

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Gyógyszerkémia, gyógyszerkutatás Ph.D program

Programvezető: Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Gyógyszerkémiai Intézet

Témavezető: Prof. Dr. Forró Enikő

Prof. Dr. Fülöp Ferenc

Schönstein László

**TETRAHIDROIZOKINOLIN-VÁZAS VEGYÜLETEK ENZIM-
KATALIZÁLT REZOLVÁLÁSA FOLYAMATOS ÉS SZAKASZOS
ÜZEMMÓDBAN**

Szigorlati Bizottság:

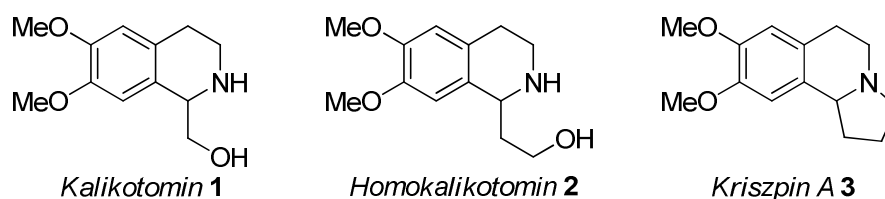
Elnök: Prof. Dr. Molnár Árpád
Tagok: Prof. Dr. Dombi György
Prof. Dr. Tóth Géza

Bírálati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Hohmann Judit
Opponensek: Prof. Dr. Poppe László
Prof. Dr. Tóth Géza
Tagok: Prof. Dr. Wölfling János
Dr. Hajdú Zsuzsanna

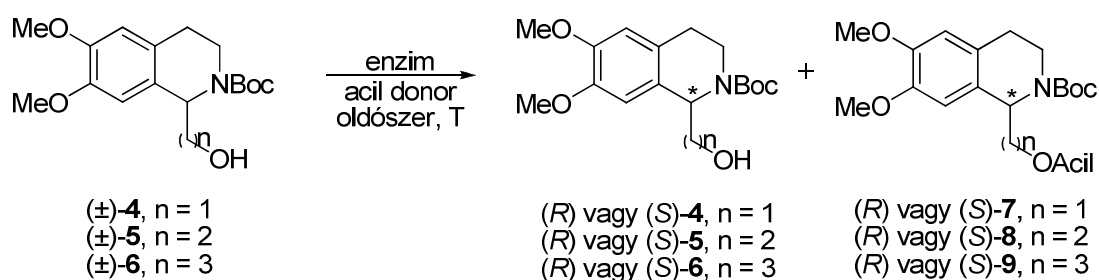
1. Előzmények és célkitűzések

A tetrahydroizokinolin-vázis vegyületek kiemelkedő kémiai és biológiai jelentőséggel bírnak. Ezen vegyületek enantiomertiszta formában történő felhasználásnak nagy jelentősége van a gyógyszergyártásban, hiszen egyes terápiás hatással rendelkező gyógyszermolekuláknak alapvető szerkezeti részei. Ilyen gyógyszerek például a köhögéscsillapító noszkapin, a köptető hatású emetin, a daganat ellenes trabectedin (Yondelis[®] név alatt). A Parkinson kór és egyes neurológiai betegségek kezelésében jelentős szerepet játszanak az 1-metil- és 1-fenil-tetrahydroizokinolinok. A természetben előforduló egyes növényi alkaloidoknak fontos építő elemét képezik, mint például a tumorellenes hatással rendelkező *kriszpin A*-nak, amit a *fodros bogáncsból* (*Carduus crispus*), vagy a *kalikotominnak*, amit a *Calycotome spinosa* nevű növényből izoláltak először (1. ábra).



