

Tổng hợp chọn lọc lập thể tubuphenylalanine axit (Tup) của tubulysin

Lê Văn Hải¹, Trần Tuấn Anh², Trần Văn Lộc³, Trần Văn Chiến^{3*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 15-6-2017; Chấp nhận đăng 26-6-2017

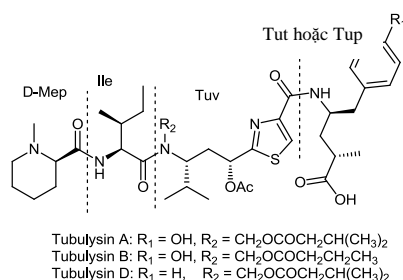
Abstract

A highly stereoselective synthesis of tubuphenylalanine fragment (9) of tubulysin is described with the key step of Wittig condensation reaction and stereoselective hydrogenation of double bond. The desired product was confirmed by 1D and 2D-NMR spectroscopies.

Keywords. Wittig reaction, triethyl-2-phosphonopropionate, phenylalanine.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tubulysin là nhóm các tetrapeptide thiên nhiên (hình 1), được Höfle và Reichenbach phân lập từ nấm khuẩn (myxobacteria) *Archangium gephyra* và *Angiococcus disciformis* [1]. Tubulysin thu hút được rất nhiều sự quan tâm từ các nhà hóa học do các hoạt tính sinh học lý thú của chúng. Các nghiên cứu cho thấy tubulysin thể hiện hoạt tính ức chế quá trình phân bào vượt trội hơn so với các hợp chất thiên nhiên đã được biết đến. So với các chất như: epothilone, vinblastine và taxol, tubulysin thể hiện được hoạt tính độc tế bào mạnh hơn gấp 20 đến 100 lần [2, 3]. Các nghiên cứu chứng minh tubulysin ức chế quá trình polyme hóa các tubulin, dẫn đến sự chết của tế bào [4]. Do đó, tubulysin được xem là đối tượng nghiên cứu đầy hứa hẹn cho việc nghiên cứu và phát triển thuốc chống ung thư mới. Về mặt cấu trúc, tubulysin là peptide mạch thẳng chứa các đơn vị amino axit hiếm gặp như N-metyl-D-pipecolic axit (D-Mep), L-isoleucine (Ile), tubuvaline (Tuv) và tubuphenylalanine (Tup).



Hình 1: Một số cấu trúc của tubulysin

Nghiên cứu tổng hợp về amino axit Tup và Tuv gặp rất nhiều khó khăn do có các trung tâm bất đối trong phân tử, khó phân lập bằng sắc ký cột để thu được sản phẩm là đồng phân quang học mong muốn. Trong bài báo này chúng tôi tiến hành tổng hợp amino acid Tup qua các bước phản ứng ngưng tụ Wittig, tạo este với ancol bất đối menthol rồi tách sản phẩm bằng cột sắc ký silica gel thường. Sản phẩm thu được có độ chọn lọc lập thể cao.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Các tác nhân phản ứng được mua từ hãng Aldrich-Sigma. Dung môi chạy cột được cất trước khi sử dụng. Sắc ký lớp mỏng (SKLM) sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silicagel 60GF₂₅₄. Sắc ký cột sử dụng chất hấp phụ là silica gel Merck cỡ hạt 0,040-0,063 mm. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H- và ¹³C-NMR đo trên máy Bruker Avance-500 MHz, chất nội chuẩn là TMS cho ¹H- và tín hiệu dung môi cho ¹³C-NMR. Hằng số tương tác (*J*) được biểu diễn bằng Hz.

