

УДК 547.26+547.022+577.31

ЕНЗИМАТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ 2-ЦИКЛОАЛКІЛЕТАНОЛІВ

О.В.Кучер, А.О.Колодяжна, О.Б.Смолий

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
02660, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: smolii@bpci.kiev.ua**Ключові слова:** 2-циклоалкілетанол; ензиматичний катализ; енантіоселективність; *Burkholderia Cepacia Lipase*; *Candida Antarctica Lipase B*

Кінетичне ензиматичне розділення є зручним сучасним методом отримання оптично чистих сполук. Нами було досліджено поведінку 2-циклопропіл- та 2-циклобутилметилкарбінолів в умовах реакції біокаталітичного ацилювання. Здійснено порівняльний аналіз ефективності ензимів *Burkholderia Cepacia Lipase (BCL)* та *Candida Antarctica Lipase B (CAL-B)* при ацилюванні в присутності вінілацетату та гідролізі з буферним розчином. Контроль перебігу реакцій здійснювався шляхом аналізу $^1\text{H-NMR}$ спектри реакційної суміші. Встановлено, що при конверсії, яка становить 50%, селективність ацилювання обох 2-циклоалкілетанолів у присутності ензиму BCL є невисокою і зростає при збільшенні циклу, що є наслідком незначної різниці в розмірі алкільних замісників біля хірального атома Карбону. За допомогою біокаталізу нами були отримані (2-циклопропіл)- та 2-циклобутилетаноли в оптично чистому (ee \geq 95%) вигляді. Шляхом порівняння отриманих даних з літературними встановлено, що реакції ацилювання та деацилювання перебігають згідно з правилом Казлаускаса, яке постулює ацилювання переважно (R)-енантіомера спирту і, відповідно, деацилювання (R)-ацетату. Для вивчення перспектив застосування отриманих сполук безпосередньо як білдіне-блоків було здійснено енантіоселективний синтез (2-циклобутил)етиламінів (S)- та (R)-конфігурацій з використанням реакції Міцунобу з азидоводневою кислотою на ключовій стадії. Оптичну чистоту отриманих сполук було визначено шляхом аналізу спектри $^{19}\text{F-NMR}$ їх похідних, утворених у результаті взаємодії з хлорангідридом кислоти Мошера.

ENZYMATIC RESOLUTION OF 2-CYCLOALKYLETHANOLS

O.V.Kucher, A.O.Kolodiazhna, O.B.Smolii

Key words: 2-cycloalkylethanol; enzymatic catalysis; enantioselectivity; *Burkholderia Cepacia Lipase*; *Candida Antarctica Lipase B*

Kinetic enzymatic resolution is a convenient modern method for obtaining optically pure compounds. The behaviour of 2-cyclopropyl- and 2-cyclobutyl methylcarbinols under conditions of the biocatalytic acylation reaction has been investigated. The comparative analysis of efficiency of enzymes of *Burkholderia Cepacia Lipase (BCL)* and *Candida Antarctica Lipase B (CAL-B)* in the reactions of acylation in the presence of vinyl acetate and hydrolysis in the buffer solution has been carried out. The progress of the reaction was monitored by $^1\text{H-NMR}$. It has been found that in 50% conversion the selectivity of enzymatic acylation of both 2-cycloalkylethanol in the presence of BCL is low and increases with increasing the cycle ring due to the small difference in size between alkyl substituents at the chiral carbon atom. By using biocatalysis (2-cyclopropyl) – and 2-cyclobutylethanol in an optically pure (ee \geq 95%) form have been synthesized. The comparison of the results obtained with the literature data shows that reactions of enzymatic acylation and deacylation proceed in accordance with Kazlauskas rule stating the predominant acylation of (R)-enantiomer and deacylation of (R)-acetate. To study the possibilities of application of the compounds obtained as building blocks the enantioselective synthesis of both enantiomers of (2-cyclobutyl)ethylamine has been conducted using Mitsunobu reaction with hydrazoic acid at the key stage. The optical purity of the compounds studied has been determined by analyzing the $^{19}\text{F-NMR}$ spectra of their derivatives obtained as a result of interaction with Mosher's acid chloride.

