

PhD értekezés tézisei

**1-szubsztituált tetrahydroizokinolin és tetrahydro- β -karbolin
származékok enzim-katalizált kinetikus rezolválása és heterogén
fém-katalizált racemizációja**

Kovács Barbara

Témavezetők:

Prof. Dr. Forró Enikő

Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerkémiai Intézet

2020

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

PhD program: Gyógyszerkémia, gyógyszerkutatás

Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Gyógyszerkémiai Intézet

Témavezetők:

Prof. Dr. Forró Enikő

Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Kovács Barbara

1-szubsztituált tetrahydroizokinolin és tetrahydro- β -karbolin származékok enzim-katalizált kinetikus rezolválása és heterogén fém-katalizált racemizációja

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Lázár László

Tagok: Dr. Dombi György

Dr. Tóth Géza

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Révész Piroska

Opponensek: Dr. Székely Edit

Dr. Vasas Andrea

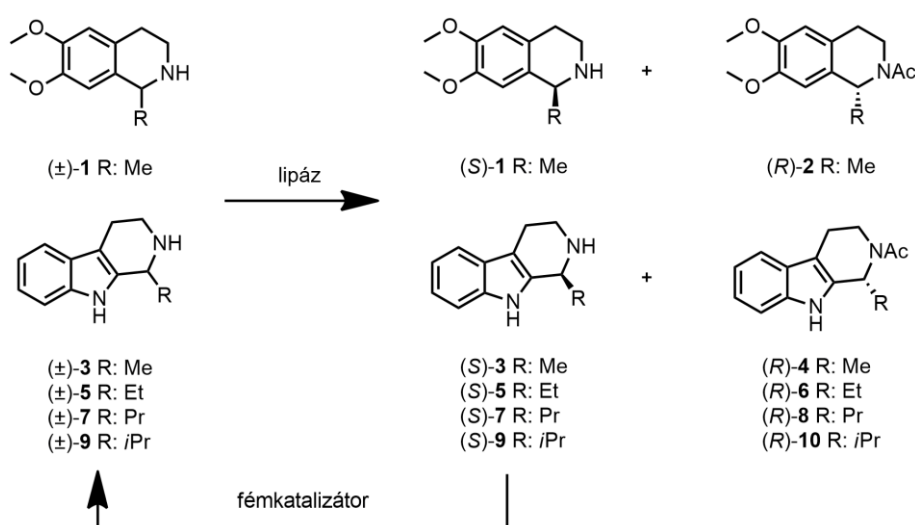
Tagok: Dr. Péter Mária

Dr. Ducza Eszter

1. Bevezetés és célkitűzések

A tetrahydroizokinolin vagy tetrahydro- β -karbolin vázat tartalmazó enantiomertiszta vegyületek nagy érdeklődést mutatnak számos kutatási területen. Mind a természetben előforduló vegyületek és mind a szintetikus származékok széles körben vizsgáltak potenciális biológiai hatásaiknak köszönhetően. Például a természetben előforduló tetrahydroizokinolin vázas emetin (*Ipecacuanha*) köptető hatású, míg a szintén tetrahydroizokinolin vázas noszkapint (*Papaver Somniferum*) köhögéscsillapítóként alkalmazzák a 19th század óta. Szintetikus tetrahydroizokinolin származékokra példa a solifenacin, amely görcsoldó hatással rendelkezik. A tetrahydro- β -karbolin vázat tartalmazó vegyületeknek szintén hatalmas szerepe van a gyógyászatban. Két alkaloidot, a vinkrisztint és a vinblasztint régóta használják tumorelleses terápiában. További példa tetrahydro- β -karbolin vázas vegyületre a yohimbin, amely hatékony erektilis diszfunkció esetén.

Munkánk során első lépésben elvégeztük az enantiomertiszta 1-szubsztituált tetrahydroizokinolin és tetrahydro- β -karbolin vázas vegyületek előállítását [(\pm)-**1**, (\pm)-**3**, (\pm)-**5**, (\pm)-**7**, (\pm)-**9**] lipáz-katalizált kinetikus rezolváláson keresztül (1. ábra).



