фенилацетильных производных под действием пенициллинацилазы из *Escherichia coli*.

Фторсодержащие фенилаланины (FPhe), одни из первых описанных фторированных аналогов природных аминокислот, изучаются уже более 50 лет [2]. Широкий спектр биологической активности, а также разнообразие возможностей их использования как «меченых» аминокислот в биологических экспериментах [3] поддерживают интерес к этим соединениям до настоящего времени. Кроме того, применение фторзамещенных аминокислот, в том числе и FPhe, для модификации природных пептидов [4] обуславливает потребность в гомохиральных FPhe.

Среди существующих современных методов получения чистых энантиомеров FPhe в первую очередь следует отметить ферментативное трансаминирование фторзамещенных β-фенилпировиноградных кислот [5] и аминирование фторзамещенных коричных кислот в присутствии фенилаланин-аммиак-лиазы [6], позволяющие с высоким выходом и из доступных исходных соединений получить гомохиральные (S)-FPhe. Эти методы, однако, не пригодны для синтеза (R)-энантиомеров FPhe.

Ранее нами предложен метод асимметрического синтеза FPhe, заключающийся в алкилировании соответствующими фторзамещенными бензилгалогенидами фрагмента глицина в Ni(II)-комплексе основания Шиффа глицина с (S)-2-N-(N^α-бензилпролил)аминобензофеноном [7]. Реакция алкилирования Ni(II)-комплекса протекает с достаточно высокой энантиоселективностью, позволяя получать FPhe с оптической чистотой до 90%. Однако для получения гомохиральных FPhe в препаративных количествах требуется довольно трудоемкая процедура хроматографического разделения диастереомерных Ni(II)-комплексов либо кристаллизация оптически активного продукта, приводящая к потере ценных целевых аминокислот.

Один из наиболее перспективных подходов для получения обоих энантиомеров FPhe — биокаталитическое превращение соответствующего производного лишь

¹ Сообщение II см. [1].

Свойства синтезированных соединений (S, R)-(Ша)—д

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Данные элементного анализа		Данные ¹ H-ЯМР-спектров, CD ₃ COCD ₃ , δ, м. д., J (Гц)						
			Формула	Найдено/вычислено, %		NH	CH _{аром}	CH ₂	CH	CH ₂ -Ph	Другие группы
				С	H						
(IIa)	83	120—125	C ₁₇ H ₁₆ FNO ₄	64,83 64,35	4,99 5,08	7,8 уш-д (6,9)	6,8—7,4 м	—	—	3,5 AB (14,3)	4,1 д (1H, α-CH, 5,0), 5,2 д (1H, β-CH, 5,0)
(IIб)	76	143—147	C ₁₇ H ₁₆ FNO ₃	68,01 67,76	5,44 5,35	7,9 м	6,8—7,5 м	3,3 ABX (5,1), (7,9) (13,9)	4,7 дд (8,0), (5,2)	3,5 AB (14,6)	—
(IIв)	77	139—144	C ₁₇ H ₁₆ FNO ₃	68,24 67,76	5,34 5,35	8,0 м	6,7—7,5 м	3,1 ABX (5,3), (8,0), (13,8)	4,4 дд (8,0), (5,3)	3,7 AB (13,9)	—
(IIг)	71	151—153	C ₁₇ H ₁₆ FNO ₃	68,03 67,76	5,53 5,35	7,7 м	6,6—7,4 м	3,1 ABX (5,3), (7,9), (13,8)	4,4 дд (7,9), (5,3)	3,6 AB (14,3)	—
(IIд)	84	145—147	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ NO ₃	54,91 54,70	3,37* 3,24	8,0 м	7,2—7,3 м	3,2 ABXY** (5,4), (9,2), (14,0), (1,2)	4,8 дд (9,4), (5,6)	3,5 AB (14,5)	—

* Найдено, %: F 25,17. Вычислено, %: F 25,45.