1. ábra

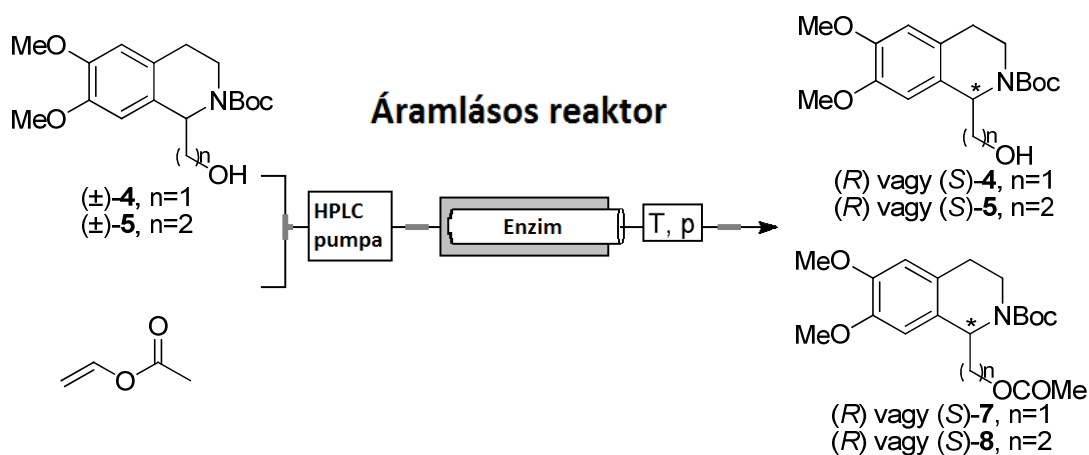
Doktori munkám célja volt új enzim-katalizált kinetikus módszerek fejlesztése szakaszos és folyamatos áramú üzemmódban a *kalikotomin*, a *homokalikotomin* és a *kriszpin A* (1. ábra) mindkét enantiomerének nagy enantiomerfelesleggel történő rezolválására. A kísérletek elvégzéséhez a megfelelő intermedier (\pm)-**4**, (\pm)-**5** és (\pm)-**6** aminoalkoholokat választottunk kiindulási anyagokként és ezen vegyületek primer hidroxil csoportját terveztük acilezni (2 ábra). Továbbá terveztünk egy szisztematikus vizsgálat elvégzését, ahol vizsgálni kívántuk a reakciócentrum és kiralitáscentrum közötti távolság változtatásának a hatását az enantioszelektivitásra és a reakciósebességre.



2. ábra

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A racém kiindulási vegyületeket [(±)-**4**–(±)-**6**] az irodalomból ismert módon állítottuk elő. Az enzim-katalizált előkísérleteket szakaszos és folyamatos áramú üzemmódban, félmikro méretben végeztük el. Az áramlásos előkísérleteket egy folyamatos áramú reaktorban (H-Cube[®]) végeztük „No H₂” üzemmódban, melynek vázlatos felépítése a 3. ábrán látható. Az enzim egy fűthető és nyomás alá helyezhető acélhengerben található. A reagáltatni kívánt vegyületeket egy HPLC pumpa áramoltatja át a katalizátor ágyon. Az áramlásos módszerrel végzett kísérletek nagy előnye a szakaszos módszerhez képest a rövid reakcióidő.



