

RAPORT STIINTIFIC 2015

OPTIMIZAREA PROCESULUI DE REZOLUTIE CINETICA DINAMICA (DKR) IN REACTOARE DISCONTINUE

Principalele obiective ale acestei etape au fost optimizarea catalizatorilor de racemizare pentru procesele de DKR si realizarea acestora in reactoare discontinue.

Cercetarile efectuate in aceasta etapa au fost concretizate in elaborarea unei metodologii pentru:

SINTEZA CHEMOENZIMATICĂ A UNOR L- α -AMINOACIZI TIAZOLICI PRIN PROCESSE DE DKR ENZIMATICĂ

Aminoacizii naturali și non-naturali în forma enantiopură și-au găsit aplicații în domenii variate, de la domeniul medical sau cosmetic până la cel agro-industrial. Datorită reactivității grupelor funcționale prezente, aminoacizii pot fi utilizați ca intermediari în sinteza analogilor de produși naturali, de exemplu prin integrarea aminoacizilor non-naturali în peptide biologice active, se pot obține noi analogi peptidici cu activități, stabilități metabolice sau profile farmacologice superioare. Analogii aromatici ai aminoacizilor proteinogenici, în special α -arilalaninele, se regăsesc în structura unor agenți terapeutici, nu doar individual (L-DOPA, L-metildopa) ci și integrați în structuri mai complexe, cum ar fi cazul medicamentului nafarelin, ce conține un rest de L- α -2-naftilalanină. *Nucleul tiazolic* se regăsește în structura unor peptide de origine naturală, ca bleomicinele (antibiotice glicopeptidice anticanceroase), nocatiacinele, epotilonele, aeruginazolii și tiazomicinele (noi clase de antibiotice tiopetidice ciclice). Potențialul biologic al acestui sistem heterociclic este exploatat în design-ul unor noi compuși biologici activi, unii dintre ei fiind introduși în terapie. α -Aminoacizii derivați de 2-feniltiazol prezintă potențial ca sintoni chirali mai ales atunci când o conjugare π - π extinsă este benefică pentru interacțiunea cu receptorii farmacologici. O serie de L- α -2-ariltiazol-4-il-alanine au fost deja integrate în structura unor noi analogi de melanotropină. Relativ recent a fost realizată sinteza chimică asimetrică a unor 2-ariltiazol-4-il-alanine cu configurație L. Aminoacizii obținuți au fost integrați în secvența peptidică a neurotensinei, pentru obținerea unor noi analogi de neurotensină cu proprietăți analgezice.

Având în vedere potențialul chimic și biologic mai sus amintit al aminoacizilor chirali derivați de 2-feniltiazol, ne-am propus *elaborarea unei metode chemoenzimatice eficiente pentru obținerea unor L- α -2-ariltiazol-4-il-alanine* cu enantiopurități mari.

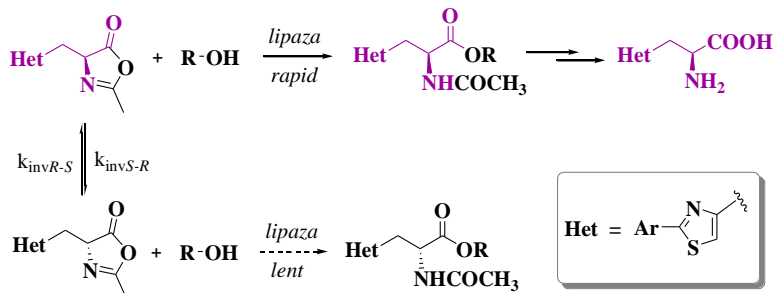
Dintre metodele enzimatic de obținere a aminoacizilor chirali, cea mai larg utilizată este rezoluția amestecurilor racemice utilizând enzime hidrolitice din clasa proteazelor, esterazelor, lipazelor. Mai sles lipazele au multe aplicații ca biocatalizatori pentru obținerea compușilor optic activi, datorită abilității lor de a transforma substraturi variate într-un mod regioselectiv și stereoselectiv, nu doar în hidroliză, ci și în alcooliză, aminoliză și hidrazinoliză, utilizând esteri, lactone sau lactame ca substrat.⁷

Față de rezoluția cinetică clasică, rezoluția cinetică dinamică (DKR) implică transformarea enantioselectivă a unui enantiomer simultan cu racemizarea enantiomerului rămas netransformat, ducând la obținerea produsului dorit cu randamente de peste 50%. Una dintre metodele de obținere a α -aminoacizilor optic activi este rezoluția cinetică dinamică mediată de lipaze a derivaților de oxazol-5(4H)-onă, sub acțiunea alcoolilor ca agenți nucleofili.

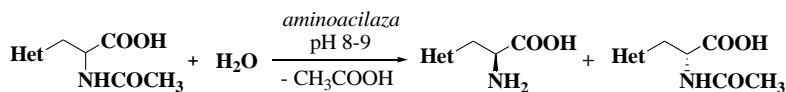
În acest studiu, s-a urmărit *elaborarea unei metode chemoenzimatice bazate pe procese de rezoluție cinetică, clasică și dinamică*, pentru obținerea L- α -aminoacizilor derivați de 2-feniltiazol. Reacțiile enzimatic investigate au fost optimizate în vederea obținerii produșilor cu randamente și cu enantiopurități cât mai mari.

A fost studiată sinteza chemoenzimatică a unor L- α -2-ariltiazol-4-il alanine, pornind de la aminoacizii racemici N-acetilați corespunzători, prin intermediul oxazol-5(4H)-onelor tiazolice, obținute printr-o reacție de ciclizare.

Etape cheie în sinteza stereoselectivă este rezoluția cinetică dinamică a oxazol-5(4H)-onelor tiazolice, printr-o reacție de deschidere de ciclu enantioselectivă, utilizând alcooli alifatici ca nucleofili, sub acțiunea catalitică a lipazelor (**Schema 1**). Principalele cerințe pentru ca această metodă să fie eficientă sunt: capacitatea lipazei de a accepta și de a transforma în mod stereoselectiv substratul respectiv, capacitatea substratului netransformat de a se racemiza cu o viteză suficient de mare, precum și proprietatea oxazolonei-substrat de a rezista la atacul alcoolului nucleofil fără participarea enzimei. Alcooliza neenzimatică ar putea duce la o deschidere de ciclu neselectivă și implică la scăderea enantiopurității produsului de rezoluție.



Schema 1. Rezoluția cinetică dinamică a oxazol-5(4H)-onelor tiazolice

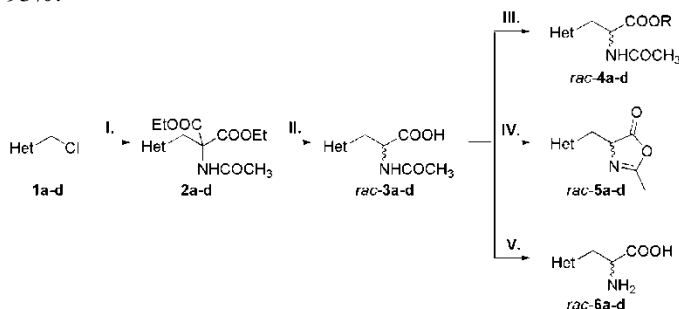


Schema 2. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a N-acetil- α -aminoacizilor tiazolici

Reacția de hidroliză enzimatică se desfășoară în mediu apos, în condiții de pH și de temperatură care trebuie bine controlate. Aminoacilazele își pot manifesta activitatea, după caz, la pH de 7-8 sau 8-9 și la temperaturi de 37°C și respectiv 50°C. Deoarece în urma reacției de hidroliză se formează acid acetic, pH-ul mediului de reacție scade în timp și este necesară ajustarea lui la valorile optime pentru performanța enzimei. Cel mai indicat pentru ajustarea pH-ului este hidroxidul de litiu. Deși aminoacilazele prezintă o foarte mare stereoselectivitate în majoritatea cazurilor, uneori chiar L-specificitate de substrat, utilizarea acestora este limitată de anumite dezavantaje, cel mai important fiind reprezentat de solubilitatea scăzută a substraturilor în mediul apos, sensibilitatea enzimei la modificările de pH și la numeroși inhibitori de natură anorganică.

