Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

На правах рукописи

Юфряков Вячеслав Сергеевич

Химико-ферментативное получение физиологически активных соединений

1.4.3. Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории гомолитических реакций элементоорганических соединений федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова» Российской академии наук

Научный руководитель:

Кочетков Константин Александрович	доктор химических наук, профессор главный научный сотрудник, заведующий лабораторией гомолитических реакций элементоорганических соединений ИНЭОС РАН

Официальные оппоненты:

Хомутов Алексей Радиевич	доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений ИМБ РАН
Грачев Михаил Константинович	доктор химических наук, профессор руководитель кафедры органической химии МПГУ
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт нефтехимического синтеза имени А.В. Топчиева» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «6» июня 2025 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета РХТУ.1.4.01 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре и на официальном сайте https://muctr.ru федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева».

Автореферат диссертации разослан « » мая 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета РХТУ.1.4.01,
кандидат химических наук Чепцов Д.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние десятилетия биокатализ (синтетический катализ на основе ферментов), хорошо дополняет традиционные методы производства, такие как асимметрический синтез энантиомерно чистых органических соединений, за счет эффективного катализа известных химических реакции, проходящих с высокой энантио- и региоселективностью. При всем многообразии имеющихся методов выделения отдельных стереомеров оптически активных органических соединений в каждом конкретном случае приходится экспериментально выбирать наиболее приемлемый для данного класса веществ вариант синтеза или расщепления рацематов, очистки и выделения конкретных стереоизомеров. Причем если для обычных органических соединений подобные методы, как правило, хорошо отработаны, то при работе с большинством физиологически активных соединений с несколькими хиральными центрами, особенно малоустойчивыми, такие методы предполагают особые условия применения. В тоже время важность выделения в стереомерно-чистом виде соединений, среди которых важнейшие асимметрические катализаторы органического синтеза и многочисленные физиологически активные препараты лекарственного и сельскохозяйственного назначения в настоящее время не вызывает сомнений. Стремление к повышению эффективности предназначенных для воздействия на живую природу химических соединений привело к появлению инсектицидных и гербицидных составов с повышенным содержанием одного из стереомеров, а в области фармакологических препаратов высокая энантиомерная чистота стала обязательной и в международный стандарт производственных требований (GMP) непременно включается получение, изучение строения и биологических свойств всех индивидуальных стереомеров физиологически активных веществ. Высокая энантиомерная чистота продуктов является преимуществом именно ферментативного подхода, благодаря присущей ферментам стереоселективности. В отличие от химического синтеза, биокатализ можно проводить в сравнительно мягких условиях. В качестве катализаторов в биокатализе всё чаще используются доступные липазы как изолированные, так и иммобилизованные. Известно, что многие липазы продемонстрировали высокую активность по отношению к неприродным субстратам в органических и водных средах и стали использоваться для ряда синтетических превращений органических веществ.

Степень разработанности темы исследования. Липазы привлекают внимание химиков-органиков во всем мире своей простотой в обращении, широкой толерантностью к субстрату, высокой стабильностью к температурам и органическим растворителям и коммерческой доступности. Хотя липазы позволяют стереоселективно осуществить реакции переацилирования, этерификации, гидролиза и некоторые другие, они пока еще ограниченно используются в органической и элементоорганической химии. В тоже время липазы являются распространенными и хорошо изученными ферментами, позволяют использовать и необычные субстраты, круг которых может быть существенно расширен. Всё это позволяет их эффективно применить на одной из стереоселективных стадий химического получения оптически активных соединений, реализуя тем самым химико-ферментативный подход к получению отдельных стереомеров ценных физиологически активных веществ.

Цель работы: Разработка химико-ферментативных подходов к получению хиральных физиологически активных органических соединений с участием липаз на ключевых стадиях. При этом основное внимание уделено синтезу веществ, обладающих ценными противотуберкулезными или противоопухолевыми свойствами.

Задачи работы:

1) Химико-ферментативное получение (*S,S*)-этамбутола.
2) Получение отдельных энантиомеров хлорного аналога бедаквилина
3) Химико-ферментативный метод получения (*S*)-5-фтор-диоксифенилаланина ((*S*)-5-фтор-ДОФА)
4) Ферментативное выделение чистого (Sc,S_S)-стереомера окиси метионина
5) Сравнение химико-ферментативной стратегии получения с чисто химическими подходами, выявление их особенностей и установление преимуществ использования.

Научная новизна работы включает следующие основные результаты:

Разработан химико-ферментативный способ получения (*S,S*)-этамбутола из нитропропана и других доступных соединений в результате пятистадийного процесса с расщеплением производных рацемического 2-амино-1-бутанола на ключевой стадии с помощью липаз.

Выделены индивидуальные стереомеры хлорного аналога бедаквилина стереоселективным ацилированием с использованием PPL-липазы. Получен широкий набор их растворимых солей.

Осуществлен химико-ферментативный способ получения (*S*)-5-фтор-диоксифенилаланина из 2-фторфенола с использованием тирозинфеноллиазы на

ключевой стадии синтеза энантиомерного чистого 3-фтор-(*S*)-тирозина.

Разработан стереоселективный метод выделения отдельного (*Sc,S*$_S$)-диастереомера окиси метионина из смеси (*Sc,S*$_S$) и (*Sc,S*$_R$)-диастереомеров с использованием метионин-γ-лиазы.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется разработкой неизвестных ранее химико-ферментативных превращений с применением PPL-липазы, тирозинфеноллиазы, метионин-γ-лиазы, а также иммобилизованной липазы B из *Candida Antarctica,* разработкой экологичных способов получения лекарственного препаратов этамбутола и 5-фтор-ДОФА.

Совокупность результатов исследования вносит фундаментальный и практический вклад в решение актуальных проблем органического стереоселективного синтеза и повысит эффективность получения ряда фармацевтических ингредиентов.

Методология и методы диссертационного исследования. Представленные в работе результаты получены с использованием современных физико-химических методов исследования: спектроскопии ЯМР ^{1}H, ^{19}F и ^{13}C, ИК-, УФ–спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения, рентгеноструктурного анализа, а также результатов элементного анализа. Стереохимические особенности новых соединений устанавливали с использованием методов ВЭЖХ на хиральных колонках.

Положения, выносимые на защиту:

- Химико-ферментативный метод получения (*S,S*)-этамбутола
- Химико-ферментативный синтез (*S*)-5-фтор-ДОФА
- Результаты получения отдельных энантиомеров хлорного аналога бедаквилина
- Ферментативное выделение чистого (*Sc,S*$_S$)-диастереомера окиси метионина

Степень достоверности результатов исследования обеспечивалась тщательной экспериментальной работой с контролем условий проведения химических и ферментативных процессов, использованием приборов и измерительных средств необходимой точности и воспроизведением всех экспериментов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях: Молодежной конференции-аттестации «Веснянка» ИНЭОС РАН 2020, 2021 и 2022 гг, XII Международной конференции молодых учёных по химии «Менделеев-2021» (Санкт-Петербург, 2021г.), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» (Москва, 2024 г.).

