

Tetrahydroizokinolin-vázis vegyületek enzimés rezolválása szakaszos és áramlásos kémiai módszerrel

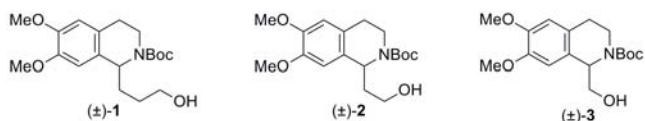
SCHÖNSTEIN László, FORRÓ Enikő és FÜLÖP Ferenc*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai Intézet, Eötvös utca 6., 6720, Szeged

1. Bevezetés

Atetrahydroizokinolin-vázis vegyületeknek jelentős szerepük van kémiai és biológiai szempontból.¹ Fontos építőelemei a természetben előforduló egyes növényi alkaloidoknak, mint például a tumor ellenes hatással rendelkező Kriszpin A-nak, amit a *fodros bogáncsból* (*Carduus crispus*)², vagy a kalikotominnak, amit a *Calycotome spinosa* nevű növényből izoláltak először.³ A gyógyszergyártásban is fontos szerepe van ezen enantiomertiszta vegyületeknek, hiszen egyes terápiás hatással rendelkező gyógyszermolekuláknak alapvető szerkezeti részei. Ilyen gyógyszerek például a köhögéscsillapító noszkapin⁴, a köptető hatású emetin⁵, a daganat ellenes trabectedin (Yondelis® név alatt).⁶ Az 1-metil és 1-fenil tetrahydroizokinolinoknak jelentős szerepük van Parkinson kór és egyes neurológiai betegségek kezelésében is.⁷

Tetrahydroizokinolin-vázis célvegyületeinket, azaz a kalikotomin, a homokalikotomin és a kriszpin A mindkét enantiomerét nagy enantiomerfelesleggel enzimkatalizált kinetikus rezolválással terveztük előállítani. A kísérletek elvégzéséhez a megfelelő intermedier (±)-**1**, (±)-**2** és (±)-**3** aminoalkoholokat választottunk kiindulási anyagokként, amelyek aminocsoportját Boc-védőcsoporttal láttuk el, az enzimés acilezést pedig a kiralitás centrumtól egy, kettő, *ill.* három szénatomnyi távolságra lévő primer hidroxilcsoporton kívántuk elvégezni (1. ábra). Az irodalomból ismert, hogy a kiralitáscentrumtól több szénatomnyi távolságra lévő primer hidroxilcsoportok enzimés acilezése, mind szakaszos, mind folyamatos áramú üzemmódban alacsony enantioszelektivitással ($E \leq 11,6$) játszódik le.⁸



1. Ábra. Kiindulási aminoalkoholok.

Az enzim-katalizált kinetikus rezolválást szakaszos és áramlásos kémiai módszerekkel terveztük megvalósítani.

Szisztematikusan vizsgálni kívántuk továbbá a reakciócentrum és kiralitáscentrum közötti távolság változtatásának a hatását az enantioszelektivitásra és a reakciósebességre.

Célvegyületeink közül az (*S*)-kalikotomin enantiomertiszta formában történő előállítása ismert az irodalomból, amely szintézisút egy aszimmetrikus redukciós lépést tartalmaz, amit irídium(I)-(*R*)-BINAP-ftalimid komplexszel végezték.⁹ Az irodalomban szintén leírták az 1,2,3,4-

tetrahydroizokinolin-1-karbonsav etilészter enzimés hidrolízisét, majd az így kapott 1,2,3,4-tetrahydroizokinolin-1-karbonsav enantiomerből, az abszolút konfiguráció meghatározása céljából egy redukciós lépéssel állították elő az (*R*)-kalikotomint ($ee = 91\%$).¹⁰

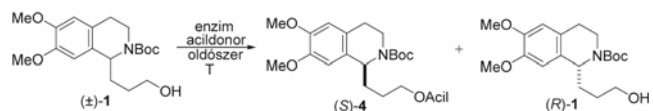
Az áramlásos üzemmódban végzett kísérletek napjainkban egyre nagyobb teret hódítanak,¹¹ hiszen ezen módszer használatának számos előnye van, így a reprodukálhatóság, gazdaságos oldószerhasználat, rövid reakcióidő, gyorsan és egyenletesen fűthető és kompresszálnak rendszer.¹² Az áramlásos üzemmódban lehetővé válik számos heterogén fázisú reakció megvalósítása, amihez különböző katalizátorokat lehet használni: fém katalizátort,¹³ peptid¹⁴ és nem utolsósorban enzim katalizátort.¹⁵