** Спектр ¹⁹F-ЯМР (CD₃COCD₃, δ, м. д.): —143,7 м (2F, CF_{аром}), —159,3 м (1F, CF_{аром}), —165,2 (2F, CF_{аром}).

Свойства полученных фторсодержащих аминокислот (S)- и (R)-(Ia—д)

Соединение	Т. пл., °С	Выход, %	$[\alpha]_D^{25}$ (с, H ₂ O)	Литературные данные $[\alpha]_D^{25}$ (с, H ₂ O)	Литература
(S)- <i>трео</i> -(Ia)	203—205	84	—20,3 (0,3)		
(R)- <i>трео</i> -(Ia)	201—205	54	+19,4 (0,09)	+20,5 (0,2)	[12]
(S)-(Iб)	208—212	91	—14,3 (0,2)	—14,3 (0,2)	[7]
				—12,1	[6]
(R)-(Iб)	205—208	73	+13,9 (0,1)	+15 (2,0)*	[9]
(S)-(Iв)	240—243	89	—27,1 (0,2)	—27,0 (0,25)	[7]
				—25,0	[6]
				—24,0 (2,0)	[9]
				—25,2 (1,0)**	[8]
(R)-(Iв)	233—241	74	+26,7 (0,2)	+22,0 (2,0)	[9]
(S)-(Iг)	252—254	94	—27,0 (0,2)	—26,9 (0,3)	[7]
				—22,0	[6]
				—23,0 (2,0)	[9]
				—25,1 (1,0)***	[8]
(R)-(Iг)	249—253	79	+26,5 (0,3)	+24,0 (2,0)	[9]
(S)-(Iд)	240—243	95	+22,0 (0,1)	+19,3 (1,0)**	[8]
				+22,4 (1,0)	
(R)-(Iд)	236—238	83	—21,5 (0,1)	—21,0 (0,65)	[13]

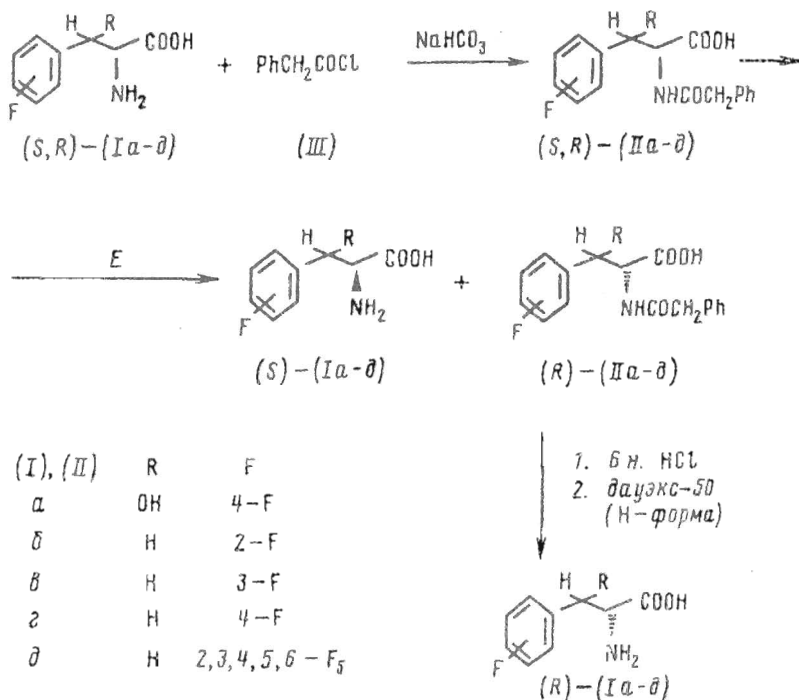
* Моногидрат гидрохлорид.

** При 18° С.

*** При 20° С.

одного из энантиомеров в рацемической смеси. Так, с помощью субтилизина типа Карлсберг [8] проведен энантиоселективный гидролиз только *L*-энантиомеров метиловых эфиров *N*-бензил-3- и *N*-бензил-4-фторфенилаланина. Однако из-за неполноты протекания реакции оставшиеся *D*-энантиомеры выделены с низкой оптической чистотой. С помощью папаина [9] получены оптически чистые 2-, 3- и 4-фторфенилаланины энантиоселективным синтезом нерастворимых *N*-ацетилфенилгидразидов из фенилгидразидов и ацетильных производных соответствующих фторфенилаланинов. Недостаток метода — получение в результате биокаталитической реакции не свободных аминокислот, а их производных. В результате энантиоселективного гидролиза *N*-ацетилпентафторфенилаланина с помощью ацилазы I свиньи почки [10] и этилового эфира 4-фторфенилаланина с помощью α -химотрипсина [11] достигнут 50—60%-ный выход *L*-энантиомеров свободных аминокислот. Нами предложен метод ферментативного получения фторзамещенных фенилаланинов и фенилсеринов с помощью пенициллинацилазы из *Escherichia coli* (КФ 3.5.1.11), причем биокаталитическое разделение последних в литературе не описано.