2.2. Quy trình tổng hợp

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-phenylalanine methyl este (2)

Hỗn hợp phản ứng gồm *L*-phenylalanine methyl este hydroclorit (500 mg, 2,3 mmol) và NaHCO₃ (385 mg, 4,6 mmol) trong hỗn hợp dung môi THF/H₂O (1/4) được thêm dung dịch Boc₂O (600 mg, 2,75

mmol) trong THF (4 mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng khoảng 18 giờ rồi được chiết với EtOAc (2x50 mL). Dịch chiết được làm khan với Na₂SO₄ và dung môi được cất loại dưới áp suất giảm thu được sản phẩm **2** (600 mg, 94 %), là chất lỏng không màu. *R_f* = 0,47 (hexan/EtOAc; 4/1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,31-7,22 (m, 3H), 7,12 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,98 (brs, 1H), 4,59 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,13-3,02 (m, 2H), 1,41 (s, 9H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 172,3; 155,0; 136,0; 129,2; 128,5; 127,0; 79,9; 54,4; 52,1; 38,3; 28,3.

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-phenylalaninol (3)**

Metyl este **2** (250 mg, 0,89 mmol) trong MeOH (10 mL) được thêm NaBH₄ (135 mg, 3,56 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng 18 giờ. Dung môi được quay cất đến khô và sản phẩm rắn được thêm H₂O và axit hóa với HCl (5 %) ở 0-5 °C. Sản phẩm rắn màu trắng tạo thành được lọc, rửa và sấy khô thu được sản phẩm *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-L-phenylalaninol **3** (215 mg, 96 %). *R_f* = 0,26 (Hexane/EtOAc; 2/1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,31 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,22 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 4,78 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 3,86 (brs, 1H), 3,65 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 3,54 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 2,83 (d, *J* = 14,5 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H).

(*S*)-*tert*-Butyl(1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-caccamat (4)

Dung dịch huyền phù *N*-(*tert*-butyloxy-carbonyl)-L-phenylalaninol (200 mg, 0,8 mmol) và IBX (672 mg, 2,4 mmol) trong EtOAc được đun hồi lưu 5 giờ. Phản ứng được đưa về nhiệt độ phòng và chất rắn không tan được lọc bỏ. Dịch lọc được quay cất đến khô thu được sản phẩm **4** (187 mg, 94 %), là chất lỏng màu vàng nhạt. *R_f* = 0,32 (hexan/EtOAc; 4/1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9,64 (s, 1H), 7,37-7,28 (m, 3H), 7,20-7,17 (m, 2H), 5,04 (s, 1H), 4,44 (d, *J* = 7 Hz, 1H), 3,13 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H).

(*S,E*)-Etyl-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-methyl-5-phenylpent-2-enoate (5)

Aldehit **4** (250 mg, 1 mmol) trong DCM (10 mL) ở 0 °C được thêm NaH (36 mg, 1,5 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 0 °C thêm 1 giờ và dung dịch trietyl-2-phosphonopropionat (375 mg, 1,5 mmol) trong DCM (4 mL) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng thêm 12 giờ và dung môi được quay cất dưới áp suất giảm. Sản phẩm sạch **5** (250 mg, 75 %), là chất rắn màu trắng, thu được qua sắc ký cột silica gel (hexan/EtOAc; 6/4). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,28 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,17 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 6,51 (dd, *J* =

1 Hz, 9 Hz, 1H), 4,65 (brs, 1H), 4,59 (brs, 1H), 4,20 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 2,90 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 2,78 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,28 (t, *J* = 7 Hz, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 167,8; 154,9; 136,7; 129,5; 128,8; 126,9; 60,7; 41,2; 28,3, 14,2.

(*S,E*)-4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-2-methyl-5-phenylpent-2-enoic axit (6)

Este **5** (150 mg, 0,45mmol) trong THF/H₂O (2/1; 5 mL) được xử lý với LiOH (43 mg, 1,8 mmol), Hỗn hợp phản ứng khuấy ở nhiệt độ phòng 20 giờ và dung môi được quay cất đến khô. Sản phẩm hòa tan trong nước và axit hóa với HCl (5 %). Kết tủa tạo thành được lọc, rửa với H₂O và sấy khô thu được sản phẩm axit **6** (110 mg, 80 %) là chất rắn màu trắng. *R_f* = 0,18 (hexan/EtOAc; 2/3). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,28 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,22 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H), 6,64 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 4,65 (brs, 1H), 2,93 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 2,78 (dd, *J* = 3 Hz, 11 Hz, 1H), 1,68 (s, 3H), 1,41 (s, 9H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 172,6; 142,6; 136,6; 129,5; 126,8; 41,1; 28,3; 12,3.

