

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Gyógyszerkémia, gyógyszerkutatás PhD program

Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Gyógyszerkémiai Intézet

Témavezetők: Prof. Dr. Forró Enikő

Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Galla Zsolt

**Gyógyászati szempontból jelentős enantiomerek előállítása lipáz
katalizált acilezéssel és hidrolízissel**

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Dr. Lázár László

Tagok: Dr. Tóth Géza

Dr. Dombi György

Bírálnői bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Hohmann Judit

Opponensek: Prof. Dr. Poppe László

Dr. Tömböly Csaba

Tagok: Dr. Szöllősi György

Dr. Doró Péter

1. Előzmények és célkitűzések

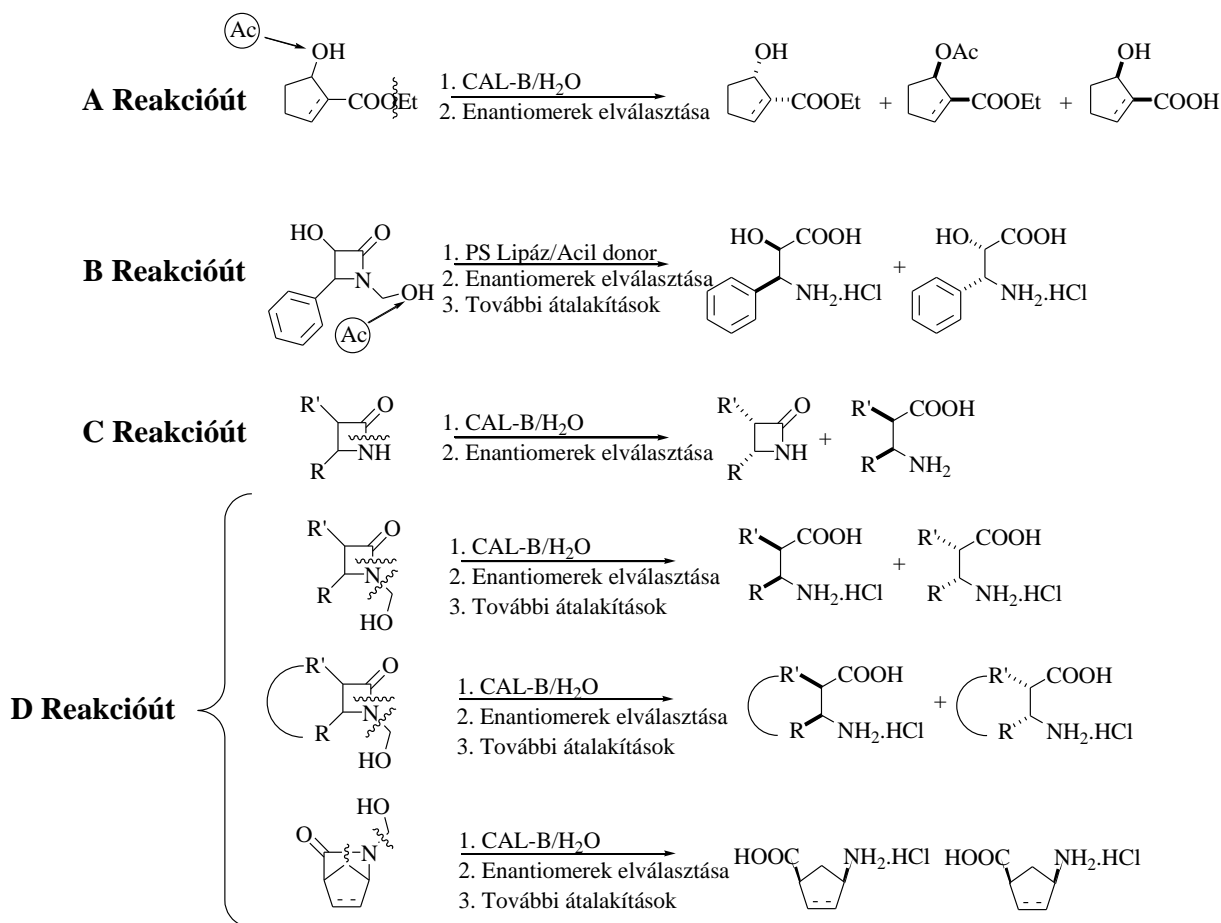
Az enantiomertiszta β - és γ -laktámok illetve β - és γ -aminosavak kémiai és farmakológiai jelentősége jól ismert. A karbociklusos *cisz* hidroxisavak fontos építőkövei lehetnek biológiai hatással rendelkező molekuláknak.