Личный вклад автора состоит в обсуждении целей и задач исследований, проведении экспериментов по синтезу целевых соединений и изучению их свойств,

обобщении, анализе и трактовке полученных экспериментальных данных, формулировке положений и выводов работы, а также в написании научных публикаций и представлении докладов по теме диссертации на конференциях различного уровня.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ в изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts. Опубликованы два патента Российской Федерации. Результаты научного исследования подтверждены участием на научных мероприятиях всероссийского и международного уровня.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 149 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список цитируемой литературы 203 ссылки и дополнительные материалы. Работа содержит 5 таблиц, 18 рисунков, 44 схемы.

Благодарности. Автор выражает особую благодарность к.х.н. Фалееву Н.Г, м.н.с. Цветиковой М. А., к.х.н. Горуновой О.Н. и к.х.н. Быстровой Н.А., к.х.н. Ильину М.М. (все ИНЭОС РАН), д.х.н. Хрусталеву В.Н. (РУДН), а также всему коллективу лаборатории ГРЭОС ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова за участие в постановке экспериментов и обсуждении полученных результатов на разных этапах работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цели исследования, изложены научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлен литературный обзор, который посвящен недавним достижениям в применении ферментов, преимущественно липаз, в разнообразных реакциях стереоселективного органического синтеза, для получения биологически активных соединений в стереомерно чистом виде как в лабораторном, так и в промышленном органическом синтезе. К достоинствам липаз отнесены доступность, дешевизна и относительно широкая субстратная специфичность, позволяющая использовать помимо известных и ряд нестандартных субстратов. Рассмотрены перспективы их применения. Показано, что использование липаз в органическом синтезе представляет собой многообещающую стратегию зеленого синтеза лекарств и физиологически ориентированных соединений, которая, все шире используется в органической химии.

Во второй главе описаны разработанные химико-ферментативные методы получения хиральных физиологически активных органических соединений,

обладающих ценными противотуберкулезными или противоопухолевыми свойствами.

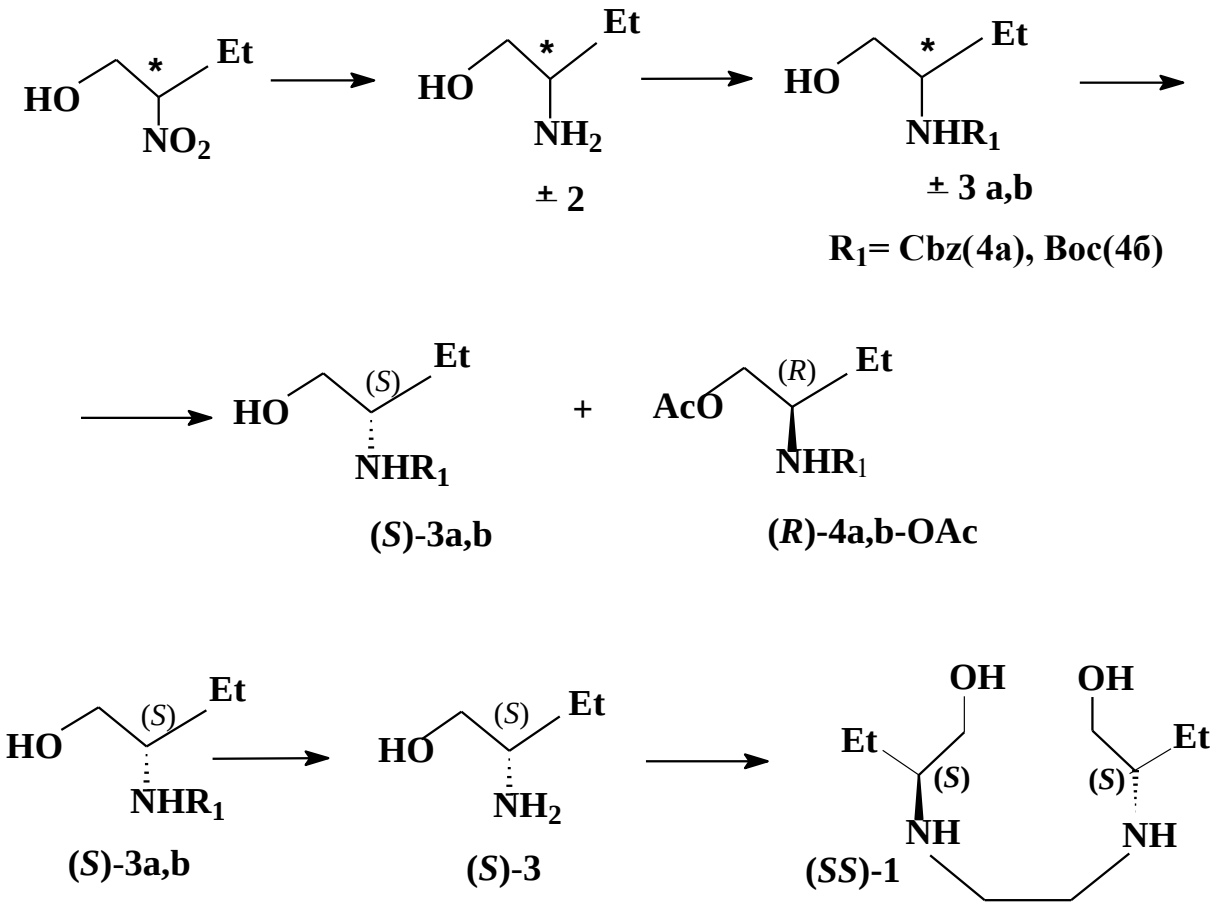
В третьей главе приведены экспериментальные методики получения и выделения целевых веществ, результаты их анализа, доказательства состава и строения.

1. Химико-ферментативный метод получения (*S,S*)-2,2'-(этилендиимино)дибутан-1-ола (этамбутола)

Анализ литературных данных работы с ферментами в органических и водно-органических средах позволил перейти к осуществлению химико-ферментативных методов получения важных физиологически активных веществ, первым из которых был этамбутол **1**. Антибиотик (*S,S*)-2,2'-(этилендиимино)ди-1-бутанол **1** является одним из эффективных противотуберкулезных средств, препаратом первого ряда. Среди стереомеров диола **1** только его (*S,S*)-диастереомер обладает сильной противотуберкулезной активностью, *мезо*-диастереомерв 16 раз менее активен, а (*R,R*)-стереомер опасен для теплокровных и вызывает слепоту. Известные способы получения главным образом основывались на промежуточном выделении неприродной аминокислоты (*S)*-норвалина, которую после селективного восстановления в несколько стадий переводили в этамбутол. При этом энантиомерно-чистый (*S*)-норвалин выделяли из рацемата через его диастереомерные соли, например, кристаллизацией с L-винной кислотой. Ферментативные подходы к получению этамбутола ранее в литературе не рассматривались.