1. Sinteza precursorilor pentru reacțiile enzimatic

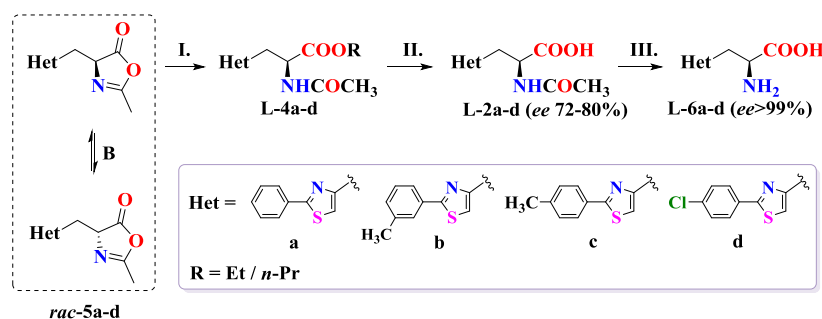
Sinteza aminoacizilor tiazolici *rac-6a-d* și a derivaților lor *rac-3a-d*, *rac-4a-d*, *rac-5a-d* este descrisă în **Schema 3**. 2-Aril-4-clorometiltiazolii **1a-d** s-au sintetizat prin reacția de condensare Hantzsch a unor tiobenzamide cu 1,3-dicloroacetona. Acizii 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici *rac-3a-d* s-au obținut cu randamente între 64-67%, prin reacția de condensare a compușilor halogenați **1a-d** cu N-acetilaminomalonatul de dietil, urmată de o hidroliză bazică a grupelor carboxilat și o decarboxilare. Aminoesterii N-acetilați *rac-2a-d* s-au obținut cu randamente de 63-65%, prin tratarea *rac-3a-d* cu diverși alcooli (metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-butanol), în tetrahidrofuran anhidru și în prezența 1,1'-carbonildiimidazolului ca agent activator de grupă carboxil. Prin ciclizarea aminoacizilor N-acetilați *rac-3a-d* în prezența *N,N'*-diciclohexilcarbodiimidei (DCC), s-au obținut oxazol-5(4H)-onele racemice corespunzătoare *rac-5a-d*. Solventul utilizat a fost diclorometanul anhidru, deoarece diciclohexilureea rezultată ca produs secundar este insolubilă în mediul de reacție și poate fi rapid îndepărtată prin filtrare. Deoarece ciclul oxazol-5(4H)-onic poate fi ușor clivat sub acțiunea unor nucleofili (apă, alcooli), a fost necesară utilizarea imediată a produșilor în reacțiile enzimatic. Aminoacizii liberi *rac-6a-d* s-au obținut sub formă de clorhidrați, prin hidroliza în cataliză acidă a N-acetil derivaților corespunzători *rac-3a-d*, cu randamente de 88-93%.



Schema 3. Sinteza 2-ariltiazol-4-il alaninelor racemice și a derivaților lor. Reactanți și condiții de reacție:
I. NaH, CH₃CONHCH(COOEt)₂/DMF, 60°C;
II. a). KOH 10%, reflux 4h; b). toluen, reflux 2h; III. Alcool (MeOH, EtOH, *n*-PrOH, *n*-BuOH), carbonildiimidazol/THF;
IV. DCC/CH₂Cl₂;
V. HCl 18%, reflux 4h.

2. Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă

N-Acetilaminoacizii racemici *rac-3a-d* au fost utilizați ca precursori pentru sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-2-ariltiazol-4-il alaninelor, prin intermediul produșilor de ciclizare, oxazolonele *rac-5a-d*. Prima etapă stereoselectivă a fost rezoluția cinetică dinamică a oxazolonele *rac-5a-d*, sub acțiunea catalitică a lipazelor, cu participarea alcoolilor în reacția de deschidere de ciclu.



Schema 4. Sinteza chemoenzimatică stereoselectivă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor și derivaților lor. Reactanți și condiții: **I.** CaL-B, etanol (pentru RCD a *rac-5a-c*) / *n*-propanol (pentru RCD a *rac-5d*), acetonitril; **II.** Na₂CO₃/H₂O, reflux; **III.** Acilaza I, pH 8.

Prođușii rezoluției cinetice dinamice, *N*-acetilaminoesterii **L-4a-d**, au fost hidrolizați la nivelul grupei ester, în condiții slab bazice (Na₂CO₃/H₂O). Acizii L-2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici rezultați, **L-2a-d**, au fost hidrolizați enzimatic enantioselectiv la nivelul grupei amidă, sub acțiunea catalitică a Acilazei I.

Pentru a investiga stereoelectivitatea proceselor enzimatiche, a fost necesară stabilirea unor metode analitice de separare a enantiomerilor amestecurilor racemice *rac-3-6a-d*. Au fost utilizate diverse coloane chirale HPLC și RP-HPLC. Condițiile de separare chirală și timpii de retenție a enantiomerilor sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Tabel 1. Condițiile de separare HPLC și timpii de retenție pentru *rac-2-6a-d*

Condiții separare	Coloană RP-HPLC Astec Chirobiotic V2, eluent: MeOH:CH ₂ COOH:Et ₃ N 200:0.15:0.15 v/v/v.							
Compus	L-3a	D-3a	L-3b	D-3b	L-3c	D-3c	L-3d	D-3d
R _t (min)	4.4	6.1	4.5	6.0	4.8	6.4	5.5	7.0
Condiții separare	Coloană HPLC Chiralpak IC, eluent: <i>n</i> -hexan: 2-propanol 80:20 v/v.							
Compus	(<i>S</i>)-5a	(<i>R</i>)-5a	(<i>S</i>)-5b	(<i>R</i>)-5b	(<i>S</i>)-5c	(<i>R</i>)-5c	(<i>S</i>)-5d	(<i>R</i>)-5d
R _t (min)	11.2	12.4	11.5	12.6	11.3	12.5	10.2	12.0
Compus	L-4a	D-4a	L-4b	D-4b	L-4c	D-4c	L-4d	D-4d
R _t (min)	29.9 ^a	36.4 ^a	25.0 ^b	29.2 ^b	28.5 ^b	34.0 ^b	28.9 ^a	35.5 ^a
	24.4 ^b	30.2 ^b					25.0 ^b	30.0 ^b
	20.3 ^c	25.2 ^c					19.0 ^c	23.2 ^c
	19.7 ^d	24.0 ^d					18.6 ^d	22.7 ^d
Condiții separare	Coloană RP-HPLC Zwix(+), eluent: MeOH (50mM HCOOH, 25mM dietilamină): acetonitril: apă 49:49:2 v/v/v							
Compus	<i>rac-2a</i>		<i>rac-2b</i>		<i>rac-2c</i>		<i>rac-2d</i>	
R _t (min)	5.9		4.2		5.2		4.1	
Compus	L-6a	D-6a	L-6b	D-6b	L-6c	D-6c	L-6d	D-6d
R _t (min)	10.9	18.8	9.5	20.2	10.3	21.2	11.3	24.9

