

УДК 577.151.7, 608.2

Эффективное и стереоселективное ацилирование 1-фенилэтиламина в водной среде без активации ацильного донора, катализируемое пенициллинацилазой

Д.Ф. Гуранда, Г.А. Ушаков, В.К. Швядас*

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, 1, стр. 73

*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

РЕФЕРАТ До недавнего времени биокаталитические методы получения энантиомеров первичных аминов были основаны исключительно на стереоселективном ацильном переносе в органической среде при использовании активированных ацильных доноров. На примере реакции конденсации фенилуксусной кислоты и рацемата α -фенилэтиламина, катализируемой пенициллинацилазой, впервые показана возможность проведения эффективного и энантиоселективного ферментативного ацилирования амина в водной среде без использования активированных ацильных доноров. Прямая конденсация кислоты и амина протекает в мягких условиях с высокой начальной скоростью (3.3 ммоль/(л·ч)), степенью конверсии (80 % по активному энантиомеру амина) и энантиоселективностью (энантиомерный избыток продукта более 95 %). Описанный подход лишен недостатков реакций в безводных средах и представляет практическую ценность для биокаталитического получения энантиомерно чистых соединений в мягких условиях из доступных реагентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА стереоселективное ферментативное ацилирование в водной среде, прямая конденсация, энантиомерно чистые соединения, пенициллинацилаза.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря таким уникальным каталитическим свойствам ферментов, как хемо-, регио- и стереоспецифичность, биокаталитические процессы приобретают существенные преимущества по сравнению с процессами традиционного органического синтеза. Особенно ярко достоинства ферментных технологий проявляются при получении полифункциональных и энантиомерно чистых соединений. Главным образом с внедрением биокаталитических технологий эксперты связывают дальнейшее развитие мирового рынка энантиомерно чистых соединений [1], среднегодовой прирост которого в последнее десятилетие составил более 13 % [2]. Особый интерес представляют методы получения энантиомерно чистых аминов, являющихся важными хиральными синтонами для фармацевтической промышленности и агрохимии [3].

На данный момент большинство биокаталитических промышленных процессов основано на реакциях гидролиза амидов и сложных эфиров, хотя реакции синтеза зачастую представляют больший практический интерес [4]. Сложившаяся ситуация обусловлена тем, что в водной среде, наиболее благоприятной для масштабных биокаталитических процессов, равновесие реакции смещено в сторону гидролиза. Для смещения равновесия в сторону образования амидной и эфирной связи в литературе были предложены

подходы, связанные с проведением реакций в среде органических растворителей [5]. Долгое время ферментативные превращения в органических средах казались наиболее перспективными для проведения реакций синтеза [6–9]. По этой причине основное внимание было направлено на использование ферментов, стабильных в органических растворителях. Вплоть до недавнего времени возможность ферментативного ацилирования аминов была показана лишь в безводных органических средах при использовании липаз как катализаторов ацильного переноса на амины от активированных ацильных доноров [10–12]. Хотя применение липаз можно считать весьма успешным, использование биокатализа в безводных средах осложнено рядом обстоятельств, среди которых следует отметить низкую активность ферментов [13], а также необходимость в сокращении использования экологически опасных органических растворителей, которые вносят основной вклад в образование отходов фармацевтической промышленности [14].

Критический анализ исследований в области стереоселективных биокаталитических трансформаций свидетельствует о том, что при надлежащей оптимизации ферментативные реакции синтеза с использованием воды в качестве растворителя могут быть значительно эффективнее, чем представлялось ранее. Одним из показательных примеров является высокоэффективное и стереоселективное ацили-

рование аминов методом активированного ацильного переноса, катализируемого пенициллинацилазой в 100 %-ной водной среде [15]. Этот пример стал возможным благодаря уникальным каталитическим свойствам фермента пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* [16], а именно его высокой каталитической активности и стабильности в щелочной среде (рН около 10), представляющей собой оптимальные условия ацилирования высокоосновных аминов.