N-Фенилацетильные производные *трео*- β -(4-фторфенил)серина (IIa), 2-фтор-(IIб), 3-фтор- (IIв), 4-фтор- (IIг) и 2, 3, 4, 5, 6-пентафторфенилаланина (IIд) получены с высокими выходами (табл. 1) по реакции Шоттен-Баума фенилацетилированием аминокислот (Ia—д) хлорангидридом фенилуксусной кислоты (III) в присутствии бикарбоната натрия при мольном соотношении реагентов (I)—(III)—NaHCO₃, равном 1:2:4, и высокой концентрации реагирующих веществ.



Пенициллинацилаза из *E. coli* энантиоселективно гидролизует *L*-энантиомеры *N*-фенилацетильных производных (IIa—д), причем достаточно высокая эффективность действия фермента мало зависит как от наличия, так и от положения атома фтора в фенильном кольце аминокислот.

Препаративное получение *L*-изомеров (Ia—д) с помощью пенициллинацилазы описано в разделе «Экспериментальная часть». Выход, данные элементного анализа, $[\alpha]_D$ и т. пл. приведены в табл. 2.

Таким образом, нами предложен эффективный и универсальный метод биокаталитического получения гомохиральных фторзамещенных фенилаланинов и фенилсеринов.

Экспериментальная часть

В работе использованы 2-, 3- и 4-фторфенилаланины производства Fluka (Швейцария), остальные реактивы — отечественного производства марки ч.д.а. Трео-β-(4-фторфенил)серин синтезирован по методу [14], а пентафторфенилаланин — по методу [15]. Концентрация препарата пенициллинацилазы из *E. coli* ($3 \cdot 10^{-6}$ M) определена титрованием активных центров фермента фенилметилсульфонилфторидом [16].

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

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

За протеканием ферментативного гидролиза (*S*)-(IIa—д) следили по образованию свободных аминокислот, которые количественно определяли с помощью о-фталевого альдегида [17].

Ацилирование (+)-аминокислот (Ia—д) проводили следующим образом: к раствору 5 ммоль соответствующей аминокислоты и 15 ммоль NaHCO_3

в 20 мл воды, охлажденному до $-5 \pm -10^\circ \text{C}$, при перемешивании прибавляли по каплям раствор 10 ммоль хлорангидрида (III) в 10 мл ацетона. После прибавления всего хлорангидрида (III) смесь перемешивали 2 ч при $-5 \pm -10^\circ \text{C}$ и еще 1 ч при $20-25^\circ \text{C}$, фильтровали, промывали эфиром (3×50 мл) и подкисляли 2 н. HCl до pH 2—3. Выпавший осадок экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенные этилацетатные вытяжки сушили над MgSO_4 , упаривали в вакууме при 15 мм рт. ст. и $70-80^\circ \text{C}$. Остаток кристаллизовали из толуола.

Препаративное получение L-энантиомеров (Ia—d) с помощью пенициллин-ацилазы проводили следующим образом: к 0,2 М раствору рацемата (IIa—d) при pH 7,6—7,7 прибавляли препарат пенициллинацилазы, создавая в реакционной среде концентрацию фермента $(3-5) \cdot 10^{-9}$ М. После окончания гидролиза L-изомеров (IIa—d) реакционную смесь подкисляли соляной кислотой до pH 2—3. Выпавший осадок экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Водный слой упаривали в вакууме при 15 мм рт. ст. и $40-60^\circ \text{C}$, остаток растворяли в дистиллированной воде, аминокислоту выделяли на дауксе-50 (H^+ -форма). Аминокислоту вымывали 8% раствором аммиака, элюат упаривали в вакууме при 15 мм рт. ст. и $50-60^\circ \text{C}$, остаток перекристаллизовывали из смеси вода — этанол (1 : 1). Выход, т. пл. и $[\alpha]_D$ для S-аминокислот (Ia—d) приведены в табл. 2.