A (2*R*,3*S*)-3-fenilizoserin oldallánc a tumor ellenes hatásáról közismert Taxol illetve Taxotér hatásában elengedhetetlen szerepet játszik. Néhány β -aminosav származék, melyek szerkezeti eleme az (*R*)-3-amino-3-(*o*-tolil)propánsav Catepszin A gátlást mutatnak. A (1*R*,2*S*)-2-aminociklopentán-karbonsav (Ciszpentacin) és metilezett származéka a (1*R*,2*S*)-2-amino-4-metilenciklopentán-karbonsav (Ikofungipen, PLD-118) önmagukban is farmakológiai aktivitással rendelkeznek. A (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsav fontos szerkezeti eleme a HIV/AIDS kezelésében alkalmazott Abakavirnek. A CEP-28122 nevű anaplasztikus limfóma kináz gátló előállításának egyik intermediere a (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*)-3-azatriciklo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-én-4-on. Azon molekulák, melyek *cisz* 3,4-diszubsztituált β -laktám gyűrűt tartalmaznak, rendelkezhetnek PPAR α/γ , vazopresszin VIa agonista illetve tumorelleses hatással. Az 5-hidroxiciklopent-1-én-karbonsav kiindulási molekulája lehet különböző, természetben előforduló királis anyag előállításának, mint a mitsugashiwalakton és a dolikodiál, vagy építőeleme lehet a vinkaminnak.

Enantiomerek előállítására gyakran alkalmazott módszer az enzim katalizált kinetikus rezolválás. Néhány kereskedelmi forgalomban kapható enzimet jelentős mennyiségben használnak a gyógyszeriparban, ezekre jó példa a CAL-B és a PS lipáz.

PhD munkám egyik célja új módszer kidolgozása volt β -hidroxiészterek enzim katalizált enantioszeparálására *O*-acilezésen vagy hidrolízisen keresztül, illetve a hidrolízis jelenlétének kimutatása *O*-acilezés közben a C1-es észter csoporton, CAL-B-vel (1. ábra, A Reakcióút). Ezen kívül új, enzimátikus eljárás kifejlesztése volt a cél a Taxol kulcsintermedier enantioszelektív előállítására szekunder *O*-acilezésen keresztül (1. ábra, B Reakcióút). Harmadik célja munkámnak 3,4-diszubsztituált β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására irányult (1. ábra, C Reakcióút). A végső cél aktivált β - és γ -laktámok enzimátikus gyűrűnyitása volt, mely során az aktiváló *N*-hidroximetil csoport nyomtalanul eltávolítható a rendszerből (1. ábra, D Reakcióút).

Az optimális reakciókörülmények elérése végett megvizsgáltuk az enzimek, az acil donorok mennyiségét, illetve az oldószerek és a hőmérséklet hatását a reakcióra.



