

Otrzymywanie chiralnych pochodnych fosfonianów metodami biokatalitycznymi

Duża aktywność biologiczna związków fosforoorganicznych to główny powód ogromnego zainteresowania fosfonowymi analogami strukturalnymi aminokwasów, które mogą być rozpatrywane jako mimetyki w reakcjach enzymatycznych. Podstawowym celem przeprowadzanych badań było wykorzystanie biokatalizy jako narzędzia syntezy, co obecnie stanowi dynamicznie rozwijającą się dziedzinę nauki, łączącą jednocześnie zalety mikrobiologii, biochemii oraz chemii bioorganicznej. Stosowana nie tylko na skalę laboratoryjną, ale również przemysłową technika biotransformacji zyskała w ostatnich latach szczególnie na znaczeniu ze względu na większe zainteresowanie właściwościami całokomórkowych biokatalizatorów. Są one selektywne względem danego substratu, jak również łatwe w hodowli i biodegradowalne, dlatego tak chętnie są stosowane szczególnie do prowadzenia reakcji stereoselektywnych, których produktami są chiralne związki.

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań, których głównym celem było określenie aktywności grzybów, jako biokatalizatorów w reakcjach otrzymywania chiralnych związków fosforoorganicznych. Eksperymenty rozpoczęto od prowadzenia procesów w skali laboratoryjnej z wolnym mycelium grzybów. Wytypowano następujące kwasy α -aminofosfonowe, jako substraty: kwas 1-amino-2-metylopropanofosfonowy **21**, kwas 1-aminofenylometanofosfonowy **22**, kwas 1-amino-2-metylobutanofosfonowy **59** oraz kwas 1-amino-2-metylopirydynofosfonowy **63**. Były one przekształcane podczas biotransformacji i dla tych związków zbadano oraz zdefiniowano przebieg procesu biokonwersji poprzez identyfikację powstałych produktów końcowych i pośrednich. Dla biotransformacji alifatycznych α -aminofosfonianów: kwasu 1-amino-2-metylopropanofosfonowego **21**, kwasu 1-amino-2-metylobutanofosfonowego **59** oraz aromatycznego kwasu 1-amino-2-metylopirydynofosfonowego **63** wytypowano mycelium *Penicillium funiculosum*, jako najlepszy biokatalizator, który w pierwszym kroku katalizował proces oksydatywnej deaminacji odpowiedniego fosfonowego analogu strukturalnego aminofosfonianu do prochiralnego ketofosfonianu, a następnie w ramach reakcji bioredukcji prowadził do otrzymania kwasu α -hydroksyfosfonowego. Pozwoliło to ostatecznie otrzymać za sprawą aktywności wspomnianego szczepu *P. funiculosum* mieszaniny racemiczne produktów końcowych – kwasu 1-hydroksy-2-metylopropanofosfonowego **73**, kwasu 1-hydroksy-2-metylobutanofosfonowego **74** oraz kwasu 1-hydroksy-2-metylopirydynofosfonowego **78**. W

ramach przeprowadzonych badań otrzymano także pojedynczy enancjomer nie przereagowanego aminofosfonianu- kwasu *R*-1-amino-2-metylopropanofosfonowego **21** (100% *e.e.*).

Analogiczny schemat procesu biokonwersji zaobserwowano dla kwasu 1-aminofenylometanofosfonowego **22**, jednak w tym przypadku kluczowym mikroorganizmem był szczep *F. oxysporum* (UW1). Kaskadowy proces selektywnego utleniania i następnie niestereoselektywnej redukcji produktu pośredniego α - ketokwasu prowadzi do otrzymania racemicznej mieszaniny kwasu 1-hydroksyfenylometanofosfonowego **75** oraz pozostania w mieszaninie poreakcyjnej nieprzereagowanego enancjomeru substratu *S*- **22** (100% *e.e.*).

Kolejne badania dotyczyły enancjokonwergentnej hydrolizy mieszaniny racemicznej *O,O*-dimetylo-4-oksoazetidyn-2-ylofosfonianu **69** do *O*-metylo-4-oksoazetidyn-2-ylofosfonianu **86** ze 100% *e.e.*. Zastosowanie całokomórkowej hodowli *P. minioluteum* prowadziło do 30% stopnia przereagowania mieszaniny racemicznej substratu **69** i otrzymania czystego optycznie *O*-metylo-4-oksoazetidyn-2-ylofosfonianu **86**. W procesie z całokomórkowym biokatalizatorem związek **86** był przekształcany dalej, co prowadziło do racemizacji podczas hydrolizy wiązania amidowego. Dlatego, w przypadku tego substratu wykonano też badania z wykorzystaniem enzymów hydrolitycznych. Zastosowanie peniciliny z *Enterobacter cloacae* podnosiło nieznacznie stopień przereagowania substratu **69** (35%) oraz prowadziło do otrzymania jednego produktu- czystego optycznie *O*-metylo-4-oksoazetidyn-2-ylofosfonianu **86** (100% *e.e.*). W tym przypadku nie zachodziła hydroliza wiązania amidowego w pierścieniu ani racemizacja.

Przeprowadzono także badania z wykorzystaniem immobilizowanych biokatalizatorów na piankach poliuretanowych, aby zwiększyć skalę procesu i także po to by zwiększyć ilość pozyskiwanych produktów do celów analitycznych. Te eksperymenty doprowadziły w przypadku kwasu 1-amino-2-metylopirydynofosfonowego **63** do bardzo ciekawego wyniku- innego niż to opisano powyżej dla skali laboratoryjnej i wolnych komórek. Otóż, zastosowanie immobilizowanego na piankach biokatalizatora (*P. funiculosum*) w procesie ciągłym doprowadziło do otrzymania optycznie czystego produktu- kwasu *S*-1-amino-2-metylopirydynofosfonowego **63** (100% *e.e.*). Ten proces także należy do typu reakcji enancjokonwergentnych- z mieszaniny racemicznej pozyskuje się czysty optycznie produkt. By skutecznie i precyzyjnie analizować wyniki badań, konieczne było opracowanie metody izolacji wartościowych produktów biokonwersji, by zidentyfikować struktury i potwierdzić postulowaną hipotezę kaskadowego przebiegu procesu biotransformacji aminofosfonianów.

Dodatkowo dobrano warunki określania nadmiarów enancjomerycznych dla wszystkich związków, co pozwoliło na sprawdzanie także postępu reakcji w realnym czasie – wykorzystano technikę spektroskopii ^{31}P NMR z dodatkiem α -cyklodekstryny jako chiralnego odczynnika solwującego.