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ 2-ЦИКЛОАЛКИЛЭТАНОЛОВ

А.В.Кучер, А.О.Колодяжная, О.Б.Смолий

Ключевые слова: 2-циклоалкилэтанол; энзиматический катализ; энантиоселективность; *Burkholderia Cepacia Lipase*; *Candida Antarctica Lipase B*

Кинетическое энзиматическое разделение является удобным современным методом получения оптически чистых соединений. Нами было исследовано поведение 2-циклопропил- и 2-циклобутилметилкарбинолов в условиях реакции биокаталитического ацилирования. Осуществлён сравнительный анализ эффективности энзимов *Burkholderia Cepacia Lipase (BCL)* и *Candida Antarctica Lipase B (CAL-B)* в ацилировании в присутствии винилацетата и гидролизе с буферным раствором. Контроль протекания реакции проводился путём анализа $^1\text{H-NMR}$ спектров реакционной смеси. Установлено, что при конверсии в 50% селективность ацилирования обоих 2-циклоалкилэтанолов в присутствии энзима BCL невысока и возрастает при увеличении цикла, что является следствием незначительной разницы в размерах алкильных заместителей возле хирального атома углерода. С помощью биокаталіза нами были получены (2-циклопропил)- и 2-циклобутилэтанолы в оптически чистом (ee \geq 95%) виде. Путём сравнения полученных результатов с литературными данными установлено, что реакции ацилирования и деацилирования проходят в соответствии с правилом Казлаускаса, постулирующим преимущественное ацилирование (R)-энантиомера и, соответственно, деацилирование (R)-ацетата. Для изучения перспектив применения полученных соединений непосредственно в качестве билдинг-блоков был осуществлён энантиоселективный синтез (2-циклобутил)этиламина (S)- и (R)-конфігурацій с использованием реакции Мицунобу с азидоводородной кислотой на ключевой стадии. Определение оптической чистоты полученных соединений осуществляли путём анализа спектров $^{19}\text{F-NMR}$ их производных, полученных в результате взаимодействия с хлорангідридом кислоты Мошера.

Специфічні властивості циклопропанового та циклобутанового фрагментів тривалий час є предметом як хімічних, так і біологічних досліджень. Відомо, що сполуки, які містять фрагменти малих циклів, проявляють різнопланову біологічну активність. Так, циклопропільний замісник входить до складу природних та синтетичних піретроїдів [1], антибіотиків хінолінового ряду [2] та інгібіторів гістондеметилази KDM1A [3], фізіологічна активність яких визначається абсолютною конфігурацією хірального атома Карбону в циклічному фрагменті. У піретроїдів, зокрема, в цефлутрину (*R*)-ізомер в сотні разів активніший за (*S*)-ізомер.

В останні роки значну увагу привертають сполуки, в структурі яких циклоалкільний фрагмент знаходиться безпосередньо біля хірального центру. Даний інтерес пов'язаний з широким спектром біологічних властивостей таких речовин. Так, описаний фрагмент зустрічається в молекулах селективних інгібіторів JAK-2- та JAK-3-тирозинкіназ [4, 5] (сполуки **A** та **B**), антагоністів рецепторів CRF-1 [6] (сполука **C**), агоністів опіоїдних рецепторів [7] (сполука **D**), структура яких показана на рис. 1.

2-Циклоалкілетаноли – найпростіші представники ряду сполук з циклоалкільним фрагментом поруч з асиметричним атомом Карбону. Вони є синтетичними еквівалентами для хірального синтону (рис. 2), присутність якого в молекулі зумовлює біологічну активність широкого кола речовин, включно з вищезгаданими. Саме ця обставина є переконливим аргументом на користь необхідності розробки синтезу оптично активних циклоалкілметилкарбінолів.

На сьогоднішній день описано лише один приклад енантіоселективного синтезу 2-циклобутиллетанолу [8]. В свою чергу, відомі методи отримання 2-циклопропілетанолів можна умовно поділити на три групи: а) фізико-хімічні; б) хімічні та с) біохімічні. До першої групи належить метод

енантіомерного збагачення за рахунок кристалізації рацемічного спирту з оптично активним діолом TADDOL [9]. Основним підходом для синтезу 2-циклопропілетанолів є хімічне енантіоселективне відновлення/окиснення відповідних кетонів/спиртів у присутності хіральних каталізаторів [10-12]. Проте, незважаючи на значну кількість відповідної літератури, відомі лише одиничні випадки отримання бажаних сполук з *ee* > 90%. Останній відомий метод синтезу циклопропілметилкарбінолів – еніміатичне відновлення кетонів [13, 14]. Використання редуктаз дозволяє досягти *ee* > 95%. В той же час для обох останніх підходів характерний суттєвий недолік – їх застосування приводить до утворення лише одного з двох можливих енантіомерів. І якщо у випадку каталітичного відновлення для отримання іншого енантіомера синтезувати хіральний каталізатор протилежної оптичної конфігурації, принаймні, можливо, то у випадку ензиму це виключено.