1. Ábra

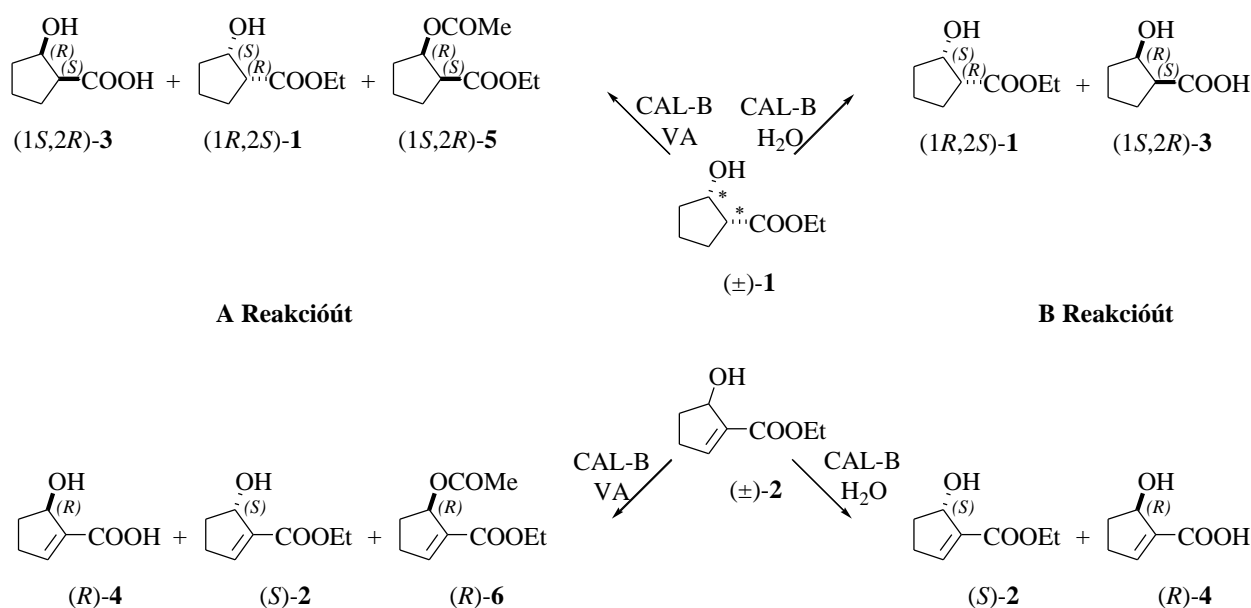
2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A kiindulási anyagok előállítása az irodalomból jól ismert módszerekkel történt. A lipáz katalizált előkísérleteket félmikro méretben végeztük el. A reakciók előrehaladásának és az előállított termékek enantiomertisztaságának ellenőrzése királis oszloppal felszerelt gázkromatográffal vagy nagy hatékonyságú folyadékkromatográffal történt, a minta szükség szerinti derivatizálása után. A preparatív-mennyiségű rezolválások során nyert enantiomereket optikai forgatás, NMR, elemi analízis valamint olvadáspont adatokkal jellemeztük.

3. Eredmények és értékelésük

3.1. β -Hidroxiészterek CAL-B katalizált reakciói. Új módszerek farmakológiailag aktív kulcsintermedierek előállítására.¹