1. ábra

További célunk volt egy új enzimes stratégia kidolgozása folyamatos áramú rendszerben (*H*-Cube) (\pm)-**1** aszimmetrikus *N*-alkoxikarbonilációjára.

A szubsztrát specificitás keretein belül vizsgáltuk a C1 pozícióban lévő szubsztituens növekvő méretének (Me, Et, Pr, *i*Pr) hatását az enantioszelektivitásra (*E*) és

reakciósebességre a (\pm) -**3,5,7,9** vegyületek CAL-B-katalizált aszimmetrikus *N*-alkoxikarbonilációja során.

A kinetikus rezolválás és a racemizáció kombinálása hatékony aszimmetrikus szintézishez vezet, így elvégeztük az 1-Me szubsztituált származékok [(*S*)-**1,3**] racemizációját heterogén fémkatalizátorok alkalmazásával (1. ábra).

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A racém kiindulási vegyületek előállítását ismert irodalmi módszerek alapján vittük véghez. Az előkísérleteket szakaszos és néhány esetben folyamatos üzemmódban végeztük el milligramm mennyiségben. Egy tipikus szakaszos üzemmódban elvégzett reakció esetén a kiindulási vegyületet oldottuk az oldószerben, hozzáadtuk az enzimet, az acil donort és az additíveket, majd a reakcióelegyet incubator shakerben rázattuk különböző hőmérsékleten. A folyamatos áramú reaktorban (*H*-Cube) végzett reakciók összeállítása során, először a kiindulási vegyületet oldottuk az oldószerben, majd a reakcióelegyhez hozzáadtuk az acil donort, amely elegyet egy HPLC pumpa segítségével áramoltattuk át a CAL-B enzimmel töltött nyomás- és hőmérsékletálló oszlopon. A preparatív mennyiségű rezolválásokat szakaszos üzemmódban végeztük az előkísérletek során kapott optimális körülmények alkalmazásával. Az (*R*)-karbamát enantiomerek hidrolízisét Schlenk kémcsőben végeztük és a reakcióelegyet olajfürdőn kevertettük argon alatt.

A termék enantiomereket enantiomerfelesleggel (*ee*), optikai forgatás értékkel, olvadásponttal, ^1H NMR spektrummal, abszolút konfigurációval és elemi analízissel jellemeztük. Az abszolút konfigurációt irodalmi értékek alapján állapítottuk meg.

Egy tipikus racemizáció során a lombikot argon alá helyeztük, hozzáadtuk a szubsztrátot, az oldószert, a fémkatalizátort, majd rögtön elkezdtük a H_2 áramoltatást. Néhány reakciót Schlenk kémcsőben végeztünk, amelyet először argon alá helyeztünk, majd hozzáadtuk a szubsztrátot, az oldószert és a fémkatalizátort.

A racém termékeket ^1H NMR spektrummal és olvadásponttal jellemeztük.

A reakciókat királis IA oszloppal ellátott HPLC segítségével követtük az enantiomerek *ee* értékeinek meghatározásával.

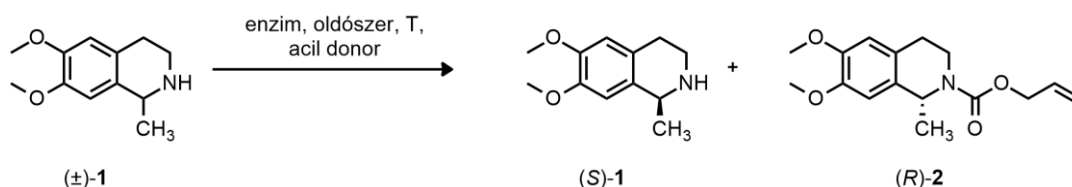
3. Eredmények

3.1. A racém 1,3,5,7,9 kinetikus rezolválása^{I,III}

A (±)-**1** vegyület kinetikus rezolválását toluolban végeztük AY (*Candida rugosa*) enzimmel és fenil-allil-karbonáttal alkalmazásával 40 °C-on szakaszos üzemmódban (2. ábra). 24 h alatt végbement a reakció, (S)-**1** és (R)-**2** enantiomereket kiváló *ee* értékkel (> 99%) és termeléssel (> 39%) kaptuk.