2. Kísérleti eredmények

2.1. Kriszpin A enantiomerek szintézise

A racém kiindulási anyagot az irodalomból ismert módszerrel állítottuk elő.¹⁶ Első lépésben homoveratrilamint reagáltattunk γ -butirolaktonnal, majd az így kapott amidon Bischler-Napieralski gyűrűzárási reakciót végeztünk. A következő lépésben a gyűrűzárásból kapott 1-(3-acetoxipropil)-6,7-dimetoxi-3,4-dihydroizokinolint egy nátrium-borohidrides reakciónak alávetve kaptuk meg az 1-(3-hidroxiopropil)-6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahydroizokinolint, melyet Boc védőcsoporttal védtük.

A (±)-**1** vegyület enzimkatalizált acilezésének (2. ábra) optimális reakciókörülményeinek meghatározása érdekében előkísérleteket végeztünk, szakaszos kémiai módszerrel.



2. Ábra. A (±)-**1** vegyület enzim katalizált acilezése.

Az előkísérletek során megvizsgáltuk különböző enzimek enantioszelektivitására és reakciósebességre gyakorolt hatását, mely eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. CAL-A (*Candida antarctica* A lipáz), AK lipáz (*Pseudomonas fluorescens*), PPL (sertés hasnyálmirigy lipáz), és AY lipáz (*Candida rugosa*) használata esetében nem volt megfigyelhető reakció 1 óra után, CAL-B (*Candida antarctica* B lipáz) esetében viszonylag gyorsan, de szelektivitás nélkül zajlódtott a reakció (1. sor), míg PS lipáz (*Burkholderia cepacia*) használata esetében alacsony szelektivitási érték ($E < 2$) volt tapasztalható (2. sor).

* Levelező szerző. Tel.: 62/545-562; fax: 62/545-705; e-mail: fulop@pharm.u-szeged.hu.

1. Táblázat. A (\pm)-**1**^a vegyület enzimkatalizált acilezésének hatása a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra.

Sor	Enzim	Acil-donor (ekv.)	Oldószer	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	<i>E</i>
1	CAL-B	vinil-acetát (1,1)	<i>i</i> Pr ₂ O	<i>rac.</i>	<i>Rac.</i>	43	1
2	PS lipáz ^c	vinil-acetát (1,1)	<i>i</i> Pr ₂ O	4	22	15	1,6
3	PS lipáz ^c	<i>i</i> -propenil-acetát (1,1)	<i>i</i> Pr ₂ O	8	35	19	2,2
4	PS lipáz ^c	vinil-butirát (1,1)	<i>i</i> Pr ₂ O	12	71	14	7
5	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (1,1)	<i>i</i> Pr ₂ O	9	85	10	13
6	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (1,1)	toluol	5	67	7	5
7	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (1,1)	<i>n</i> -hexán	26	88	23	20
8	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (1,1)	<i>t</i> -BuOMe	10	95	10	43
9	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (1,1)[+ Et ₃ N, + Na ₂ SO ₄]	<i>t</i> -BuOMe	15	95	14	45
10	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (3)[+ Et ₃ N, + Na ₂ SO ₄]	<i>t</i> -BuOMe	19	96	17	59
11	PS lipáz ^c	vinil-dekanoát (4)[+ Et ₃ N, + Na ₂ SO ₄]	<i>t</i> -BuOMe	33	95	26	53

^a 0,0125 M szubsztrát, 30 mg mL⁻¹ enzim, 1 mL oldószer, acil donor, 45 °C, reakcióidő 1 h.

^b HPLC-vel meghatározva [Chiralpak IA oszlop, eluens: *n*-hexán:*i*PA (85:15), áramlási sebesség: 0,5 mL min⁻¹, detektálás 260 nm-en].

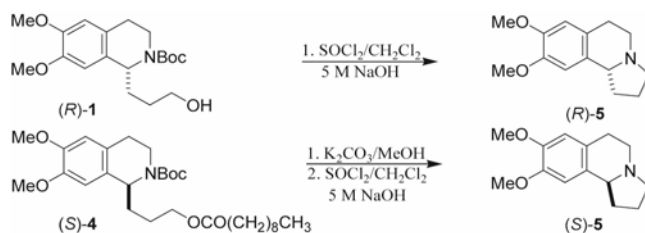
^c 20% lipáz tartalmú, cukor jelenlétében celitre adszorbeált.

Az előkísérletek következő szakaszában acildonor vizsgálatot végeztünk (1. táblázat, 2-5. sorok). A viszonylag hosszú szénláncú acildonor (vinil-dekanoát) használata esetében az enantioszelektivitás növekedését tapasztaltuk (10%-os konverziónál *E* = 13) (5. sor).