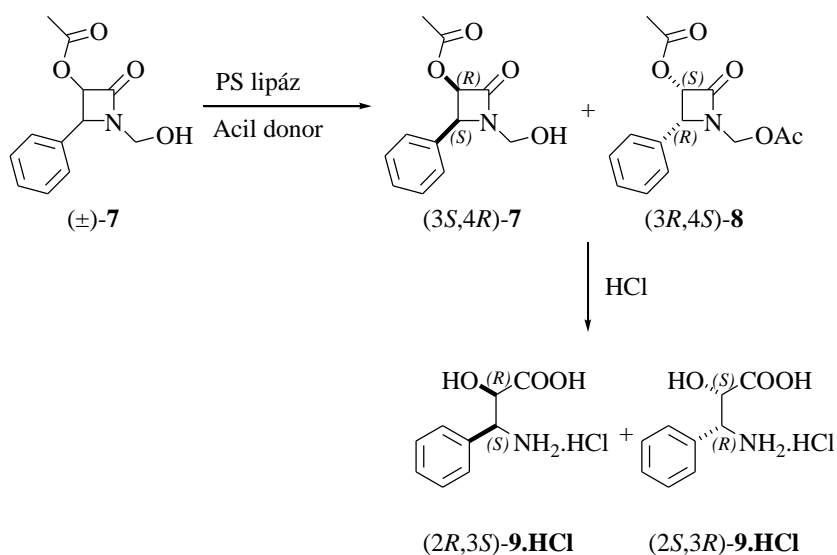
Az etil-(*cisz*-2-hidroxiciklopentánkarboxilát) [(\pm)-**1**] és az etil-(5-hidroxiciklopent-1-én-karboxilát) [(\pm)-**2**] CAL-B katalizált *O*-acilezése 5 ekv. VA-al TBME-ben 30 °C-on kiváló enantioszelektivitást mutatott ($E > 200$) (2. Ábra, A Reakcióút). A hidrolízis, mint nem kívánt mellékreakció, az enzim felületén megtalálható víznek köszönhetően játszódott le az acilezés mellett. A hidrolízis optimalizálása nem vezetett hatékony stratégiához a (1*S*,2*R*)-**3** (termelés = 16%, $ee = 90\%$) és (*R*)-**4** (termelés = 28%, $ee = 47\%$) hidroxisavak előállításához CAL-B-vel, 10 ekv. H₂O hozzáadásával TBME-ben 30 °C-on (2. Ábra, B Reakcióút), ennek ellenére egy új módszert dolgoztunk ki β -hidroxiészterek enzim katalizált hidrolízisén keresztül. Megjegyzendő, hogy a hidrolízis lehetsége hidrolizálható funkciós csoportokat tartalmazó molekulák lipáz katalizált acilezése esetén alapos vizsgálatot igényel.



2. Ábra

3.2. PS lipáz katalizált *O*-acilezés. Új módszerek farmakológiailag aktív kulcsintermedierek előállítására.^{II}

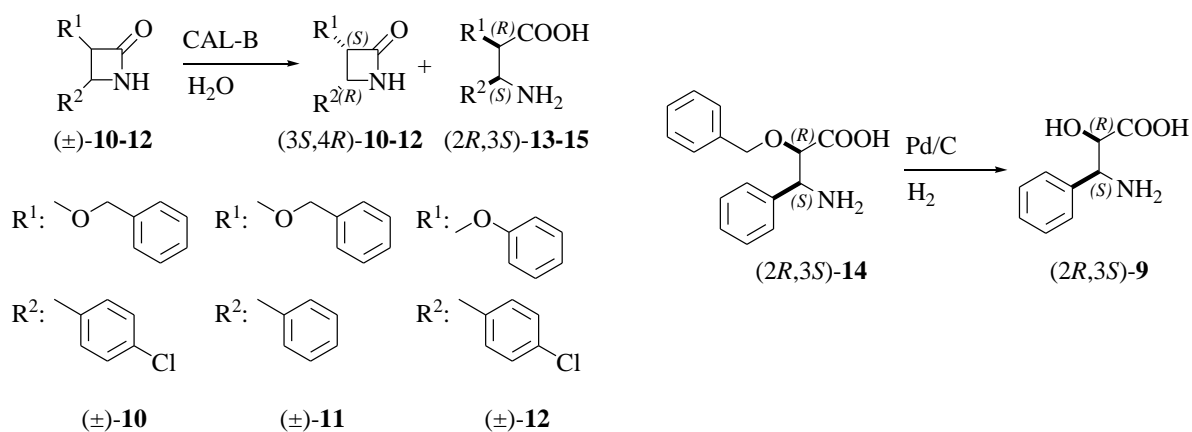
Amikor a *N*-hidroximetil-*cis*-3-acetoxi-4-fenilazetidín-2-on [(±)-**7**] PS lipáz katalizált (*S*)-szelektív *O*-acilezése *i*Pr₂O-ben 10 ekv. VB-al 25 °C-on történt (*E* > 200), az elreagálatlan és a termék β-laktám enantiomerek [(±)-**7** and (±)-**8**] *ee*-je is kiváló lett (≥ 98%, termelés = 46%) (3. Ábra). A β-laktám enantiomerek sósavas hidrolízissel tovább lettek alakítva a megfelelő β-aminosav hidrokloridokká [(2*R*,3*S*)-**9.HCl** and (2*S*,3*R*)-**9.HCl**] (*ee* ≥ 98%) (3. Ábra). Megjegyzendő, hogy OCOR és OH-al rendelkező molekulák esetében enzimés átalakításokkor a molekulák közötti acil-migráció lehetőségét alaposan fel kell mérni. A kidolgozott módszer alkalmas útvonal a Taxol kulcsintermedier (2*R*,3*S*)-3-fenilizoszerin [(2*R*,3*S*)-**9**] előállítására.