A racém **1** CAL-B-katalizált aszimmetrikus *N*-alkoxikarbonilációja *t*-BuOMe-ben ment végbe fenil-allil-karbonáttal 50 °C-on. 49 h után kiváló *E* (> 200) jellemezte a reakciót (2. ábra). A termék enantiomereket *ee* > 97% értékkel és > 38% termeléssel nyertük.

A szakaszos üzemmódban meghatározott optimális körülmények között elvégeztük a (±)-**1** kinetikus rezolválását folyamatos áramú reaktorban is. Amikor az oszlopot AY enzimmel töltöttük, enantioszelektív reakció lejátszódását nem tapasztaltuk. Azonban a CAL-B enzimmel töltött oszlopot alkalmazva, 25% konverziót detektáltunk (*E* > 200) egy kör után *t*-BuOMe oldószerben fenil-allil-karbonáttal 70 °C-on és 1 bar nyomáson. A reakciósebesség növelése érdekében, a reakcióelegyet ötször egymás után átáramoltattuk a CAL-B enzimmel töltött oszlopon, amely során 41% konverziót értünk el kiváló *E* (> 200) értékkel az ötödik kör után.



2. ábra

A (±)-**3** preparatív mennyiségű *N*-alkoxikarbonilációját optimalizálás után *t*-BuOMe oldószerben végeztük el CAL-B enzimmel, fenil-allil-karbonáttal, Et₃N jelenlétében 60 °C-on. A reakció 48 h alatt végbement (*E* > 200) és a termék enantiomereket [(S)-**3** és (R)-**4**] > 97% *ee* és > 40% termelés jellemezte. A reakciót megismételtük DIPE-ben, amely esetben a maximum konverziót (50%) 24 h alatt értük el. > 97% *ee* és > 40% termelés értékkel kaptuk a termék enantiomereket (3. ábra).

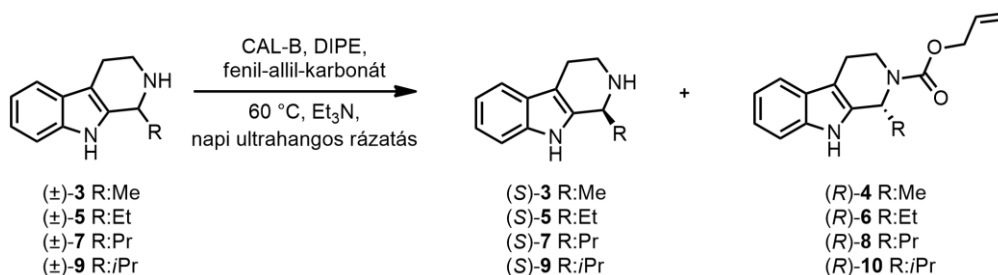
A (±)-**5** preparatív mennyiségű *N*-alkoxikarbonilációja az előzőleg meghatározott körülmények között napi 1 perces ultrahangos rázatást alkalmazva 5 nap alatt végbement és

az enantiomereket [(*S*)-**5** and (*R*)-**6**] kiváló *ee* (> 99%) és jó termelés (43%) jellemezte (3. ábra).

A (±)-**7** vegyület CAL-B-katalizált (*R*)-szelektív preparatív rezolválását is véghez vittük DIPE-ben (3. ábra). A reakció 7 nap alatt lejártszódott és kiváló *ee* értékkel (> 99%) és > 41% termeléssel nyertük a termék enantiomereket [(*S*)-**7** és (*R*)-**8**].

(±)-**9** milligramm mennyiségű kinetikus rezolválása során azonos körülmények között csak 21% konverziót értünk el, így preparatív mennyiségű rezolválást nem végeztünk (3. ábra).