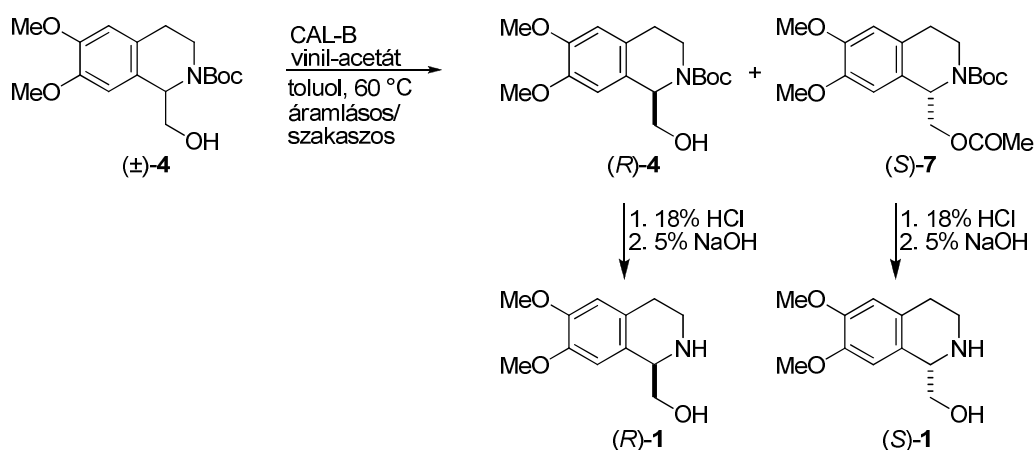
3. ábra

A preparatív-mennyiségű rezolválást szakaszos üzemmódban végeztük, majd az így kapott acilezett termékek és az el nem reagált alkoholok enantiomerfeleslegét királis töltetű oszloppal ellátott nagy hatékonyságú folyadékkromatográffal határoztuk meg. Az izolált enantiomereket optikai forgatás, olvadáspont, elemi analízis, ^1H és ^{13}C NMR adatokkal jellemeztük.

Az előkísérletek során vizsgáltuk különböző enzimek, szerves oldószerek, acildonorok, adalékanyagok és a hőmérséklet illetve az áramlásos kémiai módszerek esetében a nyomás hatását a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra.

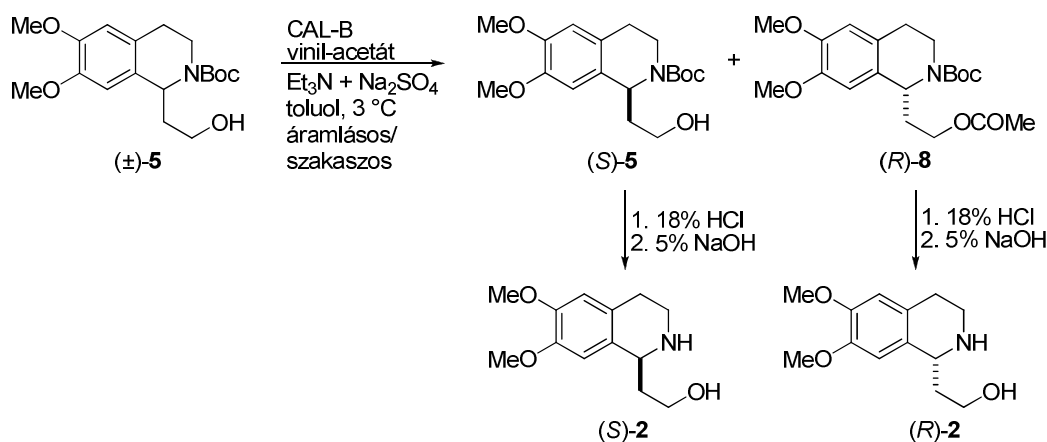
3. Eredmények és értékelésük

3.1. Folyamatos áramú üzemmódban optimalizáltuk a *kalikotomin* enzim-katalizált *O*-acilezésnek körülményeit. A kapott optimális paramétereket [CAL-B (*Candida antarctica* B lipáz), vinil-acetát, toluol, 60 °C] sikeresen alkalmaztuk szakaszos üzemmódban a gramm mennyiségű rezolválás során ($E > 200$). Az enzimés reakciók során kapott enantiomerekből [(*R*)-**4** és (*S*)-**7**] hidrolízissal és a Boc-védőcsoport eltávolításával előállítottuk a *kalikotomin* mindkét enantiomerét [(*R*)-**1** és (*S*)-**1**], amit kiváló enantiomerfeleslegekkel ($ee = 99\%$) jellemeztünk (4. ábra).