Предложенный химико-ферментативный подход к получению этамбутола базируется на синтезе рацемического (±)-*N*-карбобензокси-2-аминобутан-1-ола и его энантиоселективном ацилировании в присутствии липазы на ключевой стадии расщепления с выделением оптически активного спирта (схема **1**). Нитробутан-1-ол, полученный моноконденсацией формальдегида с нитропропаном восстанавливали до амина (±)-**2**, который превращали в N-Cbz или N-Boc-производные (±)-**3a** или (±)-**3b**. Для расщепления рацемических соединений (±)-**3a,b** использовали этилацетат в качестве ацилирующего агента в присутствии липазы, что дало оптически активные спирты (+)-**2** и ацетаты его энантиомера (–)-**4a,b**. Этилацетат является удобным ацилирующим агентом для ферментативного расщепления рацематов соединений, содержащих фрагмент первичного спирта, обладающих низкой нуклеофильностью и поэтому нереагирующих с ним с образованием соответствующих ацетатов в отсутствие фермента. Для повышения энантиоселективности ацилирования, катализируемого PPL-липазой, были испытаны различные растворители. Лучшие результаты были получены в хлороформе. Следует отметить, что использование

липаз из *Candida cylindracea* и *Candida rugosa* не дало положительного результата. Чистые стереомеры(+)-**3a** с *ee* 98 % и ацетат (–)-**4a** (значение *ee* составляет 91 %) выделяли из реакционных смесей колоночной хроматографией и согласно литературным данным они являются (*S*)- и (*R*)-энантиомерами, соответственно. Для определения энантиомерной чистоты использовали метод ВЭЖХ на хиральных колонках. В качестве эталона использовали рацемические (±)-**3a** и его ацетат (±)-**4a**, полученные ацилированием уксусным ангидридом спирта (±)-**3a** в присутствии DMAP (1 %). Аналогично проводили получение и разделение энантиомеров *Boc*-производного (±)-**3b**, однако для достижения 90 % выхода (*S*)-*N*-*Boc*-**3b** потребовалось 24 часа перемешивания. Удаление защитной группы в соединениях (*S*)-**3a,b** с высоким выходом приводит к продукту (*S*)-**2**. Энантиомер (*R*)-2-аминобутан-1-ола легко рацемизовать с использованием никеля Ренея в качестве катализатора и использовать повторно. Далее аминоспирт (*S*)-**3** алкилированием 1,2-дихлорэтаном трансформировали в целевой диол (*S*,*S*)-**1** по известному методу.



Реагенты и условия: (i) Pd/C, H_2, MeOH; (ii) a) Cbz-Cl, NaOH ; b) Boc_2O, NaOH; (iii) липаза PPL, EtOAc; (iv) a) Pd/C, *c*-C_6H_{10} b) H^+; (v) $(CH_2Cl)_2$, NaOH

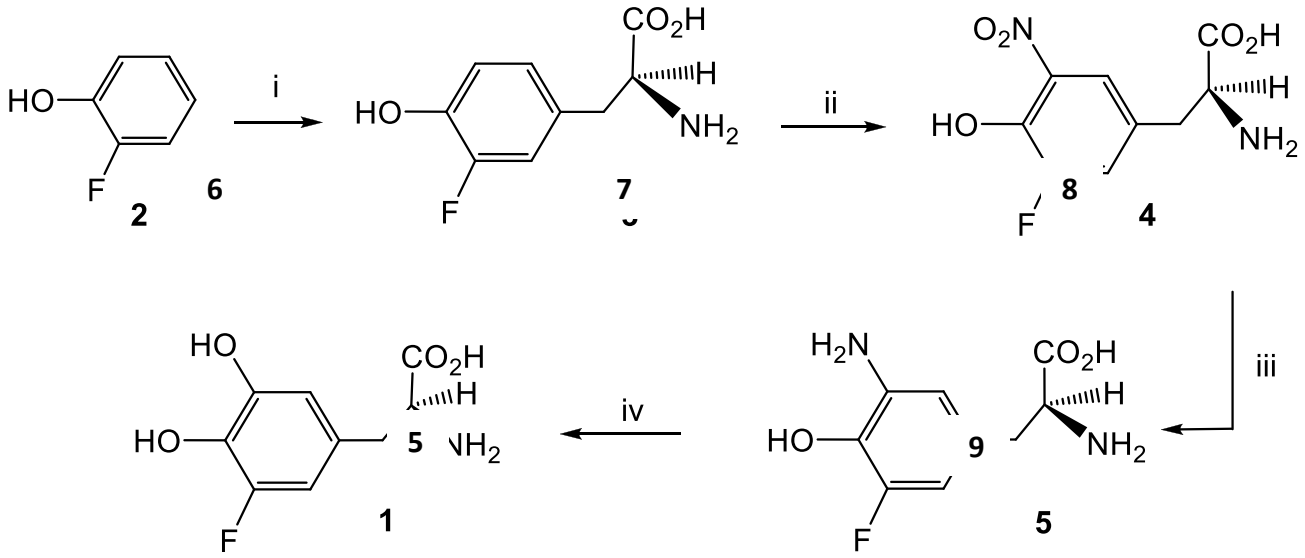
Схема 1 – предложенный подход к синтезу (*S*,*S*)-этамбутола

Благодаря высокой эффективности ферментативного расщепления, достигнутой в реакции PPL-катализируемого ацилирования производных рацемических спиртов (±)-**3a,b** в этилацетате и простоте, предлагаемый подход может рассматриваться, как возможная альтернатива известному получению оптически активных предшественников диола **1** через расщепление диастереомерных солей кристаллизаций.

2. Энантиоселективный синтез (*S*)-5-фтор-ДОФА химико-ферментативным путем

Монофторированные производные (*S*)-3,4-дигидроксифенилаланина представляют интерес для диагностического скрининга болезни Паркинсона с использованием ПЭТ (позитронно-эмиссионной томографии) и для получения аналогов физиологически активных пептидов. Способы получения монофторированных производных ДОФА, в основном, базируются на получении соответствующего фторпроизводного тирозина и его последующего окисления до целевого продукта. Другие методы получения (*S*)-5-фтор-ДОФА весьма ограничены. Разработка химико-ферментативного метода получения (*S*)-5-фтор-ДОФА в мягких условиях, позволила исключить использование токсичных исходных и побочных продуктов характерных для химического пути получения окислением (*S*)-5-фтор-тирозина.

Общая схема получения энантиомерно чистого (*S*)-5-фтор-ДОФА **5** на основе доступного 2-фторфенола **6**, представлена на схеме **2**.