^aester metilic; ^bester etilic; ^cester *n*-propilic; ^dester *n*-butilic

În prima etapă a sintezei stereoselective, s-au stabilit condițiile de reacție optime pentru rezoluția cinetică dinamică a oxazol-5(4*H*)-onelor *rac-5a-d*, catalizată de lipaze. În acest sens, au fost investigate diverse condiții de reacție (enzimă, nucleofil, solvent, catalizator de racemizare) pentru reacția de deschidere de ciclu a oxazol-5(4*H*)-onelor *rac-5a-d*. Compusul *rac-5a* a fost utilizat ca substrat model pentru optimizarea rezoluției cinetice dinamice enzimatiche. Mai întâi, a fost investigată alcooliza *rac-5a* în prezența a diverse lipaze, în alcool pur.

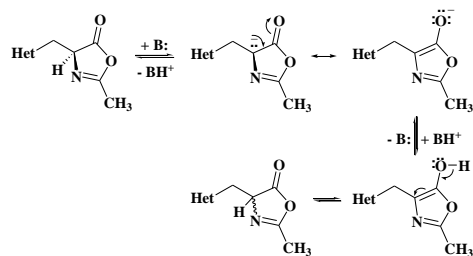
Dintre lipazele testate, doar două au prezentat rezultate promițătoare (**Tabel 2**): Lipaza din *Mucor miehei* a prezentat stereoselectivitate moderată (44.3% *ee*), iar lipaza B din *Candida antarctica* (Novozyme 435) a prezentat o stereoselectivitate superioară (72% *ee*), atunci când etanolul a fost utilizat ca nucleofil (**Tabel 3, linia 2**). De aceea, enzima CaL-B (Novozyme 435) a fost utilizată în experimentele RCD următoare.

Tabel 2. Screeningul de lipaze pentru rezoluția cinetică a oxazolonei *rac-5a*, în etanol, timp de reacție 4.5h.

Nr. crt.	Lipaza	<i>ee_p</i> %
1.	Lipaza din <i>Candida rugosa</i>	< 2
2.	Lipaza AK "Amano"	17*
3.	Lipaza din <i>Burkholderia cepacia</i>	11*
4.	Lipaza B din <i>Candida antarctica</i>	72
5.	Lipaza din <i>Candida cylindraceae</i>	<2
6.	Lipaza F	9
7.	Lipaza din <i>Mucor miehei</i>	44

Tabel 3. Excesele enantiomerice pentru acizii L-2-amino-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici obținuți prin RCD a oxazolonei *rac-5a* cu diverși alcooli ca nucleofili, la conversie totală

Nr. crt.	Alcool	Produs	ee%
1.	Metanol	L-4a ester metilic	7.6
2.	Etanol	L-4a ester etilic	72.0
3.	<i>n</i> -Propanol	L-4a ester <i>n</i> -propilic	47.5
4.	<i>n</i> -Butanol	L-4a ester <i>n</i> -butilic	35.3



Schema 5. Mecanismul racemizării bazice a oxazolonei

Având în vedere faptul că natura solventului și natura nucleofilului pot influența stereoselectivitatea reacțiilor enzimaticе, a fost investigată reacția de deschidere de ciclu a substratului *rac-5a* cu CaL-B, în diverși solvenți și cu diverși alcooli alifatici cu rol de nucleofili (metanol, etanol, *n*-propanol și *n*-butanol). S-a observat o viteză de racemizare scăzută a oxazolonei rămase netransformate, ceea ce a scăzut considerabil enantiopuritatea produșilor de rezoluție (**Tabel 4, Fig. 1**). De aceea, s-a încercat grăbirea procesului de racemizare prin utilizarea unui catalizator de racemizare bazic.

Deoarece prezența trietilaminei sau piridinei în mediul de reacție nu s-a dovedit a fi utilă, am decis să utilizăm un catalizator bazic imobilizat, în acest fel fiind evitată alterarea situsului catalitic al enzimei sub acțiunea catalizatorului bazic. În **Schema 5**, este prezentat mecanismul reacției de racemizare a oxazolonei, în cataliză bazică.

Tabel 4. Screeningul de solvenți pentru alcooliza enantioselectivă a oxazolonei *rac-5a*, cu CaL-B și etanol, după consumarea totală a substratului (6 zile)

Nr. crt.	Solvent	ee _p %
1.	1,4-Dioxan	51.3
2.	Diclorometan	<2%
3.	Toluen	58.9
4.	Acetonitril	36.7
5.	Tetrahidrofuran	29.2
6.	Dietileter	30.0

Cromatogramele obținute pentru amestecurile partenerilor de reactive racemici sunt prezentate în Figura 1.

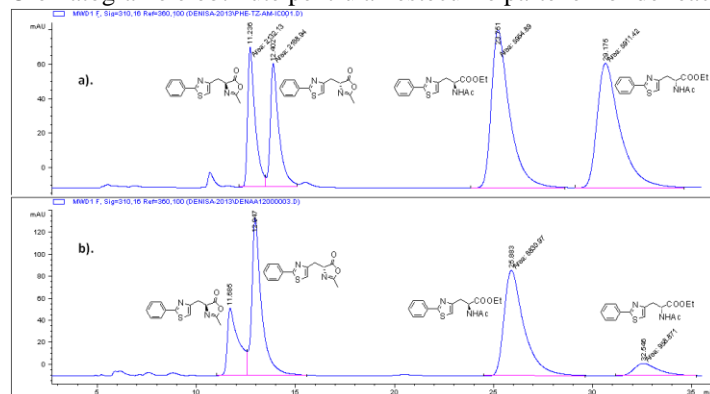


Fig. 1.

a). Separarea HPLC a enantiomerilor *rac-5-6a* pe coloana Chiralpak IC, eluent *n*-hexan:2-propanol 80:20 v/v.
b). Analiza HPLC a reacției enzimaticе de deschidere de ciclu a oxazolonei *rac-5a* în etanol, cu CaL-B, fără catalizator de racemizare

N,N-Dietilaminoetanolul imobilizat pe nanotuburi de carbon s-a dovedit a fi benefic pentru creșterea vitezei de racemizare a oxazolonei, fără a afecta stereoselectivitatea enzimei (**Fig. 2**).

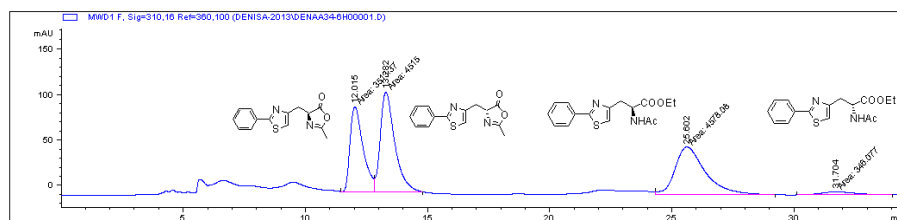


Fig. 2. Analiza HPLC a reacției de rezoluție cinetică dinamică catalizată de CaL-B pentru oxazolona *rac-5a* cu etanol, în acetonitril, în prezența catalizatorului de racemizare dietilaminoetanol imobilizat pe nanotuburi de carbon (colană Chiralpak IC, eluent *n*-hexan:2-propanol 80:20 v/v).