Нами було розроблено зручний енантіоселективний метод розділення рацемічних 2-циклоалкілетанолів на оптичні антиподи з *ee* > 95% як для (*S*)-, так і для (*R*)-енантіомерів шляхом ацилювання спиртів у присутності ліпаз та еніміатичного гідролізу. Окрім цього, даний підхід дозволяє отримувати необхідні сполуки в мультиграмових кількостях, що різко відрізняє його від описаних у літературі і переводить до класу препаративних.

Основою для отримання оптично активних 2-циклоалкілкарбінолів є реакція еніміатичного ацилювання комерційно доступного рацемічного спирту вінілацетатом у присутності ліпази.

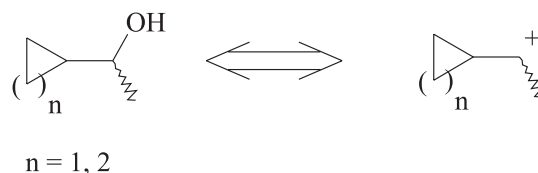


Рис. 2. Синтетичний еквівалент та його синтон.

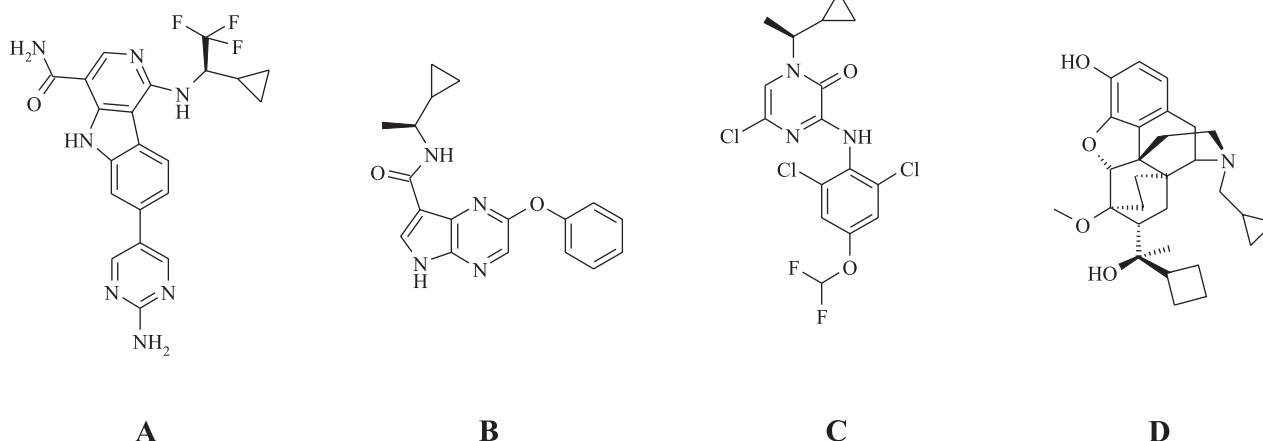
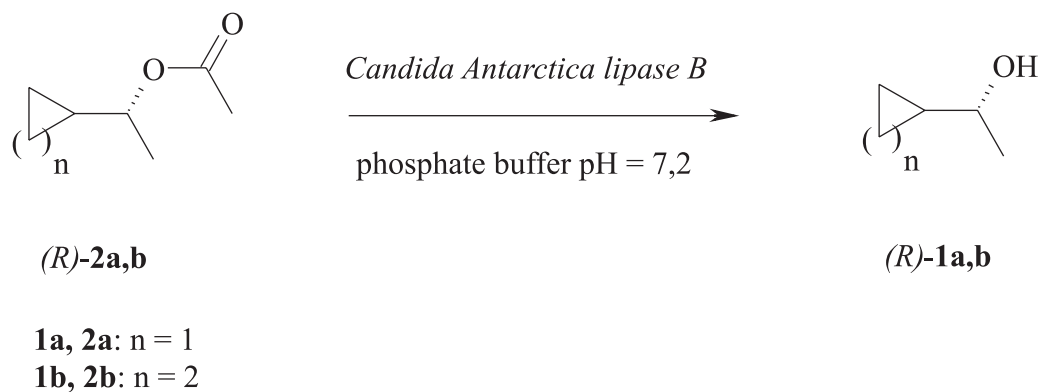


Рис. 1. Приклади біологічно активних речовин, що містять циклоалкановий фрагмент.