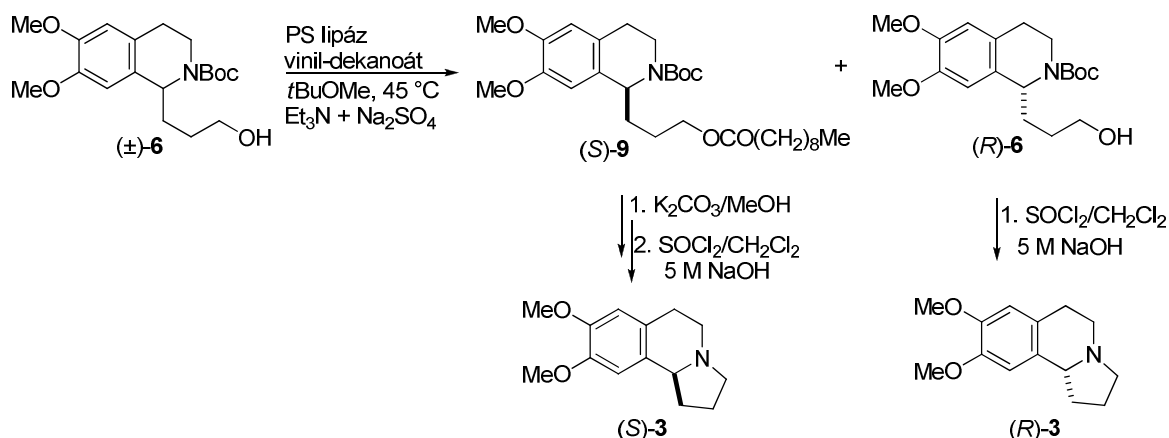
4. ábra

3.2. Sikeresen kombináltuk a folyamatos áramú és a szakaszos üzemmódban végzett előkísérleteket a *homokalikotomin* enzim-katalizált rezolválása során ($E = 88$). Az optimálisnak talált reakciókörülmények között (CAL-B, vinil-acetát, Et_3N és Na_2SO_4 , toluol, $3\text{ }^\circ\text{C}$) elvégeztük két lépésben a preparatív mennyiségű rezolválást. Az így kapott észterből [(*R*)-**8**] és az el nem reagált alkoholból [(*S*)-**5**] egy hidrolízises lépéssel és a Boc-védőcsoport eltávolításával előállítottuk a *homokalikotomin* mindkét enantiomerét [(*R*)-**2** és (*S*)-**2**], amit jó enantiomerfelesleggel ($ee \geq 94\%$) jellemeztünk (5. ábra).