În continuare, rezoluția cinetică dinamică a oxazolonei *rac-5a*, catalizată de CaL-B, a fost investigată în prezența acestui catalizator de racemizare, în diverși solvenți. În câteva cazuri, s-a observat o creștere considerabilă a enantio purității produșilor (**Tabel 4**).

Tabel 4. Screeningul de solvenți pentru alooliza enantioselectivă a oxazolonei *rac-5a*, cu CaL-B și etanol, în prezența catalizatorului de racemizare (dietilaminoetanol imobilizate pe nanotuburi de carbon)

Nr. crt.	Solvent	ee _p %
1.	1,4-Dioxan	60.4
2.	Diclorometan	<2%
3.	Toluen	60.6
4.	Acetonitril	80.0
5.	Tetrahidrofuran	64.0 ¹
6.	Dietileter	30.4

Cele mai bune rezultate s-au obținut atunci când acetonitrilul a fost utilizat ca solvent (**Tabel 4**, linia 4) și etanolul ca nucleofil (**Tabel 5**, linia 2). Aceleași condiții de reacție au fost aplicate ulterior și pentru rezoluția cinetică dinamică a celorlalte oxazolone tiazolice (*rac-5b-d*). Au fost obținute rezultate similare bune și pentru transformarea substraturilor *rac-5b,c* (**Tabel 5**, liniile 5,6). În cazul *rac-5d*, la utilizarea *n*-propanolului s-a observat enantioselectivitatea cea mai bună, în acetonitril ca solvent (**Tabel 5**, linia 7).

Tabel 5. Rezoluția cinetică dinamică mediată de CaL-B a *rac-5a-d*, în acetonitril, cu diverși alcooli, în prezența dietilaminoetanolului imobilizat. Scara analitică.

Nr. crt.	Substrat	Alcool	Produs	ee _p %
1.	<i>rac-5a</i>	Metanol	L-4a ester metilic	70.2
2.	<i>rac-5a</i>	Etanol	L-4a ester etilic	80.0
3.	<i>rac-5a</i>	<i>n</i> -Propanol	L-4a ester <i>n</i> -propilic	76.2
4.	<i>rac-5a</i>	<i>n</i> -Butanol	L-4a ester <i>n</i> -butilic	58.0
5.	<i>rac-5b</i>	Etanol	L-4b ester etilic	78.3
6.	<i>rac-5c</i>	Etanol	L-4c ester etilic	78.1
7.	<i>rac-5d</i>	<i>n</i> -Propanol	L-4d ester <i>n</i> -propilic	80.1

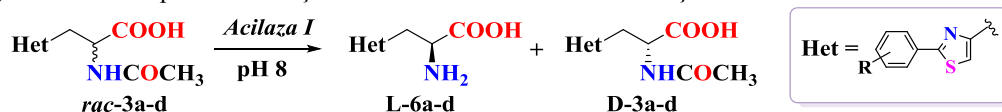
Rezoluția cinetică enzimatică la scară preparativă a oxazolonei *rac-5b-d* s-a realizat în condițiile de reacție optime stabilite în urma reacțiilor analitice, obținându-se pe această cale esterii L-2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici L-5a-d cu randamente bune (>93% și cu excese enantiomerice de 78-80% (**Tabel 6**).

Tabel 6. Randamentele și valorile ee pentru produșii rezoluției cinetice enzimatică a oxazolonei *rac-5a-d* la scara preparativă

Nr. crt.	Substrat	Produs	Randament%	ee _p %
1.	<i>rac-5a</i>	L-4a ester etilic	95	80
2.	<i>rac-5b</i>	L-4b ester etilic	96	78
3.	<i>rac-5c</i>	L-4c ester etilic	93	78
4.	<i>rac-5d</i>	L-4d ester <i>n</i> -propilic	95	80

Produșii rezoluției cinetice dinamice L-4a-d au fost hidrolizați la nivelul grupei ester în condiții de reacție slab bazice (în prezența Na₂CO₃). Enantipuritatea produșilor de hidroliză nu a fost afectată prin această transformare (verificare prin RP-HPLC, coloană Astec Chirobiotic V2). Pentru a crește excesul enantiomeric și pentru a obține produșii finali în forma enantipură, următoarea etapă a fost hidroliza enzimatică enantioselectivă la nivelul grupei amidă a N-acetil aminoacizilor L-3a-d, sub acțiunea catalitică a Acilazei I, în mediu apos.

Mai întâi, a fost investigată hidroliza enantioselectivă a N-acetil aminoacizilor în formă racemică *rac-3a-d*, sub acțiunea catalitică a Acilazei I (**Schema 6**). În toate cazurile, reacțiile enzimatică au decurs enantioselectiv, dar viteza de reacție a fost foarte mică și transformarea substratului s-a oprit la conversii de 25% după 2 săptămâni, deși s-au adăugat în rânduri repetate cantități mari de enzimă în mediul de reacție.



Schema 6. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a N-acetil-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor racemice, sub acțiunea catalitică a Acilazei I.

Atunci când produșii de rezoluție L-3a-d au fost utilizați ca substrat pentru Acilaza I, viteza de reacție și conversia au crescut considerabil, nemaifiind necesar adaosul suplimentar de enzimă. Pe această cale, s-au obținut aminoacizii tiazolici L-6a-d cu excese enantiomerice de peste 99%. (**Fig. 3**).

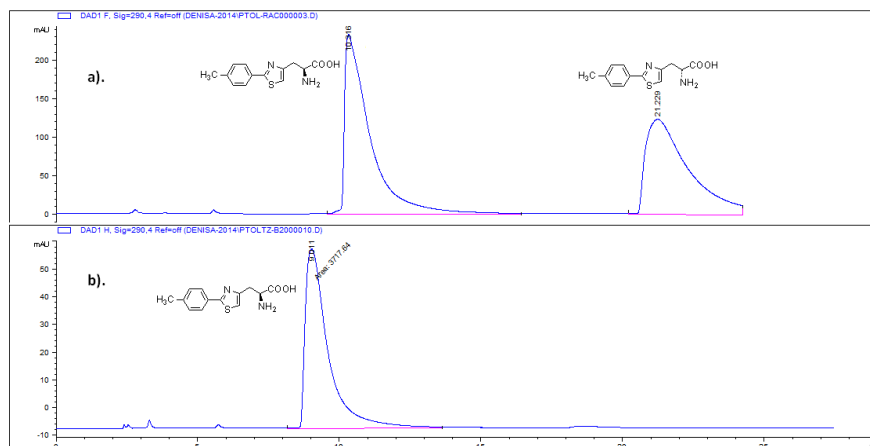


Fig. 3. a).Separarea RP-HPLC a enantiomerilor 2-*p*-toliltiazol-4-il alaninei *rac*-**6c**. Coloană Zwix(+), eluent: metanol (50mM acid formic, dietilamină 25mM):acetonitril:apă 49:49:2 v/v/v. b).Analiza RP-HPLC a aminoacidului L-**6c**, obținut prin sinteză chemoenzimatică.