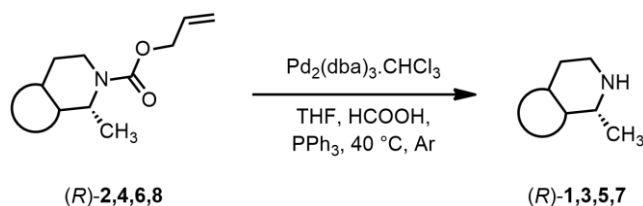
(±)-**3,5,7,9** CAL-B-katalizált *N*-alkoxikarbonilácója során (DIPE, fenil-allil-karbonát, 60 °C, Et₃N, ultrahangos rázatás) vizsgáltuk a C1 pozícióban lévő különböző méretű szubsztituensek (Me: (±)-**3**, Et: (±)-**5**, Pr: (±)-**7**, *i*Pr: (±)-**9**) hatását az enantioszelektivitásra és reakciósebességre (3. ábra). Az enantioszelektivitás kiváló volt minden esetben (> 200), azonban a reakciósebesség drasztikusan csökkent egyre nagyobb méretű szubsztituenst tartalmazó tetrahidro-β-karbolin, mint kiindulási vegyület alkalmazásával.



3. ábra

3.2. (*R*)-karbamát enantiomerek hidrolízise^{I,III}

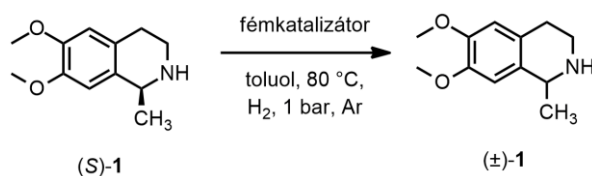
Az Alloc rész (*R*)-karbamátokról [(*R*)-**2,4,6,8**] történő eltávolítása érdekében egy homogén Pd katalizátort [Pd₂(dba)₃.CHCl₃] használtunk (4. ábra). A reakció összeállításakor a karbamát enantiomert THF oldószerben oldottuk, HCOOH-t, PPh₃-t adtuk a reakcióelegyhez. A reakció 40 °C-on ment argon alatt. A szabad aminok enantiomerjeit [(*R*)-**1,3,5,7**] enantiomertisztaság vesztese nélkül nyertük (*ee* > 99%) jó termelésekkel [(*R*)-**1**: 60%, (*R*)-**3**: 85%, (*R*)-**5**: 78%, (*R*)-**7**: 79%].



4. ábra

3.3. Az (*S*)-1-metil-tetrahidroizokinolin és (*S*)-1-metil-tetrahidro-β-karbolin racemizációja^{II}

Az (*S*)-1 enantiomer első racemizációs vizsgálatait 20 mol% katalizátor alkalmazásával végeztük (Pd/Al₂O₃, Pd/C, Ir/C, Pt/Al₂O₃ (T94), Pt/Al₂O₃ (T123), Pt/C) (5. ábra). Pt/Al₂O₃ (T94) és Pt/C 30 min alatt racemizálta a kiindulási vegyületet. Ir/C kisebb aktivitást mutatott, mint a Pt katalizátorok, de a racemizáció végbement 5 h alatt. Racemizációt nem tapasztaltunk 90 °C-on, amikor Ni/Al₂O₃, Pd black vagy koloidális úton előállított Ir katalizátort használtunk. A Page és munkatársai által korábban alkalmazott homogén [IrCp*I₂]₂ katalizátorral (0,2 mol%) is vizsgáltuk (*S*)-1 és (*S*)-3 racemizációját toluolban, 40 °C-on. A reakció 1 h alatt végbement mindkét esetben. A további vizsgálatok elvégzésére Pt/Al₂O₃ (T94) és Ir/C katalizátort választottuk ki.



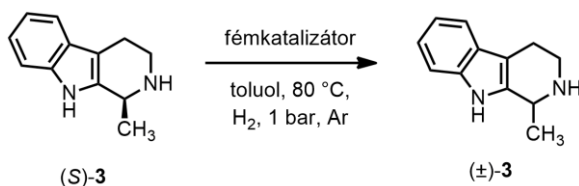
5. ábra

A kezdetben alkalmazott körülmények között vizsgáltuk a két katalizátor koncentráció csökkentésének hatását (*S*)-1 racemizációjának sebességére. 20 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) esetén 45 min alatt racém terméket detektáltunk, míg 3 mol%-ban alkalmazva a katalizátort 5 h alatt 29% *ee* értéket kaptunk. A 20 mol% Ir/C-katalizált reakció 5 h alatt végbement, míg 10 mol% Ir/C esetén 5 h alatt 24%-ra csökkent az *ee*. A Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátor deaktivációját figyeltük meg alacsony katalizátor koncentrációnál, amely gátló hatást nem tapasztaltuk Ir/C alkalmazásakor.

