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

Megyesi Rita

Tetrahidro-*β*-karbolin és tetrahidroizokinolin vázas származékok kinetikus és dinamikus kinetikus rezolválása

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Lázár László

Tagok: Prof. Dr. Dombi György

Prof. Dr. Szabó Pál

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Révész Piroska

Opponensek: Dr. Székely Edit

Dr. Szőllősi György

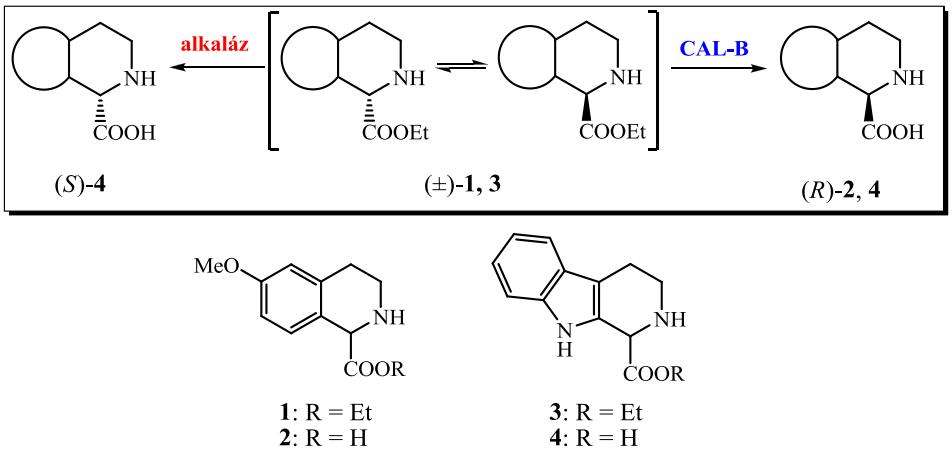
Tagok: Prof. Dr. Tóth Géza

Dr. Hunyadi Attila

1. Bevezetés és célkitűzés

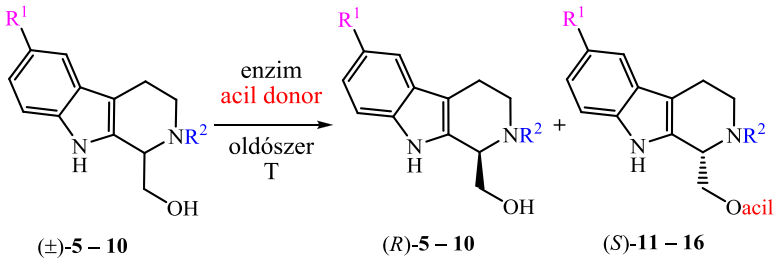
Számos tudományos kutatás foglalkozik tetrahidro-*β*-karbolin és tetrahidroizokinolin vázat tartalmazó enantiomertiszta vegyületek izolálásával, szintézisével és hatástani vizsgálatával. A különösen nagy érdeklődés hátterében a tetrahidro-*β*-karbolin és tetrahidroizokinolin származékok lehetséges farmakológiai aktivitása áll. Az alkaloidok fontos csoportját képezik a tetrahidroizokinolin vázzal rendelkező vegyületek, mint például a köptető hatású emetin (*Ipecacuanhe*) vagy a köhögéscsillapító noszkapin (*Papaver somniferum*). A természetes eredetű lienzin (*Nelumbo nucifera*), szaframicin A (*Myxococcus xanthus*) és a szintetikus alkaloid analóg Zalypsis® ígéretes HIV és rák elleni aktivitását is kimutatták. Tetrahidro-*β*-karbolin alkaloidok, mint például a vinkrisztin, vinblasztin vagy a rezerpin, szintén jól ismertek terápiás jelentőségükről a rák vagy a magas vérnyomás kezelésében.