L-aminoacizii tiazolici L-**6a-d** au fost purificați pe o coloană schimbătoare de cationi. Randamentele globale și rotațiile optice specifice ale produșilor sunt menționate în Tabelul 7.

Tabel 7. Randamentele globale și rotațiile specifice pentru L-2-ariltiazol-4-il alaninele L-**6a-d** obținute prin DKR a *rac*-**5a-d** catalizată de CaL-B urmată de hidroliza enantioselectivă a L-**3a-d** catalizată de Acilaza I.

Nr. crt.	Produs ^a	Randament global (%)	$[\alpha]_D^{28}$
1.	L- 6a	78	-0.20 (CH ₃ COOH, c = 5mg/mL)
2.	L- 6b	77	-0.26 (CH ₃ COOH, c = 5mg/mL)
3.	L- 6c	74	-0.27 (CH ₃ COOH, c = 5mg/mL)
4.	L- 6d	78	-0.07 (CH ₃ COOH, c = 1mg/mL)

^aee>99% în toate cazurile

Configurațiile absolute ale 2-ariltiazol-4-il-alaninelor levogire (-)-**6a-d** au fost stabilite prin compararea rotațiilor optice specifice cu datele din literatură. Deoarece datele din literatură indică faptul că acești aminoacizi tiazolici sunt levogiri în configurația absolută L⁵², s-a stabilit configurația L pentru produșii reacțiilor enzimatiche (-)-**6a-d**.

Aminoacizii 2-ariltiazolici și derivații lor au fost caracterizați spectral prin analiză spectrală ¹H RMN, ¹³C RMN și MS, exemplificate în Fig. 4-5.

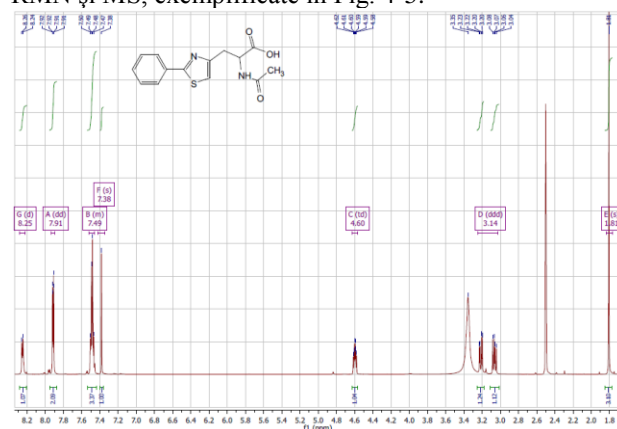


Fig. 4. Spectrul ¹H RMN al 2-feniltiazol-4-il alaninei *N*-acetilat, înregistrat în DMSO-D₆, la 600 MHz

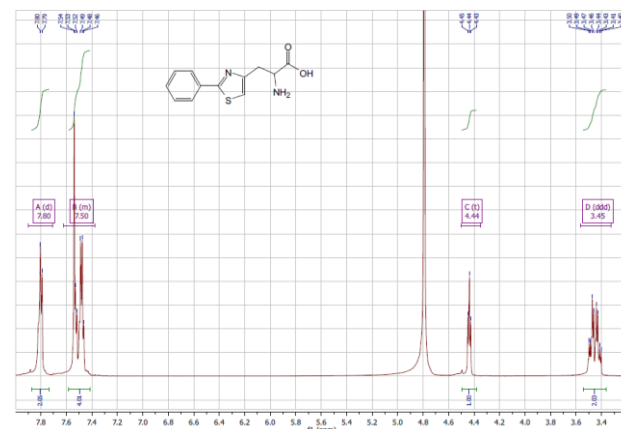


Fig.5. Spectrul ¹H RMN al 2-feniltiazol-4-il alaninei clorhidrat, înregistrat în D₂O, la 600 MHz.

Spectrele ESI⁺ MS confirmă structura aminoacizilor tiazolici și a derivaților lor. Picurile moleculare au intensitate scăzută, fiind însoțite de picuri [M+H]⁺, care în unele cazuri reprezintă picul de bază.

În concluzie a fost optimizată o metodă chemoenzimatică pentru obținerea unei serii de L-(2-ariltiazol-4-il)alanine în forma enantiopură, pornind de la *N*-acetil aminoacizii corespunzători. Primul selector chiral a fost lipaza B din *Candida antarctica*, într-un proces RCD bazat pe reacția de deschidere de ciclu stereoselectivă a oxazol-5(4*H*)onelor tiazolice în mediu organic, proces prin care s-au obținut L-aminoacizii *N*-acetilați și esterificați (ee = 78-80%), cu

randamente de 93-96%. Producții de rezoluție cinetică dinamică au fost supuși hidrolizei chimice la grupa ester în condiții slab bazice, urmată de hidroliza enantioselectivă a grupei amidă, catalizată de Acilaza I, în mediu apos. Datorită L-specificității de substrat a Acilazei I, excesul enantiomeric al produșilor finali a fost crescut la peste 99%. Metoda chemoenzimatică aplicată a fost optimizată și aplicată cu succes pentru obținerea la scară preparativă a L-(2-ariltiazol-4-il)alaninelor **12a-d** în forma enantiopură, cu randamente globale de 74-78%.

Detalii experimentale

1. Sinteza acizilor 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici rac-3a-d

21 mmoli de NaH (0.84 g de dispersie 60% în ulei mineral) se suspendă în 12 ml de dimetilformamidă uscată și se agită la temperatura camerei, în atmosferă de argon, timp de 30 min. Se adaugă acetamidomalonatul de dietil (4.34 g, 20 mmoli), iar după 30 de minute se răcește și se adaugă derivatul halogenat tiazolic **1a-d** (22 mmoli) dizolvat în dimetilformamidă uscată (5 mL). Amestecul de reacție se agită timp de 3 ore la temperatura camerei și 4 ore la 60°C. Soluția se răcește și se toarnă pe gheață. Precipitatul format se filtrează, se usucă și se suspendă într-o soluție apoasă de KOH 10% (4.5 ml). Amestecul de reacție se refluxează timp de 4 ore pentru a hidroliza grupele ester. Sfârșitul reacției de hidroliză a grupelor ester este indicat de trecerea întregii cantități de probă în soluție, sub formă de sare de potasiu solubilă în apă. Soluția rezultată se răcește și se aduce la pH 7 cu o soluție de HCl conc. Precipitatul obținut se filtrează, se usucă și se suspendă în toluen (10 ml) și se refluxează timp de 2 ore, până la decarboxilarea completă. Se observă formarea unor cristale albe de acid 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoic, care se izolează prin filtrare și se usucă.

Acid 2-acetamido-3-(2-feniltiazol-4-il)propanoic (rac-3a): Randament: 64%; solid alb; p.t. 175-176°C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆) δ 8.25 (1H, NH), 7.91 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.46 (m, 3H), 7.38 (s, 1H), 4.60 (td, *J* = 8.7, 5.0 Hz, 1H), 3.14 (ddd, *J* = 23.7, 14.6, 7.0 Hz, 2H), 1.81 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 172.99, 169.29, 166.38, 153.50, 133.11, 130.14, 129.21, 126.06, 116.24, 51.82, 32.89, 22.40; ESI-MS: 291.0800 (calculat: 291.0798, pentru C₁₄H₁₄N₂O₃S [M+H]⁺); *m/z* (%): 313 (24, [M+Na]⁺), 293 (4.5, [M+3H]⁺), 292 (15.2, [M+2H]⁺), 291 (100, [M+H]⁺), 284 (2.8), 279 (1.3), 273 (1.2).