A két katalizátor aktiválási energiájának összehasonlítása céljából elvégeztük a racemizációt különböző hőmérsékleteken. 10 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátort

alkalmaztunk toluolban, 1 bar nyomáson, H₂ áramban, argon alatt, amely reakció 80 °C-on 120 min alatt lejártszódott teljesen, míg 50 °C-on 5 h alatt 17% *ee* értéket detektáltunk. 15 mol% Ir/C felhasználásával 5 h alatt 90 °C-on ment végbe a racemizáció, míg 70 °C-on 35% *ee* értéket kaptunk ugyanebben az időpillanatban. A kalkulált aktiválási energia értékek (Pt/Al₂O₃ (T94): 27 kJ mol⁻¹, Ir/C: 65 kJ mol⁻¹) egybefüggnek a vizsgálati eredményekkel, gyorsabb racemizációt tapasztaltunk Pt katalizátor alkalmazásakor.

(*S*)-**3** racemizációja 2 óra alatt végbement 10 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátorral (6. ábra). 20 mol% Ir/C alkalmazásakor 5 h alatt a termék *ee* értéke 14%-ra csökkent (6. ábra). Az amin és imin gátló hatása miatt fellépő katalizátor deaktivációt ebben az esetben is megfigyeltük kis mennyiségű Pt/Al₂O₃ (T94) (2 mol%) alkalmazásakor, 5 h alatt az *ee* érték csak 47%-ra csökkent (6. ábra). Amikor a toluolt *t*-BuOMe oldószerrel helyettesítettük (*S*)-**3** Pt/Al₂O₃ (T94)-katalizált racemizációjában, az *ee* csak kis mértékben csökkent 98%-ról 91%-ra 5 h alatt 10 mol% katalizátor alkalmazásával 80 °C-on, H₂ áramban, 1 bar nyomáson, argon alatt.



6. ábra

A preparatív mennyiségű racemizációs reakciók során 10 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátort alkalmaztunk toluolban 80 °C-on, H₂ áramban, 1 bar nyomáson, argon alatt. A racemizáció 2 h alatt végbement (*S*)-**1** vegyület esetén és a racém terméket kiváló termeléssel kaptuk (94%). (*S*)-**3** racemizációja 1 óra alatt lejártszódott és a racém terméket 90%-os termeléssel nyertük.

A továbbiakban elvégeztük a katalizátorok újrafelhasználhatóságának vizsgálatát, bizonyítottuk az imin gátló hatását és kizártuk a fémrészecskék kiszűrődésének lehetőségét a katalizátorból (*S*)-**1** racemizációja során Pt/Al₂O₃ (T94) vagy Ir/C felhasználásával toluolban, 80 °C, 1 bar nyomáson, H₂ áramban, argon alatt.

A katalizátorok újrahaznosíthatóságának vizsgálata során, egy racemizációs ciklus lejártszódása után, a katalizátort újrafelhasználtuk ugyanazon körülmények között. Amikor 10 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátort használtunk, az 1. körben 50% *ee* értéket detektáltunk

15 min után, míg a 2. körben már csak 67% *ee* értéket kaptunk ugyanabban az időpillanatban. Az Ir/C (20 mol%) újr felhasználásakor nem tapasztaltunk reakciósebesség csökkenést.

Az imin köztitermék által okozott katalizátor deaktiváció lehetőségének vizsgálatokor, 20 mol% Ir/C katalizátor felhasználásával (\pm)-**1** a H₂ áram megvonásával gyorsan átalakult iminné, azonban sokkal lassabb dehidrogénezési sebességet figyeltünk meg azonos körülmények között 20 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) alkalmazásakor. Szignifikáns racemizációs sebesség csökkenést figyeltünk meg, amikor szintetikus úton előállított imintadtunk a 10 mol% Pt/Al₂O₃ (T94)-katalizált reakcióelegyhez. 2 h alatt *ee* = 1% jellemezte a terméket, amikor imint nem tartalmazott a reakcióelegy, azonban az imin hozzáadásával *ee* = 29% értéket detektáltunk ugyanebben az időpillanatban.