PhD munkám során célunk volt a 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-karbonsav és a 1,2,3,4-tetrahido-*β*-karbolin-1-karbonsav enantiomertiszta formában történő előállítása, a megfelelő észterek [(±)-**1** és (±)-**3**] enzim katalizált dinamikus kinetikus hidrolízisén keresztül (1. ábra). További tervünk volt a (±)-**3** irányított dinamikus kinetikus rezolválása (DKR), különböző enantiomer preferenciával rendelkező lipázok felhasználásával.



1. ábra

Ezen felül célunk volt az *N*-védett 1-hidroximetil-szubsztituál tetrahidro-*β*-karbolin származékok (±)-**5**–(±)-**10** kinetikus rezolválása (KR) primer hidroxilcsoportjuk enzim katalizált aszimmetrikus *O*-acilezésén keresztül (2. ábra). Továbbá, szubsztrát mérnökség keretében kívántuk megvizsgálni a 6-os és 2-es pozícióban található szubsztituensek enzimes reakcióra gyakorolt hatását.



Szubsztrát vagy termék	R^1	R^2
(±/*R*)-**1** (*S*)-**7**	H	Boc
(±/*R*)-**2** (*S*)-**8**	OMe	Boc
(±/*R*)-**3** (*S*)-**9**	F	Boc
(±/*R*)-**4** (*S*)-**10**	H	acetil
(±/*R*)-**5** (*S*)-**11**	H	Cbz
(±/*R*)-**6** (*S*)-**12**	H	Fmoc

2. ábra

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A racém kiindulási vegyületeket ismert irodalmi eljárások alapján állítottuk elő. Az enzim katalizált előkísérleteket szakaszos vagy folyamatos üzemmódban (H-Cube®) végeztük, félmikro méretben. A folyamatos áramú kísérletek során a kiindulási vegyületet feloldottuk az oldószerben, hozzáadtuk az acil donort majd az elegyet egy HPLC pumpa segítségével áramoltattuk át az enzimmel töltött fűthető és nyomásálló oszlopon (3. ábra).

3. ábra

A preparatív léptékű rezolválást szakaszos üzemmódban hajtottuk végre az előkísérletek során optimalizált reakciókörülmények között. A reakciók előrehaladását királis oszloppal ellátott HPLC segítségével követtük.

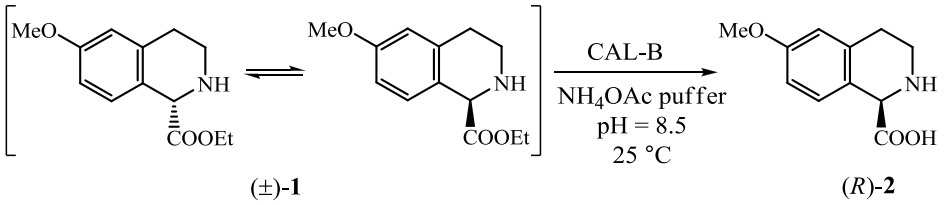
A termék enantiomereket olvadáspont, elemanalízis, optikai forgatóképesség, ^{1}H NMR és ^{13}C NMR adatokkal jellemeztük.

3. Eredmények

3.1. *Tetrahidroizokinolin és tetrahidro-β-karbolin vázas aminosav etil észterek dinamikus kinetikus rezolválása*[II,III]

3.1.1. A 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-karbonsav etil észter [(±)-**1**] CAL-B (*Candida antarctica* lipase B) katalizált dinamikus kinetikus rezolválását (DKR) NH_4OAc pufferben, pH = 8,5-on hajtottuk végre (4. ábra). Az (*R*)-**2** termék a reakcióban csak nyomokban keletkezett (*ee* = 66%, konv. = 90%, 2 nap).