Scheme 3

3.3. 3,4-Diszubsztituált β -laktámok CAL-B katalizált gyűrűnyitási reakciói. Új módszerek farmakológiailag aktív kulcsintermedierek előállítására.^{III}

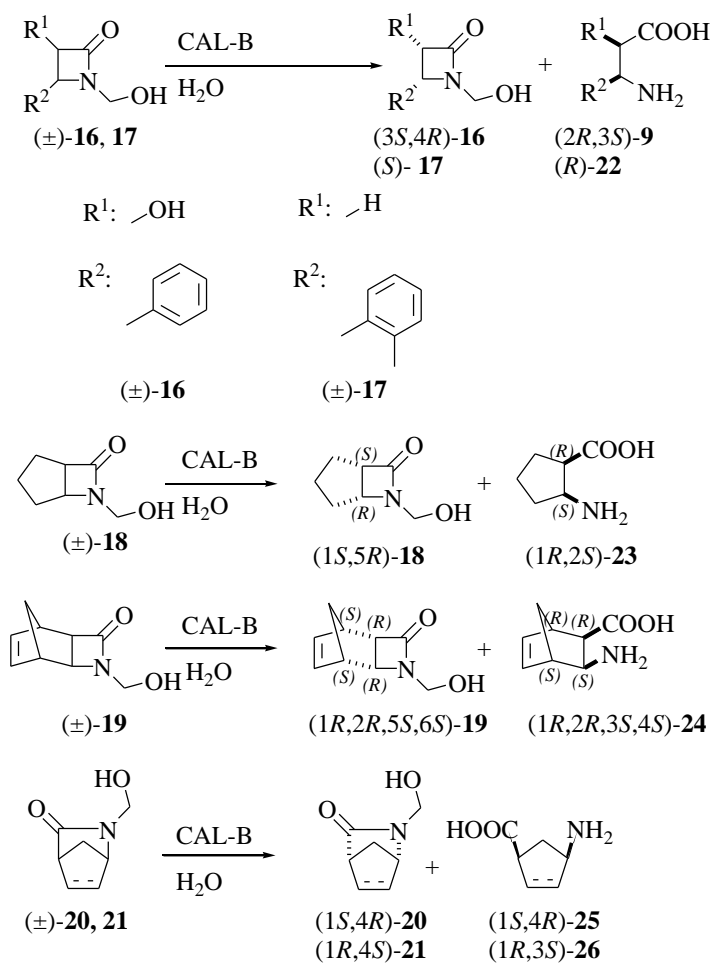
Magas enantioszelektivitás értékeket ($E > 200$) értünk el a *cisz*-3-benziloxi-4-(4-klórfenil) azetidín-2-on [(\pm)-**10**] és a *cisz*-3-benziloxi-4-fenilazetidín-2-on [(\pm)-**11**] CAL-B katalizált gyűrűnyitása során TBME-ben 25 ekv. H₂O jelenlétében 70 °C-on. Ezzel szemben szerény *E*-t (12) figyeltünk meg a *cisz*-4-(4-klórfenil)-3-fenoxiazetidín-2-on [(\pm)-**12**] reakciójánál *i*Pr₂O-ben 25 ekv. H₂O jelenlétében 70 °C-on (4. Ábra). Az enantioszelektivitás értékek a (\pm)-**10** és (\pm)-**11** kontra (\pm)-**12** esetében feltehetően a benziloxi és a fenoxi csoportok eltérő szterikus gátlásának köszönhető, melynek következtében az enantiomerek elhelyezkedése a CAL-B aktív zsebében különböző. A preparatív reakciókban nyert termékek extrakcióval könnyen elválaszthatók egymástól [(3*S*,4*R*)-**10** termelés = 35%, *ee* = 98%, (3*S*,4*R*)-**11** termelés = 48%, *ee* = 98%, (3*S*,4*R*)-**12** termelés = 16%, *ee* = 98%, (2*R*,3*S*)-**13** termelés = 30%, *ee* = 99%, (2*R*,3*S*)-**14** termelés = 47%, *ee* = 99%, (2*R*,3*S*)-**15** termelés = 61%, *ee* = 50%]. (2*R*,3*S*)-**14** debenzilezése folyamatos áramú rendszerben történt (H-CUBE®), mellyel a kívánt (2*R*,3*S*)-**9**-t kaptuk kiváló *ee*-el (99%). A módszer szintén alkalmasnak bizonyult a Taxol kulcsintermediere (2*R*,3*S*)-**9** előállítására.