В данном сообщении представлены первые результаты по эффективному и стереоселективному ферментативному ацилированию аминов в водной среде методом прямой конденсации амина и карбоновой кислоты, используемой в качестве ацильного донора. Практический интерес к разработке эффективного метода разделения энантиомеров α -фенилэтиламина обусловлен их использованием в качестве вспомогательных хиральных реагентов при получении энантиомеров различных классов химических соединений [17, 18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали фенилацетилхлорид (Sigma, США); фенилуксусную кислоту (Aldrich Chemie, ФРГ); (*R*)- и (*S*)- α -фенилэтиламин (Fluka, Швейцария); фенилметилсульфонилфторид, додецилсульфат натрия (Merck, ФРГ); ацетонитрил («Криохром», Россия); *N*-фенилацетильные производные α -фенилэтиламина синтезированы, как описано ранее [15]; препарат ПА из *Alcaligenes faecalis* был предоставлен компанией ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (Россия). Концентрацию активных центров пенициллинацилазы определяли согласно [16].

ВЭЖХ анализ. Концентрацию компонентов реакционной смеси, а также энантиомерную чистоту продукта синтеза, *N*-фенилацетил-(*R*)- α -фенилэтиламина, определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при использовании хроматографической системы Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer, США), как описано ранее [15].

Ферментативную реакцию прямой конденсации фенилуксусной кислоты и (\pm)- α -фенилэтиламина проводили из эквимолярной смеси реагентов (0.2 М) при перемешивании в термостатируемой ячейке рН-стата (Titrimo 718, Metrohm, Швейцария) при рН 7.5, 15 °С; концентрация пенициллинацилазы составляла 12 мкМ. Продукт синтеза, *N*-фенилацетил-(*R*)-фенилэтиламин, выпадал в осадок по ходу реакции. Аликвоты (50 μ l) гетерогенной реакционной среды добавляли к 1.95 мл подвижной фазы для полного растворения компонентов, а также остановки реакции и после разбавления элюентом подвергали традиционному и хиральному ВЭЖХ анализу. Ферментативную реакцию проводили до достижения равновесия, пока концентрации компонентов в системе не достигали практически постоянных значений. Затем реакционную смесь отфильтровывали через стеклянный фильтр, продукт синтеза промывали водой, перекристаллизовывали из водного этанола и высушивали в эксикаторе над хлоридом кальция. Выход 0.145 г, (38 %); е.е. 95 %; температура плавления 117–118 °С; ¹H ЯМР (250 МГц, CDCl₃): 1.29 (д, 3H, CH₃), 3.47 (с, 2H, CH₂), 5.01 (м, 1H, CH), 5.49 (д, 1H, NH), 7.04–7.29 (м, 10H, Ph). MS *m/z*: 239 (M), 120 (PhCH₂CH(NH)CH₃), 105 (PhCCH₃), 91 (PhCH₂), 77 (Ph), 65.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стереоселективное ацилирование является важнейшей стадией разделения рацематов аминов, и применение ферментов как катализаторов этого процесса представляется весьма перспективным. Следует отметить, однако, что первичные амины являются высокоосновными соединениями, и условия их эффективного ацилирования могут быть достигнуты лишь в щелочной водной среде (рН около 10) или в безводной органической среде, где большинство ферментов малоактивны и нестабильны. Наряду с этим при проведении ферментативных реакций в органических растворителях приходится использовать активированные ацильные доноры, которые способны спонтанно и нестереоизбирательно ацилировать реакционноспособные аминогруппы, что снижает энантиомерную чистоту продукта [3, 9]. Вышеперечисленные недостатки, как нам представляется, можно обойти при проведении ферментативных реакций ацилирования аминов в водной среде методом прямой конденсации карбоновой кислоты и амина. В данном случае благоприятные с термодинамической точки зрения условия протекания конденсации достигаются практически в нейтральной реакционной среде (при рН 6–8), где большинство ферментов являются высокоактивными и стабильными. В этих условиях оба исходных субстрата хорошо растворимы и стабильны, что позволяет создать высококонцентрированные растворы компонентов и обеспечить выгодные термодинамические условия для ферментативного ацилирования амина. Движущей силой реакции, обеспечивающей высокую производительность процесса, является смещение равновесия в сторону синтеза за счет выпадения в осадок малорастворимого в воде целевого продукта. Следует отметить, что при проведении прямой конденсации не требуется активация ацильного донора, что упрощает и удешевляет процесс ферментативного ацилирования амина. Широкая субстратная специфичность и стереоселективность пенициллинацилаз по отношению к *N*-ацилированным производным аминокислот [16, 19, 20] дает надежду на то, что ферментативное ацилирование аминов методом прямой конденсации с использованием ферментов этого семейства может быть эффективным.