Az optimális reakciókörülmények meghatározása céljából a *i*Pr₂O mellett több oldószer is kipróbálásra került (5-8 sorok). Az enantioszelektivitás függvényében (*E* = 43) az ipar által zöld oldószerként elfogadott *t*-BuOMe-t választottuk a további előkísérletekhez.

Az előkísérletek utolsó szakaszában acildonor mennyiségének és adalékanyagok reakcióelegyhez való hozzáadásának reakció lefutására gyakorolt hatását vizsgáltuk (9-11. sorok). Három ekvivalens vinil-dekanoát, Et₃N és Na₂SO₄ egyidejű használata esetében a reakció enantioszelektivitása tovább emelkedett (11. sor).

Az előkísérletek során optimálisnak talált körülmények között (PS lipáz, vinil-dekanoát, *t*-BuOMe, Et₃N és Na₂SO₄, 45 °C) a (\pm)-**1** preparatív mennyiségű rezolválását két lépésben végeztük. A kapott alkohol (*R*)-**1** és észter (*S*)-**4** termékeket oszlopkromatográfiás elválasztásuk után igen jó enantiomerfelesleggekkel ($ee > 94\%$) jellemeztük.

**3. Ábra.** Kriszpin A enantiomerek előállítás.

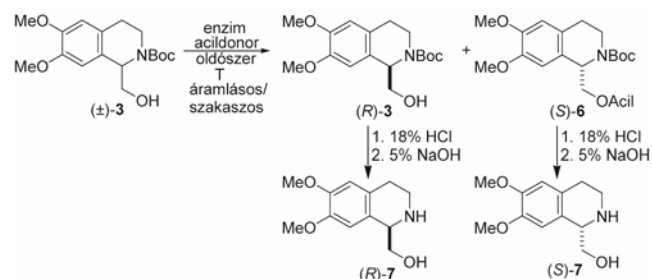
Az enantiomertiszta észtert (*S*)-**4** előzetesen alkohollá alakítottuk (K₂CO₃), majd az így kapott terméket (*S*)-**1**,

valamint az enzimikus reakcióból visszamaradó elreagálatlan alkohol enantiomert (*R*)-**1** egy lépésben alakítottuk (Boc védőcsoport eltávolítása és gyűrűzárás) a kívánt kriszpin A enantiomerekké ($ee = 95\%$) (3. ábra).^{17a}

2.2. Kalikotomin enantiomerek szintézise

A (\pm)-**3** homológ aminoalkohol enantioszelektív acilezésére a korábban bemutatott szakaszos kémiai módszert folyamatos áramú módszerrel kibővítve terveztük elvégezni. Az optimális körülmények meghatározása végett egy sor előkísérletet végeztünk folyamatos áramú üzemmódban (4. ábra). A kísérleteket egy folyamatos áramú reaktorban (H-Cube) végeztük „No H₂” üzemmódban. A reagáltatni kívánt szubsztrátot és reagenst feloldottuk, majd a reakcióelegyet egy HPLC pumpa segítségével, átáramoltattuk egy fűthető és kompresszáható foglalatba helyezett enzim töltetű katalizátor ágyon.

A (\pm)-**3** vegyületet az irodalomból ismert szintetikus úton állítottuk elő.^{16c,d}

**4. Ábra.** A (\pm)-**3** vegyület enzim katalizált acilezése.

Az előkísérletek során megvizsgáltuk különböző enzimek hatását a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra (2. táblázat). A vizsgált enzimek közül a PPL lipáz nem katalizálta a reakciót, CAL-A használata esetében pedig nem volt szelektivitás tapasztalható (1. sor), AY és PS lipáz

esetében alacsony szelektivitási értéket kaptunk (2-3. sorok). CAL-B-vel végzet kísérletek során sikerült kiváló $E > 200$ -t elérni 35%-os konverzió mellett (4. sor).

2. Táblázat. A (\pm)-**3**^a vegyület enzim vizsgálata.

Sor	Enzim	T (°C)	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	CAL-A ^c	45	rac.	rac.	14	1
2	AY lipáz ^c	45	4	50	7	3
3	PS-IM lipáz	45	6	54	10	3
4	CAL-B	60	52	99	35	> 200

^a 0,012 M szubsztrát, 2 ekv. vinil-acetát, 80 bar, 60 °C, 0,1 mL min⁻¹ áramlási sebesség.