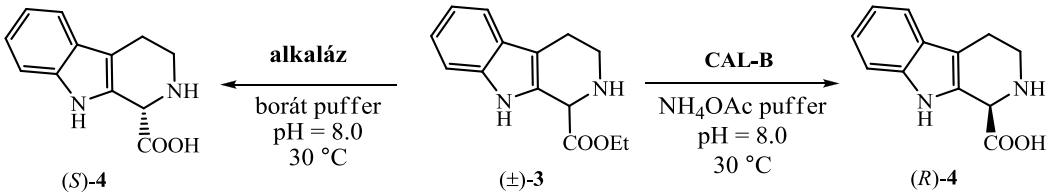
3.1.2. (±)-**1**·HCl preparatív rezolválásának (CAL-B, NH_4OAc pufferben, pH = 8,5, 25 °C) eredményeképpen a termék aminosavat [(*R*)-**2**·HCl] kitűnő *ee*-vel (99%) és termeléssel (91%) izoláltuk.



4. ábra

3.1.3. A 1,2,3,4-tetrahidro-*β*-karbolin-1-karbonsav etil észter [(±)-**3**] rezolválása CAL-B-vel NH_4OAc pufferben (pH = 8,0; 30 °C) magas 97%-os *ee* értékkel és 97%-os konverzióval eredményezte a termék aminosavat [(*R*)-**4**·HCl] már 5 perc reakcióidő után. A reakciókörülmények további módosítása (a puffer típusa, pH, hőmérséklet) nem vezetett a reakciósebesség vagy a szelektivitás jelentős változásához (5. ábra).

3.1.4. Az *S*-aminosav előállítását a szubsztrát (±)-**3**·HCl alkaláz katalizált DKR-val kíséreltük meg NH_4OAc pufferben, pH = 8,0-on és 30 °C-on, azonban a reakció alacsony szelektivitással ment végbe (*ee* = 53%, konv. = 99%, 24 óra). A reakció pH-jának 8,0-ról 9,0-ra történő emelése, bár növelte a reakciósebességet, de egyúttal a szelektivitás csökkenését és előidézte (*ee* = 47%). A NH_4OAc puffer borát pufferre történő cseréje 24 óra elteltével 65%-os *ee*-vel és 99%-os konverzióval eredményezte az (*S*)-**4** terméket.



5. ábra

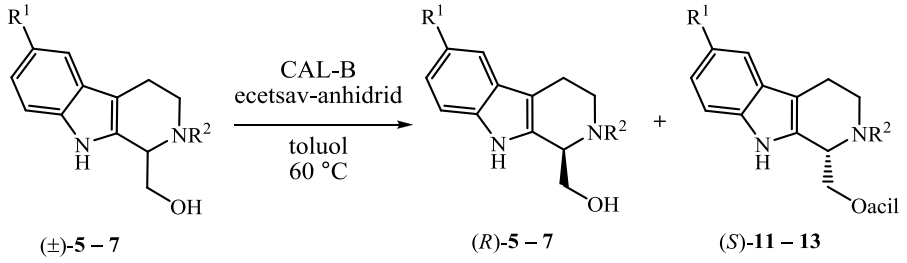
3.1.5. A (±)-**3**·HCl alkaláz katalizált dinamikus kinetikus rezolválását szerves oldószerekben is végrehajtottuk (*t*-BuOMe; *t*-BuOH és NH_4OAc puffer elegyében). A magas konverziók (98% és 45%) ellenére, a kívánt termék [(*S*)-**4**] keletkezését nem tapasztaltuk.

3.1.6. A (±)-**3**·HCl *R*-szelektív CAL-B katalizált preparatív-léptékű rezolválása 98%-os *ee*-vel és 90%-os hozammal eredményezte a termék aminosavat [(*R*)-**4**·HCl] (5. ábra).

3.1.7. Optimalizált körülmények között hajtottuk végre a (±)-**3**·HCl alkaláz katalizált *S*-szelektív preparatív rezolválását (5. ábra). A terméket [(*S*)-**4**·HCl] 60%-os *ee*-vel és 66%-os termeléssel izoláltuk.