Scheme 4

3.4. β - és γ -laktámok CAL-B katalizált kétlépéses kaszkád reakciói. Új módszerek farmakológiailag aktív kulcsintermedierek előállítására.^{IV,V}

Az *N*-hidroximetil-*cis*-3-hidroxi-4-fenilazetidín-2-on [(±)-**16**], *N*-hidroximetil-4-(*o*-tolil)azetidín-2-on [(±)-**17**], *N*-hidroximetil-6-azabicyklo [3.2.0] heptán-7-on [(±)-**18**], *N*-hidroximetil-*exo*-3-azatriciklo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-én-4-on [(±)-**19**], *N*-hidroximetil-2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-én-3-on [(±)-**20**] and *N*-hidroximetil-2-azabicyklo[2.2.1]heptán-3-on [(±)-**21**] CAL-B katalizált kétlépéses kaszkád reakciója *i*Pr₂O-ben, 0.5 ekv. H₂O és 1 ekv. benzilamin jelenlétében 60 °C-on játszódtak le. A reakciók enantioszelektivitása kiváló volt ($E > 200$) [(3*S*,4*R*)-**16** termelés = 42%, *ee* = 95%, (*S*)-**17** termelés = 47%, *ee* = 97%, (1*S*,5*R*)-**18** termelés = 45%, *ee* = 99%, (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*)-**19** termelés = 48%, *ee* = 99%, (1*S*,4*R*)-**20** termelés = 49%, *ee* = 99%, (1*R*,4*S*)-**21** termelés = 44%, *ee* = 96%, (2*R*,3*S*)-**9** termelés = 48%, *ee* = 99%, (*R*)-**22** termelés = 47%, *ee* = 99%, (1*R*,2*S*)-**23** termelés = 46%, *ee* = 99%, (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-**24** termelés = 49%, *ee* = 99%, (1*S*,4*R*)-**25** termelés = 49%, *ee* = 99%, (1*R*,3*S*)-**26** termelés = 43%, *ee* = 99%] (5. Ábra). A gyűrűnyitások során az *N*-hidroximetil csoport a keletkezett aminosavakról spontán eltávozott, így a reakcióban az aktiválatlan aminosav enantiomerek keletkeztek. A laktám és az aminosav enantiomerek extrakcióval könnyen elválaszthatók egymástól. Az elreagálatlan *N*-hidroximetilezett laktámok NH₄OH-al vagy savas hidrolízissel *ee* veszteség nélkül adták az aktiválatlan laktámokat vagy az aminosav hidrokloridokat. A módszer kiválóan alkalmas a Taxol kulcsintermedier (2*R*,3*S*)-**9**, a Cathepsin A inhibitorot alkotó (*R*)-**22**, a Ciszpentacín (1*R*,2*S*)-**23**, a CEP-28122 kulcs intermedier (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*)-**27** és az Abakavir kulcs intermedier (1*S*,4*R*)-**25** előállítására.