Реагенты и условия: i, NH_3, $Me(CO)CO_2H$, тирозинфеноллиаза; ii, HNO_3; iii, Sn, HCl;iv, $Ba(NO_2)_2$, $CuSO_4$

Схема 2 - синтез 5-фтор-L-ДОФА

На схеме **2** на первой ферментативной стадии 2-фторфенол **6** в присутствии пировиноградной кислоты и аммиака превращался в (*S*)-3-фтор-тирозин **7** по аналогии с использованием культуры живых клеток. Клетки бактерий *Citrobacter freundii*, содержащие фермент тирозинфеноллиазу, использовали сразу после культивирования на питательной среде. Выделенный (*S*)-3-фтор-тирозин **7** далее превращали химическим путем: нитровали HNO_3 до (*S*)-3-фтор-5-нитро-тирозина **8** обычным способом и восстанавливали оловом до (*S*)-3-амино-5-фтор-тирозина **9**. Последняя стадия заключалась в диазотировании амина **9** с последующим гидролизом диазосоединения в инертной атмосфере без его выделения с образованием целевого (*S*)-5-фтор-ДОФА **5** с выходом 68 % и высокой стереоселективностью в мягких условиях процесса. Общий выход по всем стадиям составил 53 %. ДОФА и ее производные, как известно, легко окисляются под действием кислорода воздуха в ДОФА-хинон. Использование на последней стадии (*S*)-3-амино-5-фтор-тирозина **9** и инертной атмосферы позволило исключить побочную реакцию образования хинона. Результаты исследования реакционной смеси методами ЯМР ^{1}H и ^{19}F показали отсутствие примеси окисленных соединений. Для получения азотистой кислоты использовали нитрит бария, который образовывал в растворе нерастворимый осадок сульфата бария с сульфат-анионом, что упрощало выделение продукта **5**. Азотистую кислоту брали в эквимолярном соотношении к аминофтортирозину **9** для того, чтобы диазотирование проходило селективно по ароматической аминогруппе.

Характерными особенностями данного подхода являются мягкие условия проведения реакций в инертной атмосфере, высокая стереоселективность процесса и высокие выходы целевого продукта, устранение окисления промежуточного фенола, приводящего к побочным циклическим соединениям, упрощение процедуры выделения чистых продуктов.

3. Получение отдельных стереомеров 1-(6-бром-2-хлорхино-3-лил)-4-диметиламино-2-(нафтален-1-ил)-1-фенилбутан-2-ола и его солей.

Среди противотуберкулезных препаратов нового поколения выделяется (1*R*, 2*S*)-1-(6-бром-2-метокси-3-хинолил)-4-диметиламино-2-(нафтален-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол **(**бедаквилин), который активен в отношении различных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, в том числе с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Он, однако, практически нерастворим в водных средах и имеет большое число побочных эффектов. Ряд производных бедаквилина также показали высокую

противотуберкулезную активность, в том числе и 1-(6-бром-2-хлорхино-3-лил)-4-диметиламино-2-(нафтален-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол **10**. Однако полная характеристика его структуры, как и наличие его чистых растворимых форм для изучения физиологической активности отсутствовали. Поэтому, необходимо было предложить доступный способ получения отдельных диастереомерных и энантиомерных растворимых форм вещества для получения новых функциональных производных, обладающих потенциальной физиологической активностью.

Алканол **10** в виде смеси диастереомеров (с соотношением 1 : 1) получали, конденсацией 3-диметиламино-1-пропионафтона с 2-хлор-6-бром-3-бензилхинолином с использованием диизопропиламида лития. Для выделения отдельных диастереомерных форм **10а** и **10б** мы использовали их различную растворимость в хлороформе и четыреххлористом углероде, что позволило после дополнительных перекристаллизаций смесей обогащенных одним из стереомеров, выделить чистые диастереомеры свободного основания **10а** и **10б** с выходами 42 % и 43 %, соответственно. Строение диастереомеров подтверждено данными ИК- и ЯМР [^{1}H, ^{1}H{^{13}C}, ^{13}C{^{1}H}-спектров, а также рентгеноструктурным анализом (Рисунок **1**).

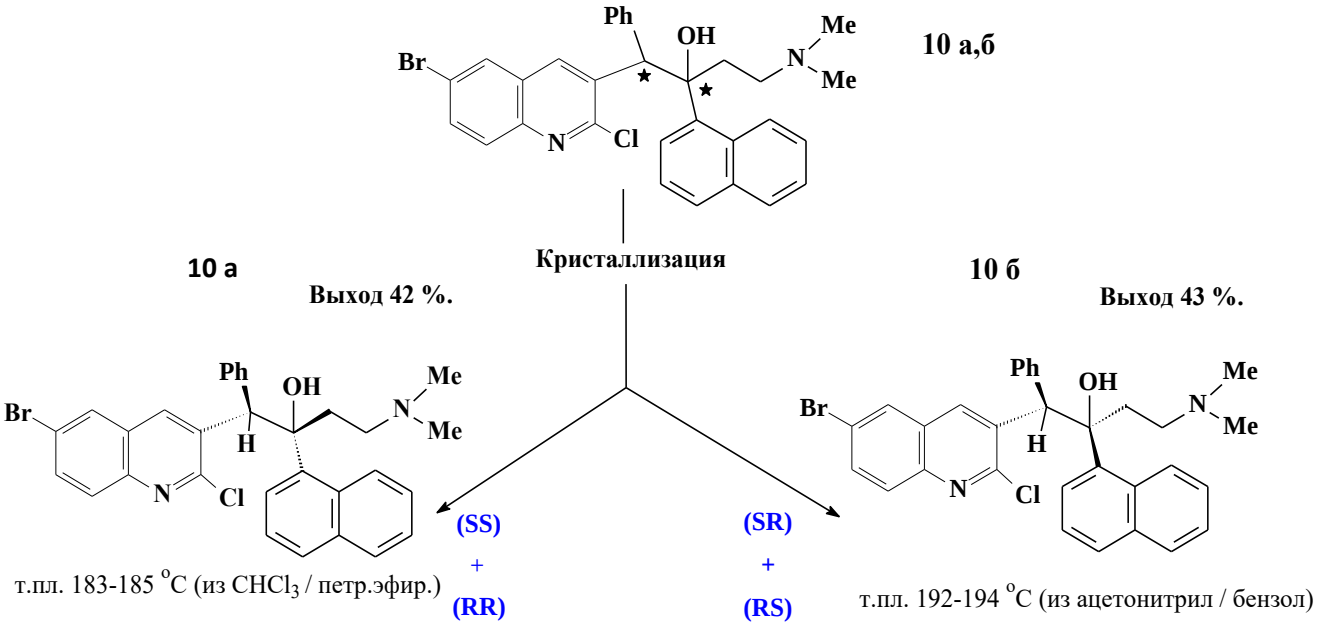


Схема 3 – получение отдельных стереоизомеров аналога бедаквилина (указан один из стереомеров)