3.2. *1-Hidroximetil szubsztituált tetrahidro-β-karbolin vázas származékok kinetikus rezolválása*[I,IV]

3.2.1 Az *N*-Boc-védett 1-hidroximetil-1,2,3,4-tetrahidro-*β*-karbolin [(±)-**5**] kinetikus rezolválásának (6. ábra) optimális körülményeit folyamatos üzemmódú reaktor használatával határoztuk meg (CAL-B, *i*-Pr_2O, ecetsav-anhidrid, 60 °C) (3. ábra). Az optimalizált körülmények között végrehajtottuk a (±)-**5** rezolválását szakaszos üzemmódban. A reakció jó konverziót mutatott 3 óra után, azonban az enantioszelektivitása alacsonyabb volt, mint a folyamatos áramú reaktorban (*E* = 36 *vs.* >200) ezért a *i*-Pr_2O toluolra cseréltük.



5 és **11**: R^1 = H, R^2 = Boc; **6** és **12**: R^1 = OMe, R^2 = Boc; **7** és **13**: R^1 = F, R^2 = Boc

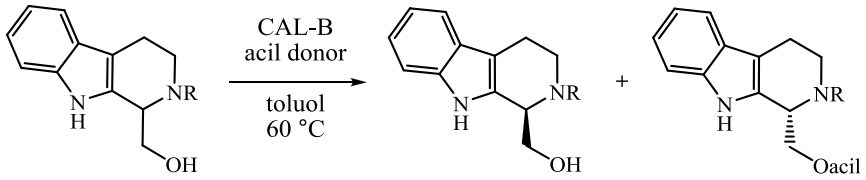
6. ábra

3.2.2. A (±)-**5** rezolválása esetében, a maximális 50% konverzió eléréséhez, az ecetsav-anhidrid mennyiségét 1,1 ekvivalensről 2 ekvivalensre növeltük. A reakció 3 óra után elérte az 50%-os konverziót kitűnő enantioszelektivitás mellett (>200).

3.2.3. Az optimalizált reakciókörülményeket kiterjesztettük a (±)-**6** és a (±)-**7** vegyületek acilezésére. Annak érdekében, hogy elkerüljük az alacsonyabb reakciósebességből eredő szelektivitás csökkenést [(±)-**6**: E = 82, konv. = 42% és (±)-**7**: E = 39, konv. = 45%], az ecetsav-anhidrid mennyiségét 2 ekvivalensről 6 és 8 ekvivalensre növeltük.

3.2.4. A (±)-**5**–(±)-**7** preparatív-léptékű rezolválását CAL-B-vel, toluolban, ecetsav-anhidrid jelenlétében, szakaszos üzemmódban és 60 °C-on hajtottuk végre. A reakció eredményeképpen a termékeket [(*R*)-**5**–(*R*)-**7** és (*S*)-**11**–(*S*)-**13**] kitűnő *ee*-vel (>96%) és termelésekkel (≥45%) izoláltuk.

3.2.5. Az *N*-acetil- [(±)-**8**], *N*-Cbz- [(±)-**9**] és *N*-Fmoc-védett [(±)-**10**] szubsztrátok kinetikus rezolválását CAL-B-vel, ecetsav-anhidrid jelenlétében, toluolban és 60 °C-on hajtottuk végre (7. ábra). Az *N*-acetil [(±)-**8**] nem bizonyult megfelelő védőcsoportnak a reakcióban végbemenő *N*→*O* és *O*→*N* acil-migráció miatt (7. ábra).