Acid 2-acetamido-3-(2-*m*-toliltiazol-4-il)propanoic (rac-3b): Randament: 65%; solid alb; p.t. 160-161°C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆) δ 7.97 (1H, NH), 7.73 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.13 (ddd, *J* = 23.2, 14.6, 6.6 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.79 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 173.32, 168.80, 165.97, 154.70, 138.51, 133.24, 130.66, 129.08, 126.42, 123.28, 115.31, 52.99, 33.75, 22.61, 20.91; ESI⁺-MS: 305.0960 (calculat: 305.0954 pentru C₁₅H₁₆N₂O₃S [M+H]⁺); *m/z* (%): 327 (85.3, [M+Na]⁺), 307 (4.4, [M+3H]⁺), 306 (16.5, [M+2H]⁺), 305 (100, [M+H]⁺), 292 (3.0), 291 (21.2), 288 (4.2), 284 (1.7), 263 (30.4), 251 (21.8), 210 (4.8).

Acid 2-acetamido-3-(2-*p*-toliltiazol-4-il)propanoic (rac-3c): Randament: 67%; solid alb; p.t. 181-182°C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆) δ 8.17 (1H, NH), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.56 (dd, *J* = 13.2, 8.3 Hz, 1H), 3.12 (ddd, *J* = 23.6, 14.6, 6.9 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.80 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 173.03, 169.17, 166.41, 153.52, 139.88, 130.57, 129.72, 125.99, 115.50, 51.98, 33.03, 22.44, 20.93; ESI⁺-MS: 305.0967 (calculat: 305.0954, pentru C₁₅H₁₆N₂O₃S [M+H]⁺); *m/z* (%): 343 (100, [M+K]⁺), 327 (25.4, [M+Na]⁺), 307 (0.8, [M+3H]⁺), 306 (3.2, [M+2H]⁺), 305 (18.5, [M+H]⁺), 291 (0.9), 284 (1.8), 263 (1.5), 251 (1.3), 210 (0.2).

Acid 2-acetamido-3-(2-*p*-clorofeniltiazol-4-il)propanoic (rac-3d): Randament: 64%; solid alb; p.t. 199-200°C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆) δ 8.20 (1H, NH), 7.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 4.57 (dd, *J* = 11.9, 8.9 Hz, 1H), 3.13 (ddd, *J* = 23.6, 14.6, 7.0 Hz, 2H), 1.80 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 173.03, 169.29, 164.98, 153.89, 134.63, 131.98, 129.28, 127.77, 116.70, 51.99, 33.01, 22.46; ESI⁺-MS: 325.0408 (calculat: 325.0408, pentru C₁₄H₁₃ClN₂O₃S [M+H]⁺); *m/z* (%): 347 (12.5, [M+Na]⁺), 328 (11.1, [M+2H]⁺, ³⁷Cl), 327 (70.1, [M+H]⁺, ³⁷Cl), 326 (3.2, [M+2H]⁺, ³⁵Cl), 325 (21.4, [M+H]⁺, ³⁵Cl), 313 (9.5), 305 (32.6), 251 (18.7), 210 (3.7).

2. Sinteza esterilor 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici rac-4a-d

La o soluție de acid 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoic **rac-9a-d** (0.5 mmoli) și 1,1'-carbonil diimidazol (90 mg, 0.55 mmoli) în tetrahidrofuran anhidru (2 ml), se adaugă etanol (321 μL, 5.5 mmoli). Amestecul de reacție se agită la temperatura camerei, iar formarea produsului de reacție se verifică prin cromatografie pe strat subțire utilizând un amestec de diclorometan:acetonă 9:1 v/v ca eluent. După 16 ore, solventul se evaporă la sec prin distilare la vid, iar reziduuul se purifică prin cromatografie pe coloană de silicagel, utilizând un eluent format din diclorometan:acetonă 9:1 v/v. Esterii metilici, *n*-propilici și *n*-butilici s-au obținut printr-o procedură asemănătoare.

2-Acetamido-3-(2-feniltiazol-4-il)propanoat de etil (rac-4a): Randament: 64%; solid alb; p.t. 116-117°C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 7.45-7.46 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 4.91-4.94

(m, 1H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.37 (ddd, $J = 17.4, 14.4, 3.7$ Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171.32, 170.19, 168.65, 152.31, 133.18, 130.70, 129.25, 126.68, 115.93, 61.67, 52.16, 32.84, 23.42, 14.33; ESI⁺-MS: 319.1121 (calculat: 319.1111 pentru $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 357 (44.3, $[\text{M}+\text{K}]^+$), 341 (16.5, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 320 (18.8, $[\text{M}+2\text{H}]^+$), 319 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 305 (10), 277 (14).

2-Acetamido-3-(2-*m*-toliltiazol-4-il)propanoat de etil (*rac*-4b): Randament: 63%; solid galben; m.p. 81^oC; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.92 (dd, $J = 12.9, 5.2$ Hz, 1H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.32 (ddd, $J = 46.0, 14.8, 5.2$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171.40, 170.05, 168.60, 152.47, 138.88, 133.22, 131.18, 129.03, 127.12, 123.70, 115.61, 61.56, 52.12, 33.03, 23.36, 21.49, 14.27. ESI⁺-MS: 333.1270 (calculat: 333.1267 pentru $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 371 (61.0, $[\text{M}+\text{K}]^+$), 355 (36.9, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 334 (19.8, $[\text{M}+2\text{H}]^+$), 333 (100.0, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 319 (2.7), 305 (1), 291 (6.2).

2-Acetamido-3-(2-*p*-toliltiazol-4-il)propanoat de etil (*rac*-4c): Randament: 65%; solid alb; p.t. 98^oC; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 4.91 (dt, $J = 7.5, 5.1$ Hz, 1H), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.31 (ddd, $J = 50.6, 14.8, 5.0$ Hz, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171.45, 170.07, 168.56, 152.54, 140.60, 130.96, 129.81, 126.42, 115.22, 61.58, 52.15, 33.11, 23.43, 21.56, 14.31; ESI⁺-MS: 333.1265 (calculat: 333.1267 pentru $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 371 (12.1, $[\text{M}+\text{K}]^+$), 355 (47.6, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 334 (21.5, $[\text{M}+2\text{H}]^+$), 333 (100.0, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 319 (35), 305 (17.5), 291 (5), 259 (12.0), 253 (22.9), 217 (24.9).

2-Acetamido-3-(2-*p*-clorofeniltiazol-4-il)propanoat de *n*-propil (*rac*-4d): Randament: 64%; solid alb; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.94 (dt, $J = 7.7, 5.1$ Hz, 1H), 4.08 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.73 – 1.65 (m, 2H), 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171.55, 170.34, 168.02, 153.77, 148.43, 131.36, 129.35, 127.67, 115.97, 67.24, 52.07, 34.06, 23.40, 21.70, 10.46; ESI⁺-MS: 367.0879 (calculat: 367.0878 pentru $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 405 ($[\text{M}+\text{K}]^+$), 389 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 370 (6.6, $[\text{M}+2\text{H}]^+$, ^{37}Cl), 369 (37.2, $[\text{M}+\text{H}]^+$, ^{37}Cl), 368 (19.5, $[\text{M}+2\text{H}]^+$, ^{35}Cl), 367 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$, ^{35}Cl), 333 (10), 319 (1.8), 305 (1.7), 287 (1.5), 244 (1.8).