Később, kizártuk a fémrészecskék kiszűrődését a heterogén katalizátorból. A reakcióelegyből 45 perc után kiszűrtük a katalizátort, ekkor *ee* = 20% volt 5 mol% Pt/Al₂O₃ (T94) katalizátort alkalmazva és *ee* = 57% értéket kaptunk 15 mol% Ir/C felhasználásával. A katalizátor nélküli reakcióelegyből a következő egy órában is mintát vettünk és megállapítottuk, hogy a reakcióelegyben nem voltak fémrészecskék, amelyek továbbvitték volna a reakció lejtátszódását, így az *ee* nem csökkent tovább, a racemizáció leállt.

3.4. Dinamikus kinetikus rezolválás

(\pm)-**1** dinamikus kinetikus rezolválására egy tesztreakciót végeztünk el Ir/C és CAL-B kombinációjával toluolban, fenil-allil-karbonáttal, 80 °C-on, H₂ áramban, argon alatt, azonban szignifikáns aktivitást nem tapasztaltunk.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Kovács, B.**; Megyesi, R.; Forró, E.; Fülöp, F.
Efficient lipase-catalyzed route for the kinetic resolution of salsolidine and its β -carboline analogue
Tetrahedron: Asymmetry, **2017**, 28, 1829-1833
IF: 1.77
- II. **Kovács, B.**; Savela, R.; Honkala, K.; Yu. Murzin, D.; Forró, E.; Fülöp, F.; Leino, R.
Racemization of secondary amine containing natural products using heterogeneous metal catalysts
ChemCatChem, **2018**, 10, 2893-2899
IF: 4.495
- III. **Kovács, B.**; Forró, E.; Fülöp, F.
Candida antarctica lipase B catalyzed kinetic resolution of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolines: Substrate specificity
Tetrahedron, **2018**, 74, 6873-6877
IF: 1.92

Az értekezéssel kapcsolatos előadások:

- I. **Kovács, B.**; Forró, E.; Fülöp, F.
Szalszolidin és β -karbolin vázas analógjának enzim katalizált *N*-acilezése szakaszos és folyamatos üzemmódban
A Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért Alapítvány és a SZAB Szerves és Gyógyszerkémiai Munkabizottsága 15. tudományos előadóülés
Szeged, Hungary, 12 May, 2016, oral presentation
- II. **B. Kovács**; R. Savela; E. Forró; F. Fülöp; R. Leino
Heterogeneous dynamic kinetic resolution of secondary amines
Winter school Conference Cruise Helsinki – Stockholm 2017
Helsinki-Stockholm, Finland-Sweden, 12-14 January, 2017, oral presentation
- III. **Kovács, B.**; Savela, R.; Honkala, K.; Yu. Murzin, D.; Forró, E.; Fülöp, F.; Leino, R.

Szekunder aminok kinetikus rezolválása és kísérletek a dinamikus kinetikus rezolválás megvalósítására

Vegyészkonferencia

Hajdúszoboszló, Hungary, 19-21 June, 2017, poster presentation P-25

- IV. **B. Kovács**; R. Savela; K. Honkala; D. Yu. Murzin; E. Forró; F. Fülöp; R. Leino
Kinetic resolution and racemization of secondary amines

13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations

Budapest, Hungary, 9-13 July, 2017, poster presentation P-065

- V. **Kovács, B.**; Forró, E.; Fülöp, F.

Szalszolidin és 1-alkilszubsztituált tetrahydro- β -karbolinok lipáz-katalizált kinetikus rezolválása és kísérletek a dinamikus kinetikus rezolválás megvalósítására

MTA Heterociklusos és Elemorganikus Kémiai Munkabizottság Ülése

Balatonszemes, Hungary, 6-8 June, 2018, oral presentation