(±)-**5**, **8 – 10**
(±)-**5**: R = Boc
(±)-**8**: R = acetil
(±)-**9**: R = Cbz
(±)-**10**: R = Fmoc

(*R*)-**5**, **8 – 10**
(*R*)-**5**: R = Boc
(*R*)-**8**: R = acetil
(*R*)-**9**: R = Cbz
(*R*)-**10**: R = Fmoc

(*S*)-**11**, **14 – 16**
(*S*)-**11**: R = Boc
(*S*)-**14**: R = acetil
(*S*)-**15**: R = Cbz
(*S*)-**16**: R = Fmoc

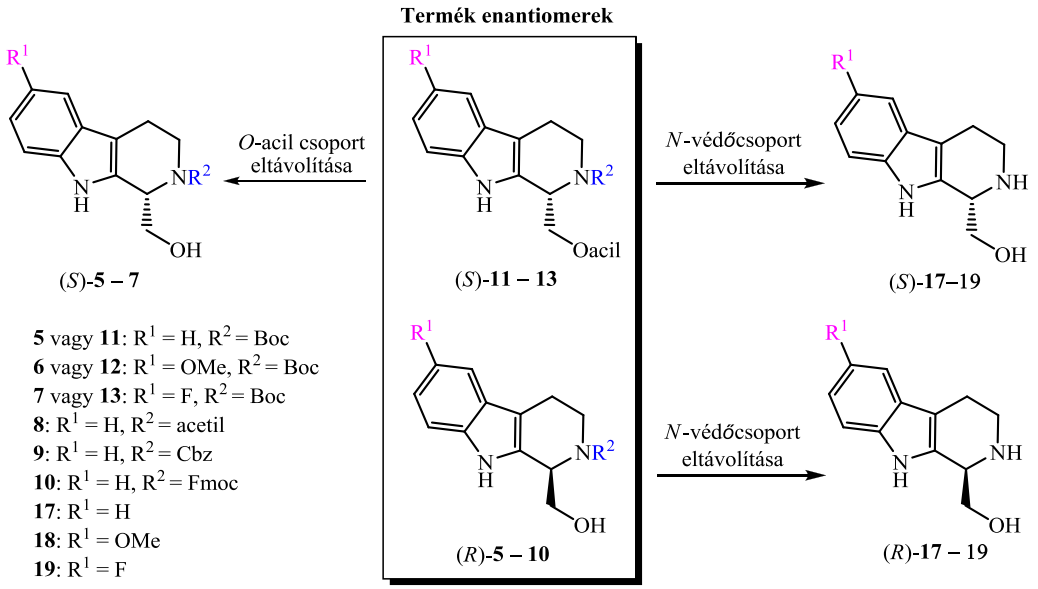
7. ábra

3.2.6. A (±)-**9** és (±)-**10** szubsztrátok rezolválása során a reakciók 41-45%-os konverziónál megálltak. A reakciósebesség növelése érdekében az alkalmazott ecetsav-anhidrid mennyiségét kétszeresére emeltük (2 ekvivalensről 4 ekvivalensre).

3.2.7. A (±)-**9** és (±)-**10** kiindulási vegyületek preparatív rezolválása magas *ee*-vel (≥88%) és hozammal (≥44%) eredményezte a termék enantiomereket [(*R*)-**9**, (*R*)-**10**, (*S*)-**15** és (*S*)-**16**] (7. ábra).

3.2.8. Az enzimes reakciókban keletkezett (*S*)-**11**–(*S*)-**13** aminosav-észtereket metanolízissel alakítottuk tovább (*S*)-**5**–(*S*)-**7** termékekké (K_2CO_3 jelenlétében, MeOH, 60 °C), anélkül, hogy az *ee* értékek csökkenését tapasztaltuk volna (*ee* = 98%, hozam = 75-90%) (8. ábra). A védőcsoport eltávolítást is elvégeztük az (*S*)-**5**–(*S*)-**7,** (*S*)-**11**–(*S*)-**13**, (*R*)-**9** és (*R*)-**10** termékek esetében. Az *N*-Cbz [(*R*)-**9**] védőcsoport eltávolításakor szignifikáns *ee* érték csökkenést figyeltünk meg (88%-ról 77%-ra).