3. Sinteza 4-((2-ariltiazol-4-il)metil)-2-metiloxazol-5(4H)-onelor racemice *rac*-5a-d

La o soluție de acid 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoic *rac*-3a-d (1 mmol) în diclorometan uscat (5 ml), se adaugă în picături, sub continuă agitare și răcire, o soluție de N,N'-diclohexilcarbodiimidă (247.2 mg, 1.2 mmoli) în diclorometan uscat (2 ml). Amestecul de reacție se agită timp de o oră sub continuă răcire pe gheață. După terminarea reacției (verificată prin cromatografie pe strat subțire, eluent: diclorometan:acetona 9:1 v/v), precipitatul format de diclohexil uree se îndepărtează prin filtrare, iar solventul se evaporă prin distilare la vid. Oxazolonele tiazolice *rac*-5a-d s-au utilizat imediat în reacțiile enzimatiche.

4. Sinteza 2-ariltiazol-4-il alaninelor racemice *rac*-6a-d

50 mg de acid 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoic *rac*-3a-d se suspendă în 6 ml de soluție de HCl 18%, iar amestecul se refluxează timp de 4 ore. Solventul se îndepărtează prin distilare la presiune scăzută, rezultând 2-ariltiazol-4-il alaninele corespunzătoare *rac*-6a-d sub formă de clorhidrați. Producții de hidroliză se usucă și se purifică prin spălare cu eter etilic.

2-Feniltiazol-4-il alanina (*rac*-6a): Randament: 91%; solid alb; p.t. 241-248^oC pentru clorhidrat, respectiv p.t. de peste 300^oC cu descompunere pentru aminoacidul liber; ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.82 – 7.79 (m, 2H), 7.62 – 7.38 (m, 4H), 4.44 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.45 (ddd, $J = 22.5, 15.6, 6.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 172.4, 170.98, 170.67, 146.59, 132.00, 129.50, 126.90, 119.69, 52.24, 29.84; ESI⁺-MS: 249.0699 (calculat: 249.0692 pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 263 (100), 249 (2.9, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 203 (1.5).

2-*m*-Toliltiazol-4-il alanina (*rac*-6b): Randament: 88%; solid alb; p.t. 225-238^oC pentru clorhidrat, respectiv p.t. 227-242^oC cu descompunere pentru aminoacidul liber; ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.54 (m, 3H), 7.32 – 7.31 (m, 2H), 4.42 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.43 (ddd, $J = 35.2, 15.6, 6.7$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 173.86, 171.21, 170.58, 139.88, 133.06, 133.02, 129.42, 127.34, 123.93, 119.69, 52.13, 29.60, 20.35; ESI⁺-MS: 263.0857 (calculat: 263.0849 pentru $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 277 (100), 263 (4.6, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 217 (0.8).

2-*p*-Toliltiazol-4-il alanina (*rac*-6c): Randament: 92%; solid alb; p.t. 180-190^oC pentru clorhidrat, respectiv p.t. m.p. 280-286^oC cu descompunere pentru aminoacidul liber; ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.45 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.50 (ddd, $J = 22.8,$

16.5, 6.9 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 172.29, 170.18, 145.07, 143.56, 130.38, 127.38, 124.49, 120.25, 51.82, 28.80, 20.78; ESI⁺-MS: 263.0855 (calculat: 263.0849 pentru $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 277 (100), 263 (3.0, $[\text{M}+\text{H}]^+$), 217 (0.9).

2-*p*-Clorofeniltiazol-4-il alanina (*rac*-6d): Randament: 93%; solid alb; p.t. 250-260°C pentru clorhidrat, respectiv p.t. de peste 300°C cu descompunere pentru aminoacidul liber; ^1H NMR (600 MHz, Metanol- D_4) δ 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 4.45 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.46 (ddd, $J = 22.9, 15.5, 5.9$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Metanol- d_4) δ 170.97, 169.18, 151.97, 137.46, 133.08, 130.34, 129.08, 118.91, 53.62, 32.26; ESI⁺-MS: 283.0306 (calculat: 283.0303 pentru $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$); m/z (%): 307 (4.1, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ^{37}Cl), 305 (44.6, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ^{35}Cl), 286 (4.6, $[\text{M}+2\text{H}]^+$, ^{37}Cl), 285 (36.4, $[\text{M}+\text{H}]^+$, ^{37}Cl), 284 (12.9, $[\text{M}+2\text{H}]^+$, ^{35}Cl), 283 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$, ^{35}Cl), 277 (47.6), 263 (6.6), 256 (4.3).

5. Screeningul de lipaze pentru deschiderea de ciclu enzimatică a oxazol-5(4H)-onei *rac*-11a

La o soluție de 4-((2-feniltiazol-4-il)metil)2-metiloxazol-5(4H)-onă *rac*-11a (6 mg) dizolvată în diverși alcoolii alifatici (metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-butanol) (0.6 ml), se adaugă diverse lipaze (20 mg). Amestecul de reacție se agită la 1200 rpm la temperatura camerei timp de 4.5 ore. 20 μL din amestecul de reacție se diluează la 1000 μL cu un amestec de *n*-hexan și 2-propanol (4 :1 v/v), se filtrează și se analizează prin HPLC utilizând o coloană Chiralpak IC și un amestec de *n*-hexan și 2-propanol 80:20 v/v ca eluent.

6. Screeningul de alcoolii și de solvenți pentru RCD a oxazol-5(4H)-onelor *rac*-5a-d, catalizată de CaL-B

La o soluție de 4-((2-feniltiazol-4-il)metil)2-metiloxazol-5(4H)-onă *rac*-5a (10 mg) dizolvată în diverși solvenți anhidri (600 μL de 1,4-dioxan, diclorometan, toluen, acetonitril, tetrahidrofuran, detileter), se adaugă CaL-B (10 mg) și etanol (3 echiv.). Reacțiile enzimatică s-au investigat de două ori în paralel, cu și fără adăugarea catalizatorului de racemizare (6 mg de *N,N*-dietilaminoetanol imobilizat pe nanotuburi de carbon). Reacțiile enzimatică în acetonitril s-au desfășurat în prezența a 3 echiv. Din următorii alcoolii : metanol, etanol, *n*-propanol și *n*-butanol. Amestecurile de reacție se agită la 1200 rpm la temperatura camerei. Reacțiile se monitorizează prin analiză HPLC. 50 μL din amestecul de reacție se diluează la 1000 μL cu un amestec de *n*-hexan și 2-propanol (4 :1 v/v), se filtrează și se analizează prin HPLC prin aceeași metodă descrisă anterior. RCD enzimatică a oxazolonei *rac*-5b-d s-a investigat printr-o procedură similară, în prezența catalizatorului de racemizare.