Scheme 5

Publications

Papers related to the thesis

- I.** Forró, E., Galla, Z. and Fülöp, F.
Candida antarctica lipase B catalysed reactions of β -hydroxy esters: Competition of acylation and hydrolysis
J. Mol. Catal. B: Enzym. **2013**, 98, 92-97. **IF:2.745**
- II.** Forró, E., Galla, Z., Nádasdi, Z., Árva, J. and Fülöp, F.
Novel chemo-enzymatic route to a key intermediate for the taxol side-chain through enantioselective *O*-acylation. Unexpected acyl migration
J. Mol. Catal. B: Enzym. **2015**, 116, 101-105. **IF:2.128**
- III.** Galla, Z., Beke, F., Forró, E. and Fülöp, F.
Enantioselective hydrolysis of 3,4-disubstituted β -lactams. An efficient enzymatic method for the preparation of a key Taxol side-chain intermediate
J. Mol. Catal. B: Enzym. **2016**, 123, 107-112. **IF:2.128***
- IV.** Forró, E., Galla, Z. and Fülöp, F.
The *N*-hydroxymethyl group as a traceless activating group for the CAL-B catalysed ring cleavage of β -lactams: A type of two-step cascade reaction
Eur. J. Org. Chem. **2016**, 15, 2647-2652. **IF:3.068***
- V.** Galla, Z., Forró, E. and Fülöp, F.
Enhanced enzymatic synthesis of the enantiopure intermediate for the blockbuster drug intermediate abacavir through a two-step enzymatic cascade reaction
Tetrahedron: Asymmetry **2016**, 27, 729-731. **IF:2.108***

Other paper

- VI.** Nagy, B., Galla, Z., Forró, E., Csaba, L., Monica, B., Toşa, I., Paizs, C. and Fülöp, F.
Covalently immobilized lipases are efficient stereoselective catalysts for the kinetic resolution of novel *rac*-(5-phenylfuran-2-yl)- β -alanine-ethyl ester hydrochlorides
Eur. J. Org. Chem. **2017**, accepted manuscript. **IF:3.068***

Cumulative impact factor: 15.245

*The impact factors for the year 2015 are presented.

Lectures related to this thesis

- a. Galla Zsolt**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Hidroxiészterek Candida antarctica B-lipáz katalizált reakciói: Párhuzamosan lejátszódó acilezés és hidrolízis
Hajdúszoboszlói Vegyészkonferencia, 26-28 June, 2013, Hajdúszoboszló, Hungary, poster presentation.
- b. Zsolt Galla**, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Enzymatic hydrolysis of 3,4-disubstituted β -lactams
Ist EuCheMS Congress on Green and Sustainable Chemistry, 13-15 October, 2013, Budapest, Hungary, poster presentation.
- c. Galla Zsolt**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
3,4-Diszubsztituált β -laktámok enzimatis hidrolízise
XXXVI. Kémiai Előadói Napok, 28-30 October, 2013, Szeged, Hungary, oral presentation.
- d. Galla Zsolt**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Új enzimés út a Taxol kulcsintermedierjének szintézisére
XX. Szent-Györgyi Napok, 14-17 November, 2013, Szeged, Hungary, oral presentation.
- e. Zsolt Galla**, Enikő Forró, Zala Nádasdi, Ferenc Fülöp
A new enzymatic route for the preparation of Taxil side-chain key intermediate. Unexpected acyl migration.
Biotrans 2015, 26-30 July, 2015, Vienna, Austria, poster presentation.
- f. Enikő Forró, Zsolt Galla**, Ferenc Fülöp
A traceless activating group for the CAL-B catalysed ring cleavage of β -lactams
Chirality 2016, 24-27 July, 2016, Heidelberg, Germany, poster presentation.

Other Lectures

- a. Botond Nagy, **Zsolt Galla**, Csaba Paizs, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Synthesis and enzymatic kinetic resolution of novel 3-amino-3-(5-phenylfuran-2-yl)propanoic acid ethyl esters
ISySyCat 2015, 2-4 September, 2015, Évora, Portugal, poster presentation.