3.2.9. Szisztematikus vizsgálatba kezdtünk, hogy megállapítsuk a különböző szubsztituensek a 6-os [(±)-**5,** (±)-**6** és (±)-**7**] és 2-es pozícióban [(±)-**5,** (±)-**9** és (±)-**10**], hogyan befolyásolják a kinetikus rezolválás reakciósebességét és enantioszelektivitását azonos reakciókörülmények között (2. ábra). Az enantioszelektivitás tekintetében az enzim rendkívül toleránsnak bizonyult a különböző szubsztituensekkel szemben a 2-es és a 6-os pozícióban. A szubsztituensek reakciósebességre gyakorolt hatása jelentős volt, azonban a védőcsoport mérete és a reakció sebessége között nem találtunk összefüggést.



8. ábra

Publikációk

Az értekezés alapját képező publikációk:

I. **R. Megyesi**, E. Forró, F. Ferenc

Enzymatic strategy for the resolution of new 1-hydroxymethyl tetrahydro-*β*-carboline derivatives in batch and continuous-flow systems

ChemistryOpen **2016**, *5*, 254-260. **IF: 2.801***

II. E. Forró, **R. Megyesi**, T.A. Paál, F. Ferenc

Efficient dynamic kinetic resolution method for the synthesis of enantiopure 6-hydroxy- and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic acid

Tetrahedron: Asymmetry **2016**, *27*, 1213-1216. **IF: 2.126****

III. **R. Megyesi**, A. Mándi, T. Kurtán, E. Forró, F. Fülöp

Dynamic kinetic resolution of ethyl 1,2,3,4-tetrahydro-*β*-carboline-1-carboxylate. Use of different hydrolases for stereocomplementary processes.

Eur. J. Org. Chem. **2017**, 4713-4718. **IF: 2.882***

IV. **R. Megyesi**, E. Forró, F. Fülöp

Substrate engineering: Effects of different *N*-protecting groups in the CAL-B catalysed asymmetric *O*-acylation of 1-hydroxymethyl-tetrahydro-β-carbolines.

Tetrahedron **2018**, *74*, 2634-2640. **IF: 2.377***

Egyéb publikációk:

I. G. Lajkó, N. Grecsó, **R. Megyesi**, E. Forró, F. Fülöp, D. Wolrab, W. Lindner, A. Péter, I. Ilisz

Enantioseparation of *β*-carboline derivatives on polysaccharide- and strong cation exchanger-based chiral stationary phases. A comparative study

J. Chromatogr. A **2016**, *1467*, 188-198. **IF: 3.716***

II. B. Kovács, **R. Megyesi**, E. Forró, F. Fülöp

Efficient lipase-catalysed route for the kinetic resolution of salsolidine and its *β*-carboline analogue

Tetrahedron: Asymmetry **2017**, *28*, 1829-1833. **IF: 2.126****

Összesített impakt faktor: 16.028
*2017-es impakt faktor.
**2016-os impakt faktor.

Előadások

a. **Megyesi R.**, Forró E., Fülöp F.
Új enzimes módszer gyógyszerkémiai jelentőségű tetrahidro-*β*-karbolinvázas amino-alkoholok rezolválására
MTA Alkaloidkémiai és Flavonoidkémiai munkabizottság, Balatonalmádi, május 12-13, **2014** (orális előadás)

b. **R. Megyesi**, E. Forró, F. Fülöp
Enzyme-catalysed kinetic resolution of 1-hydroxymethyl-2,3,4,9-tetrahydro-*β*-carbolines in batch and continuous flow reactions
Chirality, Prague, 27-30 July, **2014** (poster)

c. **R. Megyesi**, E. Forró, F. Fülöp
New enzymatic strategy for the resolution of tetrahydro-*β*-carboline amino-alcohol derivatives in batch and continuous-flow system
Biotrans, Vienna, 26-30 July, **2015** (poster).

d. **R. Megyesi**, A. Mándi, T. Kurtán, E. Forró, F. Fülöp
Directed dynamic kinetic enzymatic strategy for the preparation of both enantiomers of 1,2,3,4-tetrahydro-*β*-carboline-1-carboxylic acid
SECAT17, Oviedo, 26-28 June, **2017** (poster)