7. Hidroliza enzimatică enantioselectivă a acizilor 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il) propanoici *rac*-3a-d

Aminoacizii *N*-acetilați *rac*-3a-d (50 mg) se suspendă în apă demineralizată (6 mL), iar pH-ul se ajustează la valoarea 8, prin adăugarea unei soluții de LiOH 1.25 M. Se adaugă o cantitate catalitică de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și Acilază I (20 mg). Amestecul de reacție se agită la 37°C, menținând pH-ul la valoarea 8, prin adăugare de soluție de LiOH. Reacțiile enzimatică se monitorizează prin CSS pe silicagel, utilizând un amestec de *n*-butanol: acid acetic: apă 3:1:1 (v/v/v). Pentru analiza chirală RP-HPLC, 100 μL de probă din amestecul de reacție se diluează cu o soluție tampon TRIS (pH 8), se încălzește pe baie de apă în prezență de cărbune active timp de 20 minute, apoi se răcește și se filtrează înainte de injectarea HPLC. Analiza chirală RP-HPLC s-a realizat utilizând coloana Zwick(+), iar ca eluent un amestec de metanol (cu adaos de acid formic 50mM, dietilamină 25mM): acetonitril: apă 49:49:2 (v/v/v).

8. Sinteza chemoenzimatică la scară preparativă a L-2-ariltiazol-4-il alaninelor L-6a-d

La o soluție de acid 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoic *rac*-3a-d (5 mmoli) în diclorometan uscat (20 mL), se adaugă treptat, sub agitare la 0°C, o soluție de *N,N'*-diclohexilcarbodiimidă (1.24 g, 6 mmoli) dizolvată în diclorometan uscat (8 mL). Amestecul de reacție se agită timp de 1 oră la 0°C. După terminarea reacției (verificată prin CSS, eluent diclorometan:acetonă 9:1 v/v), precipitatul format de diclohexiluree se îndepărtează prin filtrare, iar filtratul se duce la sec prin evaporarea solventului la presiune scăzută. Oxazol-5(4H)-onele *rac*-5a-d se dizolvă în acetonitril anhidru (85 mL). La soluția obținută, se adaugă CaL-B (1.4 g), catalizatorul de racemizare *N,N*-dietilaminoetanol imobilizat pe nanotuburi de carbon (860 mg) și etanol (3 echiv, 15 mmoli, 875 μL) în cazul *rac*-5a-c, respectiv *n*-propanol (3 echiv, 15 mmoli, 1120 μL) în cazul *rac*-5d. Amestecul de reacție se agită la temperatura camerei, la 1200 rpm și se monitorizează prin analiză HPLC chirală. După terminarea reacției de alcooliză a *rac*-5a-d, enzima și catalizatorul se îndepărtează prin filtrare și se spală de trei ori cu acetonitril și cloroform, pentru a recupera cantitativ produșii de reacție. Solventul este îndepărtat prin evaporare la presiune scăzută, iar produsul se purifică prin cromatografie pe colană, utilizând un amestec de diclorometan: acetonă 9:1 (v/v) ca eluent.

Esterii 2-acetamido-3-(2-ariltiazol-4-il)propanoici L-4a-d obținuți se tratează cu o soluție de carbonat de sodiu (0.53 g, 5 mmoli) în apă (10 mL). Amestecul de reacție se refluxează timp de 2 ore. După expirarea timpului

de reacție, amestecul se acidulează cu HCl concentrat (pH 3), iar apa se evaporă la presiune scăzută. Solidul obținut se dizolvă în apă (8 mL) iar pH-ul se ajustează la 8 cu o soluție de LiOH 1.25 M. Apoi, se adaugă Acilaza I și o cantitate catalitică de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, iar amestecul de reacție se agită la 37°C, menținând pH-ul în intervalul 7-8 prin adăugarea de LiOH 1.25 M. Mersul reacției se monitorizează prin RP-HPLC. După terminarea reacției de hidroliză (2 zile), amestecul de reacție se tratează cu acid fosforic (pH 1.5), iar enzima se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantul se trece printr-o coloană schimbătoare de cationi, de tip DOWEX 50X8. Aminoacizii tiazolici sunt eluați cu o soluție de NH_4OH 2M. Frațiunile apoase ce conțin produșii L-6a-d se reunesc și se concentrează, iar pH-ul se ajustează la 3 cu acid acetic. În cazul în care se formează un precipitat, acesta se îndepărtează prin filtrare, iar filtratul se trece pe coloana schimbătoare de cationi DOWEX 50X8, utilizând ca eluent o soluție de HCl 4%, apă demineralizată, apoi o soluție de NH_4OH 2M, în această ordine. Frațiunile apoase ce conțin aminoacizii tiazolici L-6a-d se reunesc, iar solventul se îndepărtează prin distilare la vid, rezultând produșii L-6a-d în forma enantiopură.

9. Imobilizarea N,N-dietilaminoetanolului pe nanotuburi de carbon (SWCNT)

1 g de nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupe carboxil se suspendă în diclorometan uscat (12 mL) și se tratează cu 1,1'-carbonildiimidazol (120 mg). Amestecul de reacție se menține la ultrasunete timp de 5 minute, apoi se agită timp de 8 ore la 1300 rpm. Suspensia se filtrează la presiune scăzută iar precipitatul se spală cu diclorometan uscat. Produsul obținut se tratează cu glicerol diglicidil eter (2 mL), se suspendă în diclorometan anhidru (12 mL) și se agită timp de 24 h. Amestecul se filtrează la presiune scăzută, iar precipitatul se spală cu diclorometan uscat, apoi se resuspendă în diclorometan uscat și se tratează cu N,N-dietilaminoetanol (4 mL de diclorometan uscat și 400 μL de N,N-dietilaminoetanol pentru 300 mg de SWCNT derivatizat). Amestecul de reacție se agită timp de 24 h și se filtrează. Precipitatul obținut se spală pe filtru cu diclorometan uscat, se usucă și se utilizează în procesul de rezoluție cinetică dinamică enzimatică.

Literatura selectivă

1. Pollegioni L, Servi S, Eds. Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols, Series: *Methods in Molecular Biology*, **2012**, Vol. 794, XIV, Springer Protocols;
2. Perdih A, Dolenc MS. Recent advances in the synthesis of unnatural amino acids. *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 801–832.
3. Gillespie L, Oates JA, Crout JR, Sjoerdsma A. Clinical and Chemical Studies with α -Methyl-Dopa in Patients with Hypertension. *Circulation* 1962, 25, 281–291.
4. Letassy NA, Thompson DF, Britton ML, Suda RR. Sr. Nafarelin Acetate: a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist for the Treatment of Endometriosis. *DICP: the annals of pharmacotherapy* **1990**, 24, 1204-1209.
5. Peng-Li S, Si-Liang F, Ke-Liang L, Solid-phase synthesis of new cyclic melanotropin analogs. *Zhongguo Xinyao Zazhi* **2009**, 18, 159-162.
6. Hapău D, Rémond E, René A, M'Kadmi C, Martinez J, Cavelier F, Zaharia V. Stereoselective synthesis of N-Boc-L-(2-arylthiazol-4-yl)alanines and their integration into new neurotensin peptide analogues, Congresul Național al Farmaciștilor din România, 24-27 sept. 2014, Iași, Volum de rezumate, Ed. "Gr. T. Popa", pag. 9.
7. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **2001**; 409: 258-268.

Prof. Dr. Ing. Florin Dan IRIMIE