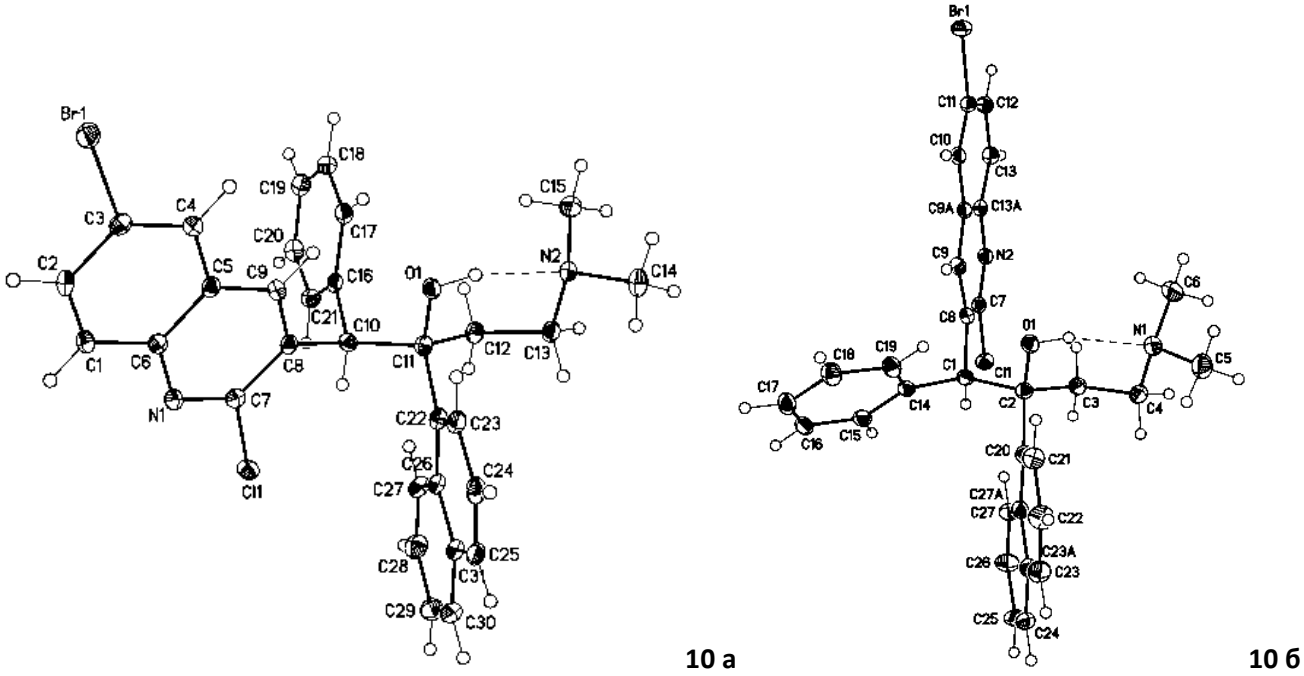


Рисунок 1 - РСА выполнен проф. В.Н. Хрусталевым (РУДН)

Для расщепления рацемических соединений (±)-**10a,b** использовали винилацетат в качестве ацилирующего агента в присутствии липазы. Лучшие значения энантиоселективности получены при PPL-катализируемом ацилировании рацемата (±)-**10a** (схема **3)** винилацетатом, которое приводит к образованию оптически активных спирта (+)-**10a** и ацетата его энантиомера (—)-**10a-OAc** (таблица **1**) (схема **4**). Для достижения конверсии в 48% при проведении ацилирования в $CHCl_3$ потребовалось 48 часов. Для выделения такого же количества ацетата **10б-OAc** при использовании другого диастереомера **10б** потребовалось существенно большее время - 72 часа.

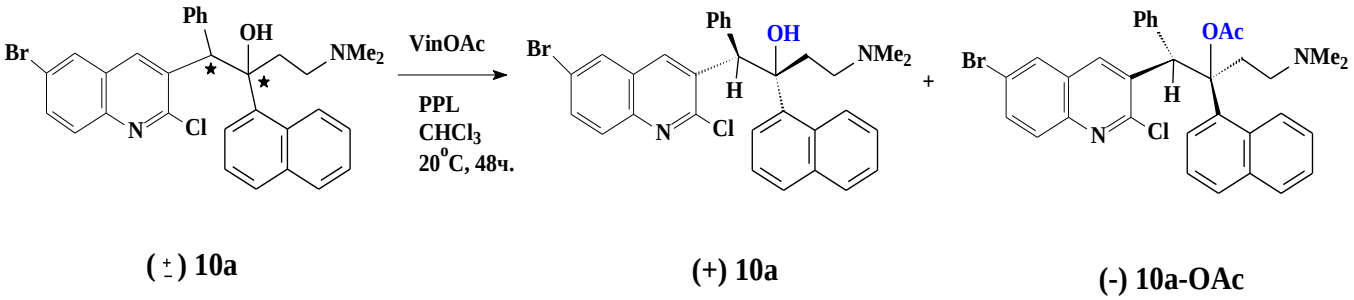


Схема 4. Расщепление диастереомера **10a** стереоселективным ацилированием

Таблица 1 – Энантиомерный анализ продуктов ацилирования рацемического диастереомера **10а**.

Время, ч 20°С	*ee* непрореагировавшего (*SS*)-алканола (+) *	*ee* образовавшегося (*RR*)-ацетата(–) *	Конверсия, %
12	23	> 98	26
20	20	97	38
48	81	> 98	46

*Энантиомерный анализ ВЭЖХ проведен кхн М.М.Ильиным (ИНЭОС РАН).

Энантиомерную чистоту полученного ацетата (-)-**10а-ОАс** определяли с использованием ВЭЖХ на хиральных колонках, которая показала значение *ee* > 98 % (другой энантиомер не был обнаружен). В качестве стандарта использовали рацемический ацетат (±)-**10а-ОАс**, полученный с высоким выходом из спирта (±)-**10а** ацилированием уксусным ангидридом под действием DMAP. Высокая энантиоселективность PPL-катализируемого ацилирования, а также простота предложенного подхода делают его возможной альтернативой известному методу получения отдельных стереомеров **10а,б** через расщепление их диастереомерных солей.

Ограниченная растворимость диастереомеров **10а,б** в водно-спиртовых средах, затрудняющая исследование их биологической активности, потребовала необходимости перевода их в растворимую форму за счет солеобразования. Синтез таких солей 1-(6-бром-2-хлорхино-3-лил)-4-диметиламино-2-(нафтален-1-ил)-1-фенилбутан-2-ола на примере чистого диастереомера **10а** проводили в двухфазной системе при интенсивном перемешивании, варьируя как соотношение растворителей (вода/хлористый метилен), так и температуру реакции (20 - 60° С) и время процесса. Были получены щавелевокислая, метансульфокислотная, дисолянокислая, ацетатная, *п*-толуолсульфонатная и цитратная соли аминохинолина **10а**. Полученные соли, хорошо растворимые в водном спирте, являются потенциально физиологически активными веществами, что следует также из теоретического расчета по программе PASS и, соответственно, могут быть рекомендованы для дальнейших испытаний в качестве новых противотуберкулезных средств.