^b HPLC-vel meghatározva [Chiralpak IA oszlop, eluens: *n*-hexán:*i*PA (85:15), áramlási sebesség: 0,5 mL min⁻¹, detektálás 260 nm-en].

^c 20% lipáz tartalmazó, cukor jelenlétében celitre adszorbeált.

A kinetikus rezolválás során elérhető maximális konverzió (50%) egy körben történő elérése céljából további előkísérletek keretében vizsgáltuk az oldószerek reakciósebességre gyakorolt hatását (3. táblázat, 1-3. sorok). *t*-BuOMe-ben végzett kísérletek esetében a reakciósebességének jelentős csökkenése mellett a szelektivitása váratlanul $E = 45$ -re csökkent (2. sor). Toluolban végezve az acilezést kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$) tapasztaltunk és a reakció konverziója elérte a kívánt 50 %-ot (3. sor).

3. Táblázat. A (\pm)-**3**^a vegyület oldószere és hőmérséklet vizsgálata.

Sor sz.	Oldószere	T (°C)	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	<i>n</i> -hexán	60	52	99	35	> 200
2	<i>t</i> -BuOMe	60	15	95	14	45
3	toluol	60	99	99	50	> 200
4	toluol	40	92	99	48	> 200
5	toluol	25	71	99	42	> 200

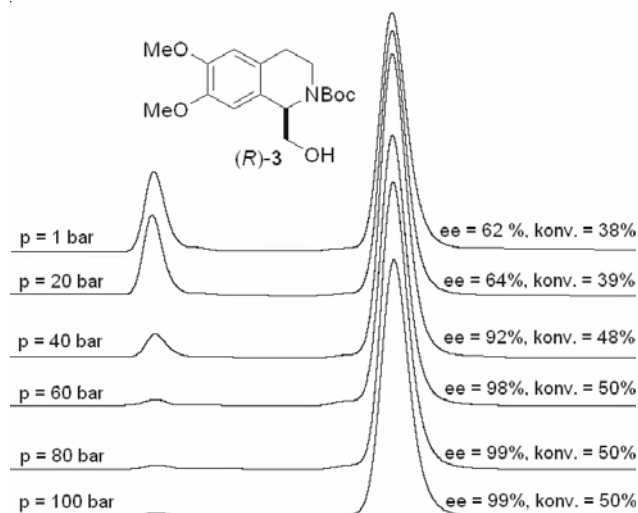
^a 0,012 M szubsztrát, 2 ekv. vinil-acetát, CAL-B, 80 bar, 60 °C, 0,1 mL min⁻¹ áramlási sebesség.

^b HPLC-vel meghatározva

Továbbá vizsgálatra kerül a hőmérséklet (3. táblázat, 3-5. sorok) hatása az enantioszelektivitásra, ahol az volt a tapasztalat, hogy a hőmérséklet csökkentésével a reakció konverziója is csökkent. 60 °C-on a konverzió 50% (3. sor) volt, azonban 25 °C-on ez az érték 42%-ra csökkent (5. sor).

Mivel az előkísérleteket folyamatos áramú üzemmódban végeztük, ezért lehetővé vált megvizsgálni a nyomás hatását is a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra (5. ábra).

Atmoszférikus nyomáson végzett reakciók esetében a konverzió 38% volt a szubsztrát enantiomerfeleslege pedig 62%, majd 20 bar egységenként növeltük a nyomást



5. Ábra. A nyomás hatása a reakciósebességre.

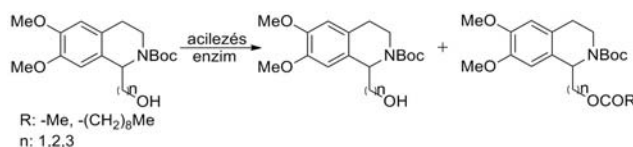
és azt tapasztaltuk, hogy a nyomás növelésével a reakció konverziója és a szubsztrát enantiomerfeleslege is nőtt, egészen 60 bar nyomásig, ahol a reakció elérte az 50%-os konverziót 98%-os szubsztrát enantiomerfelesleg mellett. A nyomás tovább növelésének már nem volt hatása a konverzióra és az enantiomerfeleslegre. A szelektivitási érték a nyomás vizsgálat során végig 200 fölött volt.

Az előkísérleteket 4 mg/mL (0,012 M) szubsztrát koncentrációban végeztük, és amikor ezt a koncentrációt ötszörösére, majd tízszeresére növeltük, abban az esetben is megmaradt az 50% konverzió melletti 200 feletti enantioszelektivitás.