Действительно, уже первые опыты показали, что конденсация фенилуксусной кислоты и рацемата α -фенилэтиламина, катализируемая пенициллинацилазой в водной среде, протекает весьма эффективно, начальная скорость составляет 3.3 ммоль/(л·ч). Буквально через несколько минут после начала реакции целевой продукт синтеза (*N*-фенилацетил-(*R*)-фенилэтиламин) начинает выпадать в осадок. Синтез протекает достаточно быстро вплоть до достижения степени превращения 30–35 % от исходных концентраций реагентов (рис. 1, А). Затем реакция конденсации замедляется, что, по-видимому, обусловлено достижением состояния термодинамического равновесия. Об этом свидетельствует контрольный эксперимент, показавший, что к этому моменту инактивации фермента не наблюдается и пенициллинацилаза практически полностью сохраняет свою каталитическую активность.

Анализ энантиомерной чистоты целевого продукта на разных степенях конверсии показал (рис. 1, Б) высокую стереоселективность ацилирования. Энантиомерный избыток целевого продукта составил 98 и 96 % при степени конверсии 30 и 40 %, соответственно. По завершении реак-

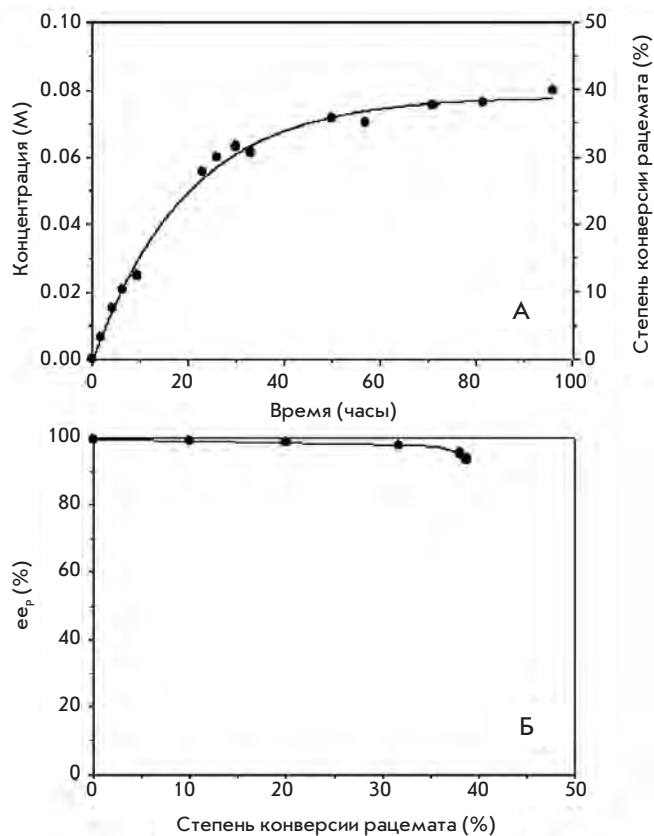


Рис. 1. Синтез энантимерно чистого N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламина методом стереоселективной прямой конденсации фенилуксусной кислоты и рацемата (\pm)- α -фенилэтиламина в водной среде, катализируемой пенициллинацилазой из *Alcaligenes faecalis*: (A) – интегральная кинетика образования продукта синтеза, (B) – энантимерный избыток целевого продукта при разных степенях конверсии. Условия описаны в экспериментальной части

ции целевой продукт, N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламин, в виде осадка легко выделяется из реакционной смеси. Выход N-фенилацетил-(R)-фенилэтиламина по активному энантиомеру амина составил 80 %, энантимерный избыток был равен 95 %.

Описанный метод ацилирования амина лишен недостатков ферментативных реакций, проводимых в среде органических растворителей, и представляет практическую ценность для биокаталитического получения энантимерно чистых соединений в мягких условиях из доступных реагентов. Для выяснения перспектив препаративного использования данного метода необходимо его сравнение с методом ферментативного ацилирования аминов в водной среде с использованием активированных ацильных доноров, предложенных ранее [15]. Каждый подход имеет свои сильные и слабые стороны. При использовании активированных ацильных доноров достигается высокая скорость и глубина ацилирования, а также энантиомерная чистота целевого продукта. Однако при этом необходимо использовать более дорогостоящие ацильные доноры и проводить процесс в щелочной среде, где фермент является менее стабильным. Принципиальным достоинством метода прямой конденсации является возможность использования дешевых ацильных

доноров и проведения реакции в более мягких условиях, где большинство ферментов, в т.ч. и все представители семейства пенициллинацилаз, являются более активными и стабильными. Эти аргументы могут стать решающими в пользу применения метода прямой конденсации при препаративном разделении рацематов широкого круга аминов.