4. Необычная стереоселективность метионин- γ-лиазы из *Citrobacter freundii* в отношении к диастереомерному L-метионинсульфоксиду

Биокаталитическое расщепление рацемических молекул интенсивно исследуется в последние годы. Успешное стереоселективное расщепление ферментами необычных субстратов с несколькими хиральными центрами встречается значительно реже. При этом расщепление обоих диастереомеров происходит обычно с одинаковым результатом и близкой стереоспецифичностью.

На примере диастереомерной смеси (S_cS_S)- и (S_cR_S)-метионинсульфоксида нами впервые обнаружена высокая стереоселективность фермента метионин-γ-лиазы (КФ 4.4.1.11, МГЛ) в отношении конфигурации хирального центра на γ-атоме серы при наличии еще одного хирального атома в α-положении. МГЛ обладает широкой субстратной специфичностью и абсолютной стереоселективностью в отношении конфигурации протона у α-углеродного атома субстрата, катализирует обратимую реакцию α,γ-элиминирования L-метионина и его аналогов, а также β-элиминирование L-цистеина и аналогов с образованием аммиака, α-кетокислот и тиолов. Установлено, что МГЛ также катализирует α,β-элиминирование сульфоксида S-алк(ен)ил-L-цистеина с образованием тиосульфинатов, для которых была показана антимикробная активность *in vitro* против грамотрицательных и грамположительных бактерий.

Исследования взаимодействия фермента с (S_cS_S)- и (S_cR_S)-S-алк(ен)илцистеин сульфоксидами ранее выявило [1], что мутантная форма рекомбинантного фермента из *Citrobacter freundii* с заменой Cys115 на гистидин (C115H МГЛ) разлагает оба диастереомера в равной степени, т.е. данный процесс не селективен в отношении конфигурации уходящей в реакции β-элиминирования группы. Аналогичные эксперименты в отношении реакций α,γ-элиминирования ранее не проводились, и вопрос о стереоселективности фермента в отношении хирального центра в γ-уходящей группе до настоящего времени оставался открытым.

Нашей целью было исследование взаимодействия фермента МГЛ с субстратом − диастереомерной смесью (S_c,S_S) и (S_c,S_R)-метионинсульфоксида. Это практически важно поскольку МГЛ рассматривается как перспективный противораковый агент. Дефект метаболизма, известный как «метониновая зависимость», заключается в неспособности опухолевых клеток синтезировать метионин. В настоящее время противоопухолевая эффективность данного фермента показана *in vitro* и *in vivo*.

---

[1] V.V. Kulikova, E.A. Morozova, A.N. Rodionov, V.S. Koval, N.V. Anufrieva, S.V. Revtovich and T.V. Demidkina, *Biochimie*,2018, **151**, 42.

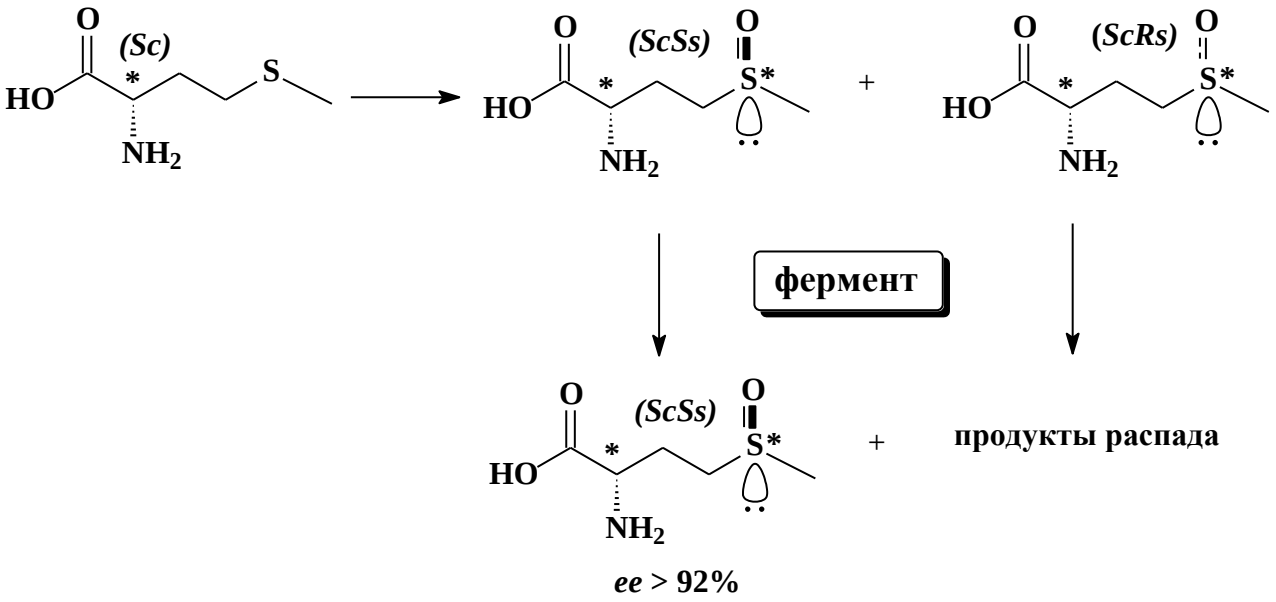


Схема 5 – Стереоселективное ферментативное расщепление диастереомеров

Предварительно было установлено, что (Sc,S_S)/(Sc,S_R)-метионинсульфоксид разделяется методом ВЭЖХ на аналитической колонке с хиральной фазой (колонка Chirobitic TAG 250 x 4.6мм; элюент : MeOH / H_2O (60 / 40) + 0.2% DEA; 0,70 мл / мин, UV-детектор 210 нм) на два диастереомера, соотношение которых составляет 68 : 32 (рисунок **2а**). Этот факт позволяет определить предпочтительность разложения того или другого диастереомера при действии МГЛ на исходную диастереомерную смесь, получаемую окислением природного метионина.

Эксперименты проводили при комнатной температуре, отбирая аликвоты реакционной смеси через определенные промежутки времени, при этом в каждую добавляли строго определенное количество стандарта − (*R*)-Phe и определяли количество каждого (Sc,S_S) и (Sc,S_R) стереомера в реакционной смеси (таблица **2**). Ферментативный процесс проводили в калий фосфатном буфере (pH 8.1). Контроль реакции, протекающей по схеме **5** осуществляли методом ЯМР ^{1}H в сочетании с анализом методом ВЭЖХ на хиральной колонке (рисунок **3 б,в**). Продукты реакции в дальнейшем дополнительно анализировали методами ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