Az előkísérletek során kapott eredmények alapján az optimális körülmények között végeztük el a gramm mennyiségű rezolválást szakaszos kémiai módszerrel. Így az *N*-Boc védett (\pm)-**3** aminoalkohol enzim úton történő acilezésével sikerült enantiomertiszta ($ee = 99\%$) termékeket [(*R*)-**3** és (*S*)-**6**] izolálni nagy enantioszelektivitással ($E > 200$). Az így kapott enantiomertiszta termékekből egy hidrolízises lépéssel sikerült a Kalikotomin mindkét enantiomerét előállítani 99%-os enantiomerfelesleggel.^{17b}

2.3. Reakciócentrum és kiralitáscentrum közötti távolság vizsgálata

Primer hidroxilcsoporttal rendelkező vegyületek enzim rezolválása során a reakciócentrum és a kiralitáscentrum közötti távolság változása eltérő enantioszelektivitást és reakciósebességet eredményezhet. Ezért a krispin A intermedier ($n = 3$) enantiomertiszta előállítására optimálisnak talált reakciókörülmények között végeztünk el egy reakciósorozatot és megvizsgáltuk ezen körülmények között az enantioszelektivitásra és a reakciósebességre gyakorolt hatását a kalikotomin és a homokalikotomin intermedierekre esetében (6. ábra).



6. Ábra. Reakciócentrum és kiralitáscentrum közötti távolság változtatása.

A reakciósorozatban (4. táblázat) az volt a tapasztalat, hogy ha három szénatomnyi távolságra ($n = 3$) van a reakciócentrum a kiralitáscentrumtól akkor a reakció 17%-os konverzió mellett $E = 59$ enantioszelektivitást értünk el. Ha ez a távolság egy szénatommal rövidebb ($n = 2$, homokalikotomin intermedier) a reakció enantioszelektivitása 4,8-ra csökken 27%-os konverzió mellett. A kalikotomin intermedier estében, mikor a reakciócentrum és a kiralitáscentrum közötti távolság egy szénatom ($n = 1$) a reakció nem is játszódik le az optimálisnak talált körülmények között.

4. Táblázat. [(±)-1-(±)-3]^a vegyületek enzimés rezolválása PS lipázzal.

n	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
3	19	96	17	59
2	34	90	27	4,8
1	nincs reakció			

^a 0,0125 M szubsztrát, 30 mg mL⁻¹ PS lipáz, 1 mL *t*-BuOMe, vinil-dekanoát [+ Et₃N, + Na₂SO₄], 45 °C, reakcióidő 1 h.

^b HPLC-vel meghatározva.

A reakciócentrum és a kiralitáscentrum közötti távolság változtatás hatásának a vizsgálata következő szakaszában egy újabb reakciósorozatot végeztünk a kalikotomin intermedierre optimálisnak talált reakciókörülmények között.

5. Táblázat. [(±)-1-(±)-3]^a vegyületek enzimés rezolválása CAL-B-vel.

n	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	99	99	50	> 200
2	41	56	42	5,2
3	rac.	rac.	64	1

^a 0,012 M szubsztrát, 2 ekv. vinil-acetát, CAL-B, 80 bar, 60 °C, 0,1 mL min⁻¹.

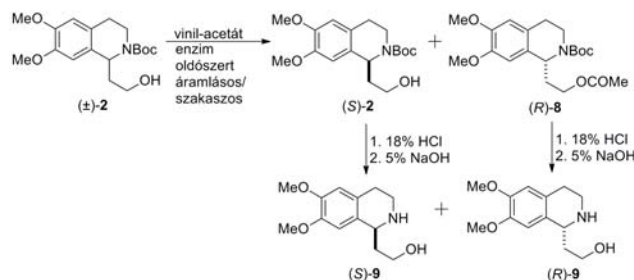
^b HPLC-vel meghatározva.

Ebben a reakciósorozatban (5. táblázat) épp az ellenkezője volt tapasztalható, mint a kriszpin A intermedierre optimálisnak talált reakciókörülmények között, hiszen ha a reakciócentrum és a kiralitáscentrum között egy szénatomnyi távolság van abban az esetben értük el a legmagasabb szelektivitási értéket $E > 200$ (1. sor). Azonban ha ezt a távolság növekedett a reakció szelektivitása is csökkent (2. és 3. sorok), egészen $E = 1$ -ig, amit a Kriszpin A intermedier ($n = 3$) három szénatomnyi távolság esetében tapasztaltunk.

2.4. Homokalikotomin enantiomerek szintézise

Mivel a kriszpin A és a kalikotomin intermedierekre az előkísérletek során optimálisnak talált reakciókörülmények nem bizonyultak megfelelőnek a homokalikotomin