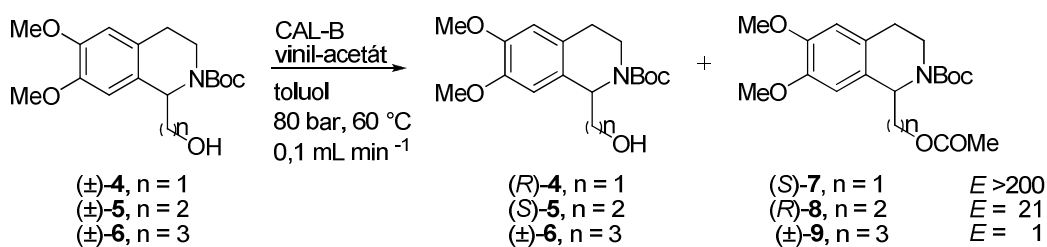
5. ábra

3.3. Új enzim-katalizált kulcslépést tartalmazó szintézist dolgoztunk ki a természetes alkaloid *kriszpin A* mindkét enantiomerének az előállításra. Az enzim-katalizált kulcslépést a kiralitáscentrumtól három szénatomnyi távolságra lévő primer hidroxil csoport acilezésén keresztül valósítottuk meg jó enantioszelektivitással ($E = 59$). Az optimalizált körülmények között [PS lipáz (*Burkholderia cepacia*), vinil-dekanoát, Et_3N és Na_2SO_4 , *t*BuOMe, $45\text{ }^\circ\text{C}$] elvégeztük a preparatív mennyiségű rezolválást és a kapott termék (*S*)-**9** észter funkciójának hidrolízise után a Boc-védőcsoport eltávolítását és a gyűrűzárást egy lépésben valósítottuk meg. A kapott enantiomereket [(*S*)-**3** és (*R*)-**3**] jó enantiomerfelesleggel ($ee \geq 94\%$) jellemeztük (6. ábra).



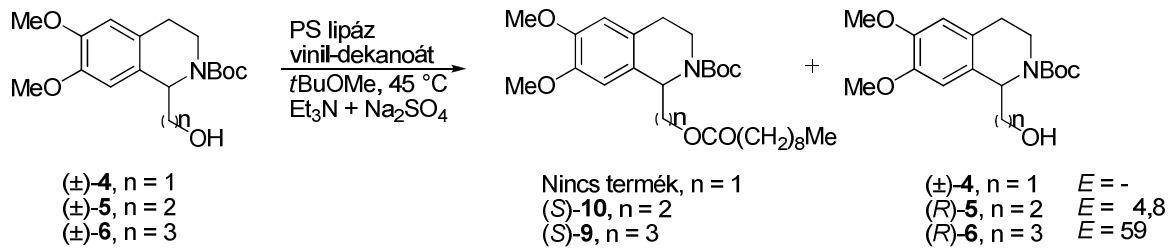
6. ábra

3.4. Szisztematikusan vizsgáltuk a sztereocentrum és a reakciócentrum közötti távolság változásának ($n = 1, 2, 3$) a hatását az enantioszelektivitásra és megállapítottuk, hogy a változás mértéke elsősorban enzimfüggő. Bizonyos enzimek esetében, mint a CAL-A (*Candida antarctica* A lipáz), PPL (sertés hasnyálmirigy lipáz), AK lipáz (*Pseudomonas fluorescens*) és AY lipáz (*Candida rugosa*) a távolság változásától függetlenül az acilezési reakció nem játszódtott le. CAL-B használata esetében (vinil-acetát, 80 bar, 60 °C, 0,1 mL min⁻¹ áramlási sebesség, toluolban egy kör után) megállapítottuk, hogy a reakciócentrum és a királiscentrum közötti távolság növekedésével az enantioszelektivitás csökkent ($E = 200 \rightarrow 1$) (7. ábra).



7. ábra

PS lipáz használata esetében (szakaszos üzemmódban, vinil-dekanoát, *t*BuOMe, 45 °C, katalitikus mennyiségű Et₃N és Na₂SO₄ jelenlétében) azt állapítottuk meg, hogy a reakciócentrum és kiralitáscentrum közötti távolság csökkenésével az enantioszelektivitás *E* = 59-ről (*n* = 3) *E* = 4,8-ra (*n* = 2) csökken és ha *n* = 1 nem tapasztaltunk reakciót (8. ábra).



8. ábra

4. Közlemények és előadások

Az értekezés alapját képező közlemények

- I. E. Forró, **L. Schönstein**, F. Fülöp
Total synthesis of crispine A enantiomers through a *Burkholderia cepacia* lipase-catalysed kinetic resolution
Tetrahedron: Asymmetry **2011**, *22*, 1255-1260.
- II. **L. Schönstein**, E. Forró, F. Fülöp
Continuous-flow enzymatic resolution strategy for the acylation of amino alcohols with a remote stereogenic centre: synthesis of calycotomine enantiomers
Tetrahedron: Asymmetry **2013**, *24*, 202-206.
- III. **L. Schönstein**, E. Forró, F. Fülöp
Enzymatic reaction for the preparation of homocalycotomine enantiomers
Tetrahedron: Asymmetry **2013**, *24*, 1059-1062.
- IV. **Schönstein L.**, Forró E., Fülöp F.
Tetrahydroizokinolin-vázás vegyületek enzimes rezolválása szakaszos és áramlásos kémiai módszerrel
Magy. Kém. Foly. **2014**, *120*, 26-31.