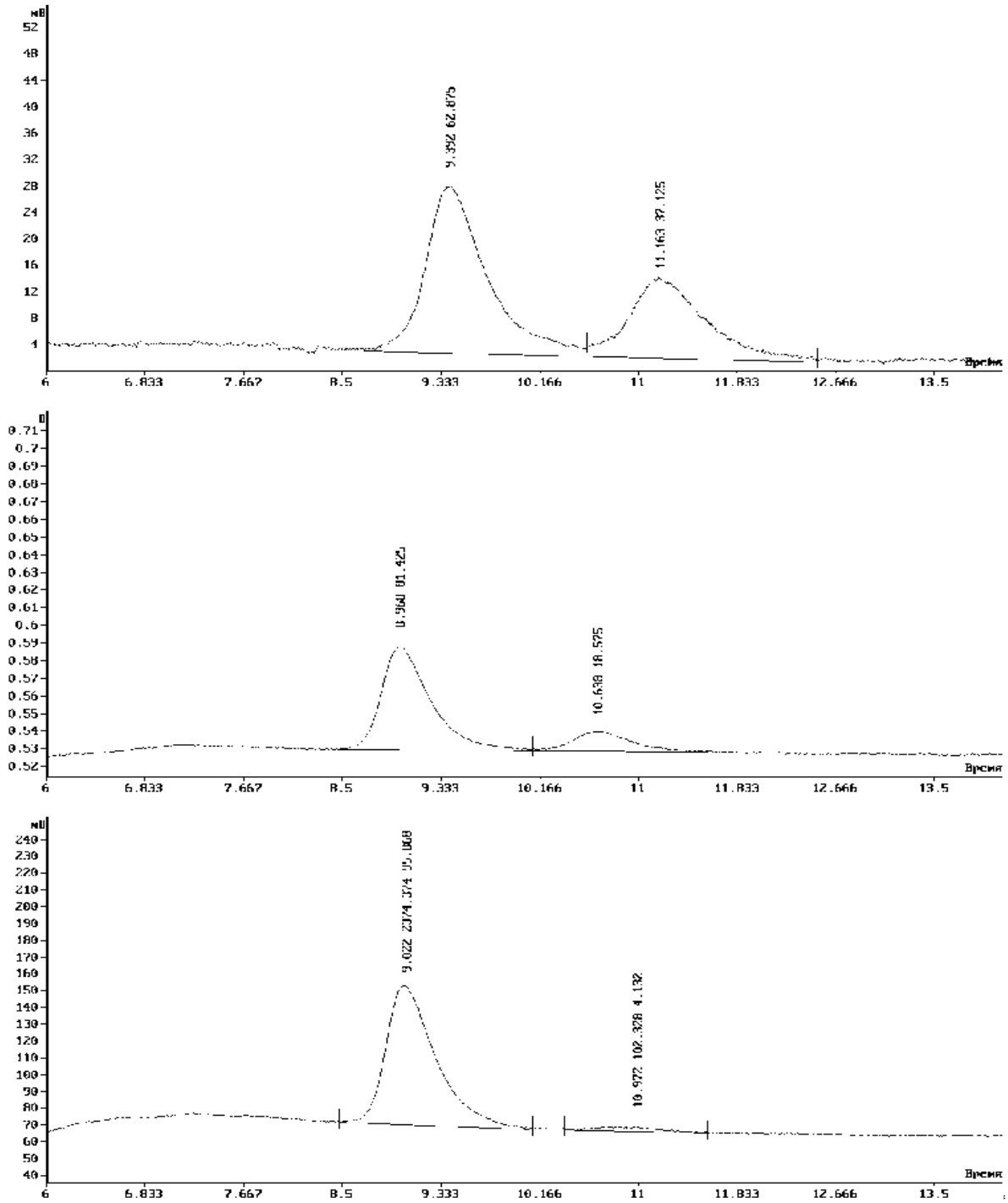


Рисунок 2 - Действие метионин–γ-лиазы на (*Sc,S*$_S$)/(*Sc,S*$_R$)-метионинсульфоксид. Данные ВЭЖХ на хиральной колонке Chirobitic TAG.
а) исходная смесь (вверху); б) через 5 часов; в) через 24 часа (внизу).

Результаты экспериментов и хроматографический анализ реакционных смесей позволяют сделать заключение, что концентрация преобладающего диастереомера в ходе реакции с МГЛ не меняется, тогда как концентрация минорного диастереомера постепенно снижается практически до нуля (см. таблицу **2**). Соответственно, за исследуемое время реакции меняется и соотношение диастереомеров от 62 : 38 до 96: 4.

В таблице **2** представлено изменение соотношения в зависимости от времени ферментативной реакции, которая завершается практически полностью за 24 часа.

Таблица 2 - Изменение концентрации и соотношения (*Sc,S*$_S$)/(*Sc,S*$_R$)-диастереомеров метионинсульфоксида в субстратной смеси от времени реакции

Время, часы	(*Sc,S*$_S$)-диастереомер, мМ (%)	(*Sc,S*$_R$)-диастереомер, мМ (%)
0	15.1 (62.9)	8.9 (37.1)
5	16.2 (81.4)	5.8 (18.6)
24	14.4 (95.9)	2.8 (4.1)

Таким образом, установлено, что в изученных условиях фермент катализирует стереоселективное расщепление только одного (*Sc,S*$_R$)-стереоизомера диастереомерной смеси, который выделен с *ee* 92 %, оставляя другой неизменным. Такая высокая стереоселективность данного фермента в отношении конфигурации хирального центра на атоме серы обнаружена впервые. Все продукты реакции были идентифицированы. Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C исходного субстрата, представляющие собой наложение спектров двух (*Sc,S*$_S$)/(*Sc,S*$_R$)-диастереомеров в результате воздействия МГЛ преобразуются в четкие спектры основного (*Sc,S*$_S$)-диастереомера. Следует отметить, что положительные значения удельного вращения исходной смеси стереомеров ($[\alpha]_D^{20}$ = +3.74) сохраняются положительными ($[\alpha]_D$ = +2.02) и для конечной реакционной смеси. Продуктами распада минорного (*Sc,S*$_R$)-диастереомера являются кетомасляная и сульфиновая кислоты, идентифицированные методами ИК, ЯМР ^{1}H и масс-спектрометрии. Появление сульфиновой кислоты в продуктах реакции можно объяснить окислением кислородом воздуха монометилсульфоксида, промежуточно образующегося в результате распада (*Sc,S*$_R$) диастереомера.

Механизм реакций элиминирования, катализируемых МГЛ, предполагает в качестве одной из стадий перенос протона к уходящей группе. Согласно данным рентгеноструктурного анализа в случае *α,β*-элиминирования донором протона является боковая группа Lys210, а для *α,γ*-элиминирования – боковая группа Tyr113. Эти группы находятся по разные стороны плоскости пиридоксалевого кольца кофактора. Таким образом, хиральное окружение уходящей группы должно быть в принципе разным в реакциях *α,β*- и *α,γ*-элиминирования. Возможно, этот факт и является причиной различий в стереоселективности фермента в отношении хиральных уходящих групп в рассматриваемых нами реакциях.