Представленные результаты являются лишь первым наблюдением, и условия проведения ферментативного ацилирования аминов путем прямой конденсации нуждаются в оптимизации. Можно ожидать, что стереоселективное ацилирование аминокислот методом прямой конденсации станет важной составной частью интегрального биокаталитического метода получения энантиомеров аминокислот [21]. В дальнейшем предполагается детально исследовать влияние различных факторов на положение равновесия, а также кинетические закономерности реакций стереоселективного ацилирования различных аминов методом прямой конденсации, катализируемого пенициллинацилазой в водной среде.

ВЫВОДЫ

Впервые показана возможность проведения эффективного и энантиоселективного ферментативного ацилирования первичных аминов в водной среде без использования активированных ацильных доноров. Прямая конденсация под действием пенициллинацилазы протекает эффективно, целевой продукт высокой энантиомерной чистоты легко выделяется из реакционной смеси с хорошим выходом. Разработанный подход может быть использован для препаративного биокаталитического получения энантимерно чистых аминов в мягких условиях при использовании доступных субстратов и биокатализатора. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 07-08-00696).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moorecroft M. Biocatalysis shines for chiral manufacture. Frost & Sullivan Market Insight. 2003; <http://chemicals.frost.com/prod/servlet/market-insight-top.pag?docid=4056760&ctxLink=FcmCtx7&ctxLabel=FcmCtx8>
- Understanding chiral technologies. Pharma-reports. 2008; http://www.reportbuyer.com/pharma_healthcare/research_r_d/understanding_chiral_technologies.html
- Van Rantwijk F, Sheldon R.A. // Tetrahedron. 2004. V. 60. P. 501–519.
- Methods in Biotechnology. Walker J.M., Series Editor. 15. Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols, edited by Vulfson E.N., Halling P.J. and Holland H.L., Humana Press Inc. 2001. 679 p.
- Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., Hydrolases in Organic Synthesis. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006.
- Klibanov A.M. // Nature. 2001. V. 409. P. 241–246.
- Lee M.-Y., Dordick J.S. // Current Opinion Biotechnol. 2002. 13. P. 376–384.
- Carrea G., Riva S. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2000. 39(13). P. 2226–2254.
- Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. // Nature. 2001. V. 409. P. 258–268.
- Jaeger K.-E., Liebeton K., Zonta A., Schimossek K., Reetz M.T. // Appl. Microb. Technol. 1996. V. 46. P. 99–105.
- Takayama S., Lee S.T., Hung S.C., Wong C.H. // Chem. Commun. 1999. P. 127–128.
- Iglesias L.E., Rebollo F., Gotor V. // Tetrahedron: Asymmetry. 2000. V. 11. P. 1047–1050.
- Klibanov A.M. // Trends Biotechnol. 1997. V. 15. P. 97–101.
- Carey J.S., Laffan D., Thomson C., Williams M.T. // Org. Biomol. Chem. 2006. V. 4. P. 2337–2347.
- Guranda D.T., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. V. 12. P. 1645–1650.
- Švedas V., Guranda D., Van Langen L., Van Rantwijk F., Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. V. 417. № 3. P. 414–418.
- Juaristi E., Escalante J., Leon-Romo J.L. and Reyes A. // Tetrahedron: Asymmetry. 1998. V. 9. P. 715–740.
- Juaristi E., Leon-Romo J.L., Reyes A. and Escalante J. // Tetrahedron: Asymmetry. 1999. V. 10. P. 2441–2495.
- Švedas V.K., Savchenko M.V., Beltser A.I., Guranda D.F. // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1996. V. 799. P. 659–669.
- Galunsky B., Lummer K., Kasche V. // Monatsh. Chem. 2000. V. 131. P. 623–632.
- Guranda D.T., Khimiuk A.I., Van Langen L.M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., Švedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2004. V. 15. P. 2901–2906.