(*S,E*)-(1*R*,2*S*,5*R*)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexyl - 4-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-2-methyl-5-phenylpent-2-enoate (7)

Hỗn hợp phản ứng gồm dicyclohexylcarbodiimide DCC (253 mg, 1,23 mmol), axit **6** (250 mg, 0,82 mmol), menthol (153 mg, 0,98 mmol) và DMAP (2 mg, 0,01 mmol) trong DCM (6 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng 16 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, kết tủa trắng tạo thành được lọc bỏ. Dịch lọc được quay cất dưới áp suất thấp và sản phẩm thô được tinh chế trên cột silica gel (hexan/EtOAc: 5/1) thu được sản phẩm este **7** (302 mg, 83 %), là chất lỏng không màu. *R_f* = 0,28 (hexan/EtOAc; 5/1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,33-7,25 (m, 3H), 7,19-7,16 (m, 2H), 6,49 (dd, *J* = 9, 0,9 Hz, 1H), 4,77-4,51 (m, 3H), 3,01-2,90 (m, 1H), 2,89-2,77 (m, 1H), 2,07-2,01 (m, 1H), 1,93-1,83 (m, *J* = 2,5 Hz, 1H), 1,74-1,69 (m, 5H), 1,44-1,40 (m, 11H), 1,34-1,29 (m, 1H), 1,12 (m, 2H), 0,95-0,89 (m, 8H), 0,79 (d, *J* = 7 Hz, 3H).

(2*S*,4*R*)-(1*R*,2*S*,5*R*)-2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexyl-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-methyl-5-phenyl-pentanoat (8)

Alken **7** (200 mg, 0,45 mmol) và Pd/C (10 mg, 5 % wt) trong hỗn hợp dung môi EtOAc/MeOH (2/1; 12 mL) được khuấy dưới áp suất khí quyển H₂ trong thời gian 48 giờ. Hỗn hợp phản ứng được lọc loại bỏ Pd/C. Dung môi được quay cất dưới áp suất giảm, sản phẩm thô được tinh chế trên cột silica gel (hexan/EtOAc; 85/15) thu được sản phẩm chính **8**

(160 mg, 80 %), là chất rắn màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,22 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,17 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 4,66 (td, $J = 11, 4,5$ Hz, 1H), 4,34 (brs, 1H), 3,87 (brs, 1H), 2,77 (m, 2H), 2,55 (m, 1H), 2,02 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 1,85 (m, 2H), 1,69-1,65 (m, 2H), 1,49-1,46 (m, 13H), 1,28 (s, 3H), 1,15 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,12-1,02 (m, 2H), 0,98-0,84 (m, 9H), 0,77 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 175,6; 142,6; 137,9; 129,6; 128,3; 126,3; 74,1; 47,1; 40,8; 36,7; 34,33; 31,4; 29,7; 28,4; 26,2; 23,3; 22,0; 20,8; 16,2.

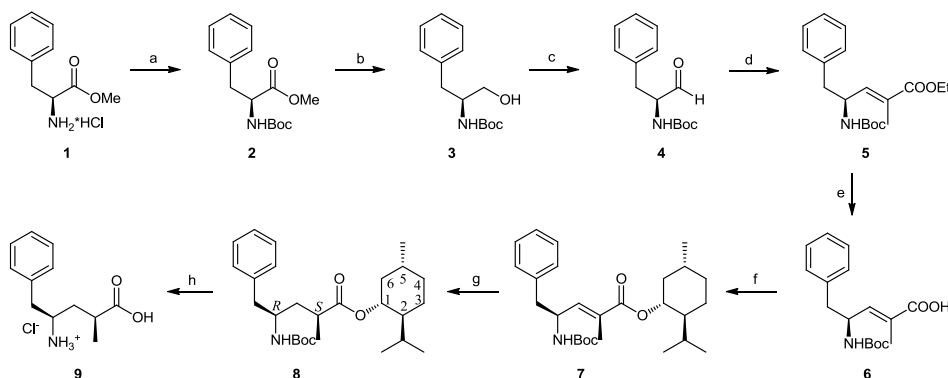
(2*S*,4*R*)-4-Amino-2-metyl-5-phenylpentanoic acid hydrochlorit (**9**)