Egyéb közlemények

- V. E. Forró, **L. Schönstein**, L. Kiss, A. Vega-Peñaloza, E. Juaristi, F. Fülöp
Direct enzymatic route for the preparation of novel enantiomerically enriched hydroxylated β -amino ester stereoisomers
Molecules **2010**, *15*, 3998-4010.
- VI. N. Grecsó, I. Ilisz, **L. Schönstein**, F. Fülöp, W. Lindner and A. Péter
High-performance liquid chromatographic enantioseparation of aminoalcohol analogs possessing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline skeleton on polysaccharide- and *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases
Biomed. Chrom. bírálatra beküldve.

Az értekezéssel kapcsolatos előadások

- I. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Kriszpin A enantiomerek szintézise enzim-katalizált kinetikus rezolválással
"Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért" Alapítvány 10. tudományos előadó ülése, 2010. május 5., Szeged, Magyarország, szóbeli előadás.
- II. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Kriszpin A enantiomerek totálszintézise enzim-katalizált kinetikus rezolválással
"Szegedi Ifjú Szerves Kémikusok Támogatásáért" Alapítvány 11. tudományos előadó ülése, 2011. április 18., Szeged, Magyarország, szóbeli előadás.
- III. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Kriszpin enantiomerek enzimes szintézise
MTA Alkaloidkémiai munkabizottságának ülése, 2011. május 16-17., Balatonalmádi, Magyarország, szóbeli előadás.
- IV. **László Schönstein**, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Total synthesis of crispine A enantiomers through a Burkholderia cepacia lipase catalysed kinetic resolution
XIVth Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry, 2011. szeptember 4-8., Brno, Cseh Köztársaság, poszter előadás (P-29).
- V. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Kalikotomin és homokalikotomin enzimes rezolválása áramlásos kémiai módszerrel
MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottsága ülése, 2012. május 14-15., Balatonalmádi, Magyarország, szóbeli előadás.
- VI. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Kriszpin A enantiomerek totálszintézise enzim-katalizált kinetikus rezolválással
Kutatóegyetemi kiválósági központ létrehozása a szegedi tudományegyetemen, Molekulától a gyógyszerig, 2012. május 24-25., Szeged, Magyarország, poszter előadás (P-03).
- VII. **Schönstein László**, Forró Enikő, Fülöp Ferenc
Homokalikotomin enantiomerek enzimes előállítása folyamatos és szakaszos üzemmódban
MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottsága ülése, 2013. május 13-14., Balatonalmádi, Magyarország, szóbeli előadás.
- VIII. **László Schönstein**, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Continuous-flow enzymatic preparation of calycotomine enantiomers
15th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, 2013. szeptember 1-5., Olomouc, Cseh Köztársaság, poszter előadás (P-67).

Egyéb előadások

- IX. **László Schönstein**, Enikő Forró, Loránd Kiss, Ferenc Fülöp
Enzymatic hydrolysis of hydroxylated alicyclic β -amino esters
Foldamers: building blocks, structure and function, 2009. szeptember 24-26.,
Szeged, Magyarország, poszter előadás (P-04).
- X. **László Schönstein**, Enikő Forró, Loránd Kiss, Alberto Vega Peñaloza Eusebio,
Juaristi, Ferenc Fülöp
*Direct enzymatic route for the preparation of novel enantiomerically enriched
hydroxylated β -amino ester stereoisomers*
Foldamers: Synthesis and Structure of Functional Materials, 2011. április 7-9.,
Barcelona, Spanyolország, poszter előadás (P-06).