Схема 2. Ензиматичний гідроліз енантімерно збагачених ацетатів **2a, b** в присутності *Candida Antarctica lipase B*.

Таблиця 2

Характеристики ензиматичного гідролізу енантімерно збагачених ацетатів **2a, b**
в присутності *Candida Antarctica lipase B*

Речовина	t, °C	Розчинник	Час, год	Співвідношення: ліпаза, г; речовина, г	Конверсія, %	Вихід (R)-спирту, %	еє, %
2a	25	Et ₂ O/H ₂ O	16	1/10	50	8,0	95
2b	25	Et ₂ O/H ₂ O	42*	1/7	83	36,5	95

* – через 20 годин рН з 4,6 доводили до 7,2 шляхом додавання розчину КОН.

ти (*S*)-**1a** і (*S*)-**1b** було отримано з еє 96% та 95% відповідно (рис. 3).

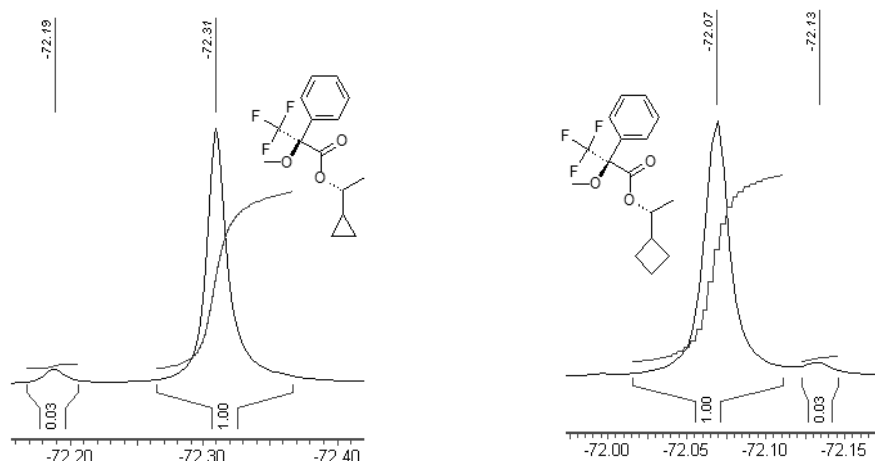
Для отримання оптично активних спиртів (*R*)-конфігурації енантімерно збагачені ацетати (*R*)-**2a-b** вводили в реакцію ензиматичного гідролізу. Експериментальним шляхом було знайдено, що за 16 годин гідроліз (*R*)-**2a** в присутності CAL-B проходить на 50%, в той час як з трикратним надлишком ліпази BCL конверсія за добу становить всього 4%. В подальшому CAL-B було використано для отримання також (*R*)-**2b** (схема 2).

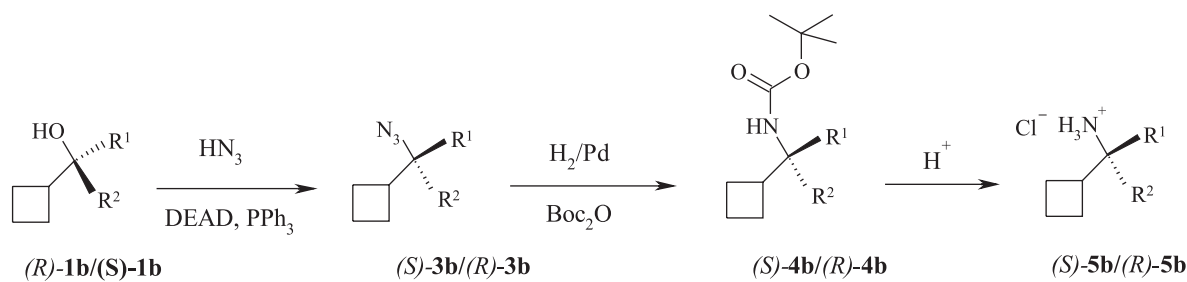
При гідролізі ацетатів для підвищення виходу спиртів конверсія доводилася до значення, близького до теоретичного вмісту бажаного енантіомера в збагаченій суміші. Саме тому при гідролізі (*R*)-**2b** через 20 годин (конверсія 67%) гідроліз було продовжено (табл. 2). Висока селективність

процесу гідролізу дозволила отримати оптично активні спирти з еє = 95% (рис. 4).