Объединенные этилацетатные вытяжки (смесь (R)-изомеров (IIa—d) и фенилуксусной кислоты) сушили над MgSO_4 и упаривали. К остатку прибавляли 50 мл 6 н. HCl и нагревали 7 ч при $70-80^\circ \text{C}$. Реакционную смесь промывали эфиром (3×50 мл). Из эфирных вытяжек регенерировали фенилуксусную кислоту. Водный слой упаривали, (R)-аминокислоты выделяли как описано выше для (S)-энантиомеров. Выход, $[\alpha]_D$ и т. пл. R-(IIa—d) приведены в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кухарь В. П., Соломонок В. А., Швадас В. К., Котик Н. В., Галаев И. Ю., Кириленко А. Г., Козлова Е. В. // *Биоорганич. химия*. 1993. Т. 19. № 4. С. 474—477.
2. Вейганд Ф., Отмайер А. // *Успехи химии*. 1970. Т. 39. № 4. С. 622—645.
3. Filler R., Kobayashi Y. // *Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry*. Tokyo: Kodansha LTD, 1982. P. 93—123.
4. Imperiali B. // *Adv. Biotechnol. Processes*. 1988. V. 10. P. 97—129.
5. Tanaka H., Uchida K., Yamabe M. // *J. Fluor. Chem.* 1987. Ч. 35. № 1. P. 253.
6. Соединения фтора. Синтез и применение / Ред. Исикава Н. М.: Мир, 1990. С. 306—335.
7. Соломонок В. А., Белоконов Ю. Н., Кухарь В. П., Черноглазова Н. И., Сапоровская М. Б., Бахмутов В. И., Кольчева М. Т., Беликов В. М. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1990. № 8. С. 1630—1636.
8. Bosshard H. R., Berger A. // *Helv. chim. acta*. 1973. V. 56. № 6. P. 1838—1845.
9. Bennett E. L., Niemann C. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1950. V. 72. № 4. P. 1800—1803.
10. Tong J. H., Pettitler C., D'Iorio A. D., Benoiton N. L. // *Can. J. Biochem.* 1971. V. 49. № 8. P. 877—881.
11. Fauchere J.-L., Schwyzer R. // *Helv. chim. acta*. 1973. V. 54. № 7. P. 2078—2080.
12. Соломонок В. А., Кухарь В. П., Галушко С. В., Кольчева М. Т., Роженок А. Б., Белоконов Ю. Н. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1991. № 5. С. 1166—1175.
13. Fizzi R., Seebach D. // *Tetrahedron*. 1988. V. 44. № 17. P. 5277—5293.
14. Edmonds E. J., Volkmann C. M., Beerstecher E. J. // *Zbl.* 1957. № 20. S. 5315.
15. Шишкин Г. В., Нанаев В. П. // *Журн. общ. химии*. 1966. Т. 36. № 4. С. 660—664.
16. Швадас В. К., Марголин А. Я., Шерстюк С. Ф., Клесов А. А., Березин И. В. // *Биоорганич. химия*. 1977. Т. 3. № 4. С. 546—553.
17. 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. ЧИ. 1992

V. A. Soloshonok, V. K. Švedas*, V. P. Kukhar, I. Yu. Galaev*,
E. V. Kozlova*, N. Yu. Svistunova

**HOMOCHIRAL ORGANOELEMENT ANALOGUES OF NATURAL
COMPOUNDS.**

**III. BIOCATALYTIC METHOD FOR PRODUCTION OF
FLUOROSUBSTITUTED (R)- AND (S)-PHENYLALANINES,
(S, R)- and (R, S)-PHENYLSERINES**

*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 for production of homochiral threo- β -(4-fluorophenyl)serine, 2-fluoro-, 3-fluoro-, 4-fluoro- and 2, 3, 4, 5, 6-pentafluorophenylalanines was developed by means of the enantioselective hydrolysis of their N-phenylacetyl derivatives with penicillin acylase (EC 3.5.1.11) from *Escherichia coli*.