Este **8** (200 mg, 0,45 mmol) trong hỗn hợp 5N HCl (2 mL) và AcOH (0,5 mL) được đun ở nhiệt độ 110 °C trong thời gian 2 giờ. Hỗn hợp phản ứng được pha loãng với H_2O và chiết với Et_2O . Dịch nước được cô quay đến khô thu được sản phẩm muối rắn **9** (107 mg, 98 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ ppm 7,38-7,24 (m, 5 H), 3,54 (qt, $J = 7$ Hz, 1H), 2,98 (dd, $J = 14, 6,5$ Hz, 1H), 2,85 (dd, $J = 14, 7,5$ Hz, 1H), 2,61 (app sxt, $J = 7,0$ Hz, 1H), 1,96 (ddd, $J = 15,0, 8,5, 6,0$ Hz,

1H), 1,71-1,62 (m, 1H), 1,11 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phản ứng tổng hợp tubuphenylalanine axit (Tup) sử dụng L-phenylalanine metyl este hydroclorit **1** làm nguyên liệu đầu. Nhóm chức amino trước hết được bảo vệ với Boc bằng phản ứng với $\text{Boc}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ trong THF thu được sản phẩm *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-L-phenylalanine metyl este **2** [5]. Este **2** được chuyển hóa thành andehit **4** qua hai bước phản ứng liên tục. Phản ứng khử hóa **2** với NaBH_4 trong MeOH ở nhiệt độ phòng trong thời gian 18 giờ thu được hợp chất *N*-Boc-phenylalaninol **3** (96 %) [6]. Sự chuyển hóa nhóm hydroxy thành aldehyt sử dụng tác nhân oxi hóa Dess–Martin periodinane (DMP) dưới điều kiện hồi lưu trong các dung môi hữu cơ (DCM, EtOAc) hoặc DMSO ở nhiệt độ phòng; hoặc sử dụng tác nhân oxi hóa 2-iodoxybenzoic axit (IBX) trong DCM hoặc EtOAc hồi lưu [7]. Kết quả cho thấy phản ứng sử dụng IBX cho hiệu suất cao nhất (94 %) và sản phẩm andehit được dùng cho phản ứng tiếp theo mà không cần tinh chế qua cột sắc ký.



Sơ đồ 1: Các tác nhân và điều kiện phản ứng: (a) Boc_2O , NaHCO_3 , THF, rt, 16 h, 94 %. (b) NaBH_4 , MeOH, rt, 18 giờ, 96 %. (c) IBX, EtOAc, reflux, 4 giờ, 94 %. (d) NaH, trietyl-2-phosphonopropionat, THF, rt, 14 giờ, 75 %. (e) LiOH, THF, rt, 80 %. (f) DCC, DMAP, menthol, DCM, rt, 18 giờ, 83 %. (g) $\text{H}_2/\text{Pd/C}$, EtOAc/MeOH (2/1), 80 %. (h) HCl/AcOH, 110 °C, 2 giờ, 98 %

Sự ngưng tụ của andehyt **4** với trietyl-2-phosphonopropionat theo điều kiện phản ứng Horner-Wadsworth-Emmons với sự có mặt của NaH trong dung môi THF ở nhiệt độ từ 0-25 °C trong thời gian 14 giờ. Phản ứng đạt hiệu suất 75 %. Bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (NOESY), sản phẩm ngưng tụ etyl-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-metyl-5-phenylpent-2-enoate **5** (75 %) được khẳng định là ưu tiên với cấu hình *E* (tỷ lệ *E/Z* \approx 92/8; dựa vào sắc ký cột và phổ $^1\text{H-NMR}$). Đối với các quy trình tổng hợp tubuphenylalanin axit (Tup), một trong những khó khăn nhất thường gặp phải là sự phân tách các đồng