Использование МГЛ «дикого» типа позволило выделить один диастереомер сравнительно редким подходом, связанным с высокой селективностью фермента к одному из диастереомеров субстрата. В результате МГЛ в реакции γ-элиминирования использует как субстрат лишь один диастереомер (Sc,S_S)/(Sc,S_R)-метионинсульфоксида, т.е. фермент катализирует стереоселективное расщепление (Sc,S_R) стереоизомера диастереомерной смеси, оставляя другой неизменным. Это позволяет выделить основной (Sc,S_S)-диастереомер с высокой энантиомерной чистотой. Подобные примеры разделения диастереомеров за счет их различной устойчивости к внешним, в том числе хиральным воздействиям, к которым можно отнести и ферменты, единичны.

Можно отметить, что такая высокая стереоселективность данного фермента в отношении конфигурации хирального центра на γ-атоме серы при наличии еще одного хирального атома в α-положении обнаружена впервые. Данный факт расширяет возможности использования МГЛ в процессах, связанных с выделением отдельных стереомеров физиологически активных веществ с центральной хиральностью не только в α-, но и в γ-положении аминокислот.

Заключение

В ходе работы разработаны химико-ферментативные подходы по получению целого ряда соединений, обладающих противотуберкулезными или противоопухолевыми свойствами. Получены доступными методами в энантиомерно чистом виде (S,S)-этамбутол, (S)-5-фтор-диоксифенилаланин, (Sc,S_S)-диастереомер окиси метионина и отдельные стереомеры хлорного аналога бедаквилина. В перспективе предложенные подходы могут быть использованы для химико-ферментативного получения отдельных стереомеров других физиологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход к химико-ферментативному выделению всех стереомеров 1-(6-бром-2-хлорхино-3-лил)-4-диметиламино-2-(нафтален-1-ил)-1-фенилбутан-2-ола путем проведения на одной из стадий стереоселективного ацилирования с использованием PPL-липазы. Получен широкий набор растворимых солей одного из стереомеров.

2. Разработан химико-ферментативный метод получения противотуберкулезного препарата (*S*,*S*)-2,2'-(этилендиимино)дибутан-1-ола (этамбутола) исходя из нитропропана и других доступных соединений с расщеплением на ключевой стадии производных рацемического 2-амино-1-бутанола с помощью липазы.

3. Впервые обнаружена высокая стереоселективность фермента метионин-γ-лиазы в отношении конфигурации хирального центра на γ-атоме серы при наличии еще одного хирального атома в α-положении. Разработан стереоселективный метод получения энантиомерно чистого (Sc,S_S)-диастереомера окиси метионина.

4. Предложен и осуществлен химико-ферментативный способ получения (*S*)-5-фтор-диоксифенилаланина из 2-фторфенола с использованием культуры живых клеток бактерий *Citrobacter freundii*, содержащих фермент тирозинфеноллиазу.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ

1. **Публикации в изданиях, индексируемых в международных базах данных:**

1. Faleev N.G. Unusual stereoselectivity of methionine-γ-lyase from Citibacterfreundii toward diastereomeric (S)-methionine S-oxide / N.G. Faleev, M.A. Tsvetikova, **V.S. Yufryakov** [et al.] // Mendeleev Communications. – 2021. – Vol. 31, №2. – P. 236-238. **(Scopus)**
2. Yufryakov V.S. Chemo-enzymatic synthesis of (S,S)-2,2´-(ethylenediamino)dibutan-1-ol / **V.S. Yufryakov**, M.A. Tsvetikova, N.A. Bystrova, K.A. Kochetkov // Russian Chemical Bulletin. – 2023. – Vol.72, № 5. – P.1268-1273. **(Scopus)**
3. Кochetkov K.A. Application of lipases for obtaining optically active organic compound / K.A. Kochetkov, **V.S. Yufryakov**, A.V. Udod // ИНЭОС OPEN. – 2023. – Vol., №3. –P. 62-76. **(Chemical Abstracts)**
4. Кochetkov K.A. Enantioselective synthesis 5-fluoro-L-DOPA via chemoenzymatic route / K.A. Кochetkov, M.A.Tsvetikova, **V.S. Yufryakov** [et al.] // Mendeleev Communications .– 2024. – Vol. 34, №1. – P.11-12. **(Scopus)**
5. Kochetkov K.A. 1-(6-bromo-2-chloroquino-3-lyl)-4-dimethylamino-2-(naphthalen-1-yl)-1-phenylbutan-2-ol and its salts / K. A. Kochetkov, **V. S. Yufriakov**, E. H. Mammadbeyli [et al.] // Processes of Petrochemistry and Oil refining. – 2024. – Vol. 25, № 2. – P. 323-331 **(Web of Science)**

2. **Патенты российской федерации**.

1. Патент № 2712231 C1 Российская Федерация, МПК C07C 213/02, C07C 215/14. Способ получения этамбутола : № 2019124084 : заявл. 30.07.2019 : опубл. 27.01.2020 / К.А. Кочетков, Н.Г. Фалеев, **В.С. Юфряков** [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

2. Патент № 2817082 C1 Российская Федерация, МПК C07C 227/12, C07C 229/36, C07C 227/28. Способ получения 5-фтор-L-ДОФА : № 2023124455 : заявл. 22.09.2023 : опубл. 09.04.2024 / К.А. Кочетков, О.Н. Горунова, **В.С. Юфряков** [и др.]; заявитель ИНЭОС РАН.

3. **Публичные доклады на всероссийских и международных научных мероприятиях *(конференциях, съездах, симпозиумах, конгрессах)***

1. **Юфряков В.С.** Выделение стереомеров ряда физиологически активных соединений // «Школа аспиранта и студента» им. А.Н. Несмеянова». Учебная конференция-аттестация «Веснянка-2020», 30 марта – 2 апреля 2020 года: Сборник тезисов докладов и содокладов. – Москва, 2020. – С.77.
2. **Юфряков В.С.** Получение стереомеров ряда физиологически активных соединений // «Школа аспиранта и студента» им. А.Н. Несмеянова». Учебная конференция-аттестация «Веснянка-2021», 29 марта – 2 апреля 2021 года: Сборник тезисов докладов и содокладов. – Москва, 2021. – С.111.
3. **Юфряков В.С.** Получение стереомеров ряда физиологически активных соединений // «Школа аспиранта и студента» им. А.Н. Несмеянова». Учебная конференция-аттестация «Веснянка-2022», 4 – 8 апреля 2022 года: Сборник тезисов докладов и содокладов. – Москва, 2022. – С.80-81.
4. Yufryakov V.S. Isolation of stereoisomers of physiologically active compounds / **V.S. Yufryakov** // Mendeleev 2021 : Book of Abstracts XII International Conference on Chemistry for Young Scientists, St Petersburg, September 06-10, 2021. – St Petersburg, 2021. – P. 683.
5. Юфряков В.С. Химико-ферментативный синтез 5-фтор-L-ДОФА / **В.С. Юфряков**, К.А. Кочетков / Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2024» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова [Электронный ресурс]. – М.: МОО СИПНН Н.Д Кондратьева, 2024. ISBN 978-5-901-64042-5.