Введення в молекулу хірального синтону – синтетичного еквіваленту циклоалкілкарбінолу (рис. 2) передбачає інверсію хірального атома Карбону і обернення конфігурації, що майже завжди супроводжується частковою рацемізацією. Саме тому енантіомерна чистота вихідного спирту є визначальним параметром при плануванні даного перетворення. Для оцінки енантіоселективності нами було проведено синтез оптично активних (2-циклобутил)етиламінів з використанням на ключовій стадії реакції Міцунобу як зручного синтетичного методу [19] (схема 3).

Аналіз ¹⁹F-ЯМР спектрів амідів, утворених внаслідок взаємодії гідрохлоридів оптично активних амінів з хлорангідридом кислоти Мошера, пока-

Рис. 4. ¹⁹F-Спектри похідних (*R*)-**1a** та (*R*)-**1b** з (*S*)-(+)-МТРА-Сl.



$(R)\text{-1b-5b}$: $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{H}$

$(S)\text{-1b-5b}$: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$

Схема 3. Енантіоселективна трансформація оптично активних 2-(циклобутил)етанолів в аміни з оберненням конфігурації на прикладі $(R)\text{-1b}$.

зав відсутність помітної рацемізації в даному перетворенні.

Таким чином, на прикладі оптично активних спиртів $(S)\text{-1b}$ і $(R)\text{-1b}$ було продемонстровано перспективи енантіоселективної модифікації хірального замісника, що містить циклоалкановий фрагмент, а також запропоновано альтернативний описаному метод синтезу енантімерно чистих (S) - та (R) -(2-циклобутил)етиламінів [20].

Експериментальна частина

^1H -ЯМР спектри були записані на спектрометрі Bruker Avance DRX 500 (при 500 МГц), ^{19}F -ЯМР спектри – на Varian UNITY Plus 400 (при 376 МГц). Значення кута оптичного обертання були отримані на поляриметри JASCO J-20 з 50-мм кюветою при 20°C та 589 нм (D-лінія Натрію). Хімічна чистота отриманих енантіомерів визначалася шляхом порівняння їх ^1H -ЯМР спектрів з характеристиками, наведеними в літературі для рацематів або оптично активних сполук. Дериватизація за участі (S) -(+)-МТРА-Cl здійснювалася згідно з описаною процедурою [21, 22]. Значення енантіомерних надлишків визначалися на основі аналізу ^{19}F -спектрів похідних кислоти Мошера. Абсолютні конфігурації отриманих спиртів були співставлені з літературними даними і підтверджують правило Казлаускаса.

(S) -(2-циклопропіл)етанол $(S)\text{-1a}$. До розчину рацемічного спирту [23] (140 г, 1,63 Моль) в діетиловому етері (1 л) додають вінілацетат (450 мл, 3 екв.) та BCL (16,5 г, 1/8 від маси рацемату). Суміш перемішують у термостаті при 25°C впродовж 15 год. Після цього реакційну масу фільтрують, упарюють при атмосферному тиску і хроматографують на колонці (система – $\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Вихід – 13,6 г (11,0%, теоретично – 50%). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +17.0$ (с 3.22, CHCl_3) для 96% *ee* {літ.: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -7.55$ (CHCl_3) для (R) -енантіомера з *ee* = 44%} [9].

(S) -(2-циклобутил)етанол $(S)\text{-1b}$. До розчину рацемічного спирту [24] (78 г, 0,78 Моль) в діети-

ловому етері (700 мл) додають вінілацетат (212 мл, 3 екв.) та BCL (7,8 г, 1/10 від маси рацемату). Суміш перемішують в термостаті при 25°C впродовж 22 год. Після цього реакційну масу фільтрують, упарюють при атмосферному тиску і хроматографують на колонці (система – дихлорометан:гексан). Вихід – 24,4 г (31,3%, теоретично – 50%). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = +27.0$ (с 6.45, CHCl_3) для 95% *ee*.

(R) -(2-циклопропіл)етанол $(R)\text{-1a}$. До розчину енантімерно збагаченого ацетату $(R)\text{-2a}$ (42,2 г, 0,33 Моль) в діетиловому етері (330 мл) додають буферний розчин KH_2PO_4 (рН = 7,2, 330 мл) та CAL-B (4,2 г, 1/10 від маси ацетату). Суміш перемішують в термостаті при 25°C впродовж 16 год. Після цього реакційну масу фільтрують, водний шар екстрагують діетиловим етером (2 x 200 мл), органічну фазу сушать сульфатом натрію, упарюють при атмосферному тиску і хроматографують на колонці (система – $\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Вихід – 11 г (8%, теоретично – 50%). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -17.0$ (с 3.22, CHCl_3) для 95% *ee* {літ.: $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -7.55$ (CHCl_3) для (R) -енантіомера з *ee* = 44%} [9].

(R) -(2-циклобутил)етанол $(R)\text{-1b}$. До розчину енантімерно збагаченого ацетату $(R)\text{-2b}$ (63 г, 0,44 Моль) в діетиловому етері (650 мл) додають буферний розчин KH_2PO_4 (рН = 7,2, 650 мл) та CAL-B (9 г, 1/7 від маси ацетату). Суміш перемішують в термостаті при 25°C впродовж 20 год. Конверсія – 67%. Доводять рН до 7,2 шляхом додавання насиченого розчину КОН до суміші і перемішують далі. Після цього реакційну масу фільтрують, водний шар екстрагують діетиловим етером (2 x 200 мл), органічну фазу сушать сульфатом натрію, упарюють при атмосферному тиску і хроматографують на колонці (система – дихлорометан:гексан). Вихід – 28,5 г (36,5%, теоретично – 50%). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -27.1$ (с 6.45, CHCl_3) для 95% *ee*.

Загальна методика отримання хіральних амінів **5b**. До розчину спирту (26,67 г) та трифенілфосфіну (84 г, 1.2 екв.) в ТГФ (350 мл) при охолодженні до -5°C приливають розчин азидоводневої

кислоти в дихлорометані (15% розчин, 1,2 екв.), після чого прикапують DEAD (9,33 мл, 1,2 екв.). Суміш перемішують протягом ночі. Розчин упарюють при зниженому тиску, заливають гексаном (500 мл), утворений осад фільтрують і промивають гексаном (2 x 300 мл). Фільтрат упарюють, залишок хроматографують на колонці чистим гексаном. Сирий продукт розчиняють у метанолі (350 мл), додають Pd на вугіллі (5%-ий вміст Pd на каталізаторі, 5% мас.) та Вос-ангідрид (2 екв.), після чого при перемішуванні в розчин пропускають H_2 (контроль по 1H -ЯМР). Після проходження реакції розчин фільтрують, фільтрат упарюють, сирий продукт переганяють ($\sim 90^\circ C$ при 2 мм рт. ст.). Отриману суміш Вос-ангідриду та продукту розчиняють у метанолі (150 мл) і приливають до розчину HCl в метанолі, приготованого шляхом прикапування в метиловий спирт (400 мл) ацетилхлориду (42 мл). Перемішують впродовж ночі. Суміш упарюють і утворений гідрохлорид обробляють в ацетонітрилі [20].

Література

1. Naumann K. *Synthetic Pyrethroid Insecticides: Structure and Properties. Chemistry of Plant Protection. Heidelberg: Springer, 1990, Vol. 4, p.241.*
2. Liu H., Huang J., Wang J., Wang M., Liu M., Wang B., Guo H., Lu Y. *Eur. J. Med. Chem., 2014, Vol. 86, pp.628-638.*
3. Vianello P., Botrugno O. A., Cappa A., Ciossani G., Dessanti P., Mai A., Mattevi A., Meroni G., Minucci S., Thaler F., Tortorici M., Trifiró P., Valente S., Villa M., Varasi M., Mercurio C. *Eur. J. Med. Chem., 2014, Vol. 86, pp.352-363.*
4. Lim J., Taoka B., Otte R. D., Spencer K., Dinsmore C. J., Altman M. D., Chan G., Rosenstein C., Sharma S., Su H.-P., Szewczak A. A., Xu L., Yin H., Zugay-Murphy J., Marshall C. G., Young J. R. *J. Med. Chem., 2011, Vol. 54, pp.7334-7349.*
5. Jaime-Figueroa S., De Vicente J., Hermann J., Jahangir A., Jin S., Kuglstatler A., Lynch S. M., Menke J., Niu L., Patel V., Shao A. *Bioorg. Med. Chem. Lett., 2013, Vol. 23, pp.2522-2526.*
6. Li J., Smith D., Krishnananthan S., Hartz R. A., Dasgupta B., Ahuja V., Schmitz W. D., Bronson J. J., Mathur A., Barrish J. C., Chen B.-C. *Org. Process Res. Dev., 2012, Vol. 16, pp.156-159.*
7. Park H. S., Lee H. Y., Kim Y. H., Park J. K., Zvartau E. E., Lee H. *Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, Vol. 16, pp.3609-3613.*
8. Pat. WO 141761 (2010) // <http://patentscope.wipo.int>
9. Vinogradov M. G., Kurilov D. V., Chel'tsova G. V., Ferapontov V. A., Heise G. L. *Mendeleev Commun., 2003, Vol. 13, pp.124-125.*
10. Li W., Sun X., Zhou L., Hou G., Yu S., Zhang X. *J. Org. Chem., 2009, Vol. 74, pp.1397-1399.*
11. Eagon S., Kim J., Singaram B. *Synthesis, 2008, №23, pp.3874-3876.*
12. César V., Bellemin-Lapponnaz S., Wadepohl H., Gade L. H. *Chem. Eur. J., 2005, Vol. 11, pp.2862-2873.*
13. Bradshaw C. W., Hummel W., Wong C.-H. *J. Org. Chem., 1992, Vol. 57, pp.1532-1536.*
14. Matsuda T., Nakajima Y., Harada T., Nakamura K. *Tetrahedron: Asymmetry, 2002, Vol. 13, pp.971-974.*
15. Ghanem A., Aboul-Enein H. Y. *Tetrahedron: Asymmetry, 2004, Vol. 15, pp.3331-3351.*
16. Kucher O. V., Kolodyazhnaya A. O., Smolii O. B., Boiko A. I., Kubyshkin V. S., Mykhailiuk P. K., Tolmachev A. A. *Tetrahedron: Asymmetry, 2014, Vol. 25, pp.563-567.*
17. Kazlauskas R. J., Weissfloh A. N. E., Rappaport A. T., Cuccia L. A. *J. Org. Chem. 1991, Vol. 56, pp.2656-2665.*
18. Dale J. A., Mosher H. S. *J. Am. Chem. Soc., 1973, Vol. 95, pp.512-519.*
19. Mitsunobu O. *Synthesis, 2008, №1, pp.1-28.*
20. Pat. WO 100065 (2014) // <http://patentscope.wipo.int>
21. Pietta P. G. *J. Nat. Prod., 2000, Vol. 63, pp.1035-1042.*
22. Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M., *Am. J. Clin. Nutr., 2001, Vol. 74, pp.418-425.*
23. MacInnes J., Nonhebel D. C., Orszulik S. T., Suckling C. J., Wrigglesworth R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1983, Vol. 11, pp.2771-2776.*
24. Rieke R. D., Wehmeyer R. M., Wu T.-C., Ebert G. W. *Tetrahedron, 1989, Vol. 45, pp.443-454.*

Надійшла до редакції 27.11.2014 р.

(S)-(1-циклобутил)етиламін (S)-**5b**. Вихід – 8,1 г гідрохлориду (22,5%). $[\alpha]^{25}_D = +62.0$ (c 0.65, EtOH) для 94% ee.

(R)-(1-циклобутил)етиламін (R)-**5b**. Вихід – 8,9 г гідрохлориду (28,6%). $[\alpha]^{25}_D = -60.0$ (c 0.65, EtOH) для 94% ee.

Висновки

1. Застосування ензиматичного каталізу допомагає вирішити проблему отримання енантіомерно чистих 2-циклоалкілетанолів (ee = 95%), що містять малі цикли. Підібрані умови ацилювання/деацилювання (за участі ензимів *Burkholderia Cepacia Lipase* (BCL) та *Candida Antarctica Lipase B* (CAL-B) відповідно) дозволили отримати циклоалкілметилкарбіноли в мультиграмових кількостях.

2. Проведений енантіоселективний синтез оптично активного (2-циклобутил)етиламіну є перспективним у застосуванні спиртів як білдінг-блоків для введення циклоалкілвмісного хірального фрагменту.