phân quang học không đối quang (*R,S*) khỏi đồng phân (*R,R*). Để thu sản phẩm Tup có độ sạch quang học cao, chất **5** được hydro hóa với xúc tác Pd/C (5 %wt) trong dung môi EtOAc/MeOH (2/1) ở nhiệt độ phòng 48 giờ. Các sản phẩm đồng phân thu được không thể tách được bằng sắc ký cột thường. Do đó, hợp chất no hóa được thủy phân nhóm etyl tạo axit trung gian và được phản ứng este hóa với menthol trong DCC/DMAP. Sản phẩm este hóa sau khi tinh chế trên cột silica gel đạt hiệu suất 68 %, tỷ lệ giữa các đồng phân là 2/1 (dựa trên khối lượng sản phẩm thu được). Theo hướng phản ứng khác, este **5** trước hết được xử lý với LiOH trong THF/ H_2O ở nhiệt độ

phòng 36 giờ thu được sản phẩm **6** (80 %). Sau đó, chất **6** được phản ứng với menthol và DMAP/DCC. Sản phẩm este **7** (83 %) được hydro hóa với xúc tác Pd/C (5 %wt) ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Sau khi tinh chế trên cột silica gel (hexan/EtOAc: 85/15), tổng sản phẩm thu được đạt hiệu suất 80 %, trong đó đồng phân mong muốn **8** (*S,R*) chiếm 75 % (tỷ lệ 3/1). Hợp chất **8** được xử lý với hỗn hợp của axit HCl/AcOH ở nhiệt độ 110 °C trong 2 giờ thu được sản phẩm **9** (98 %).

4. KẾT LUẬN

Đã tiến hành nghiên cứu tổng hợp tubuphenylalanin axit (Tup), một amino axit trong phân tử tubulysin với độ chọn lọc lập thể cao. Axit thu được sẽ phục vụ cho sự gắn kết với các amino axit khác để tạo thành các sản phẩm tubulysin khác nhau.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 104.01-2015.47.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sasse F., Steinmetz H., Höfle G., Reichenbach H. *Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli, Production, isolation, physico-*

chemical and biological properties, J. Antibiot, **53**, 879-885 (2000).

- Steinmetz H., Glaser N., Herdtweck E., Sasse F., Reichenbach H., Höfle G. *Isolation, Crystal and Solution Structure Determination; and Biosynthesis of Tubulysins-Powerful Inhibitors of Tubulin Polymerization from Myxobacteria*, Angew. Chem. **116**, 4996-5000 (2004).
- Höfle G., Glaser N., Leibold T., Karama U., Sasse F., Steinmetz H. *Semisynthesis and degradation of the tubulin inhibitors epothilone and tubulysin*, Pure Appl. Chem. **75**, 167-178 (2003).
- Khalil M. W., Sasse F., Luensdorf H., Elnakady Y. A. Reichenbach H. *Mechanism of Action of Tubulysin; an Antimitotic Peptide from Myxobacteria*. ChemBioChem., **7**, 678-683 (2006).
- Tokumaru E., Tengeiji A., Nakahara T., Shiina I. *Nonenzymatic; Enantioconvergent Dynamic Kinetic Resolution (DKR) of Racemic 2-(1H-Pyrrol-1-yl)alkanoic Acids as α -Amino Acid Equivalents*. Chem. Lett., **44**, 1768-1770 (2015).
- Shie J. -J., Fang J. -M., Kuo T. -H., Kuo C. -J., Liang P. -H., Huang H. -J., Wu Y. -T., Jan J. -T., Cheng Y.-S. E., Wong C. -H. *Inhibition of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease by peptidomimetic α ; β -unsaturated esters*. Bioorg. Med. Chem., **13**, 5240-5252 (2005).
- Karthikeyan G., Perumal P. T. *An Ionic Liquid Mediated Efficient Oxidation of Alcohols Using *o*-Iodoxy-benzoic Acid (IBX)-a Simple and Eco-friendly Protocol*. Synlett., **14**, 2249-2251 (2003).

Liên hệ: **Trần Văn Chiến**

Viện Hóa học

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: tvchien2015@gmail.com; Điện thoại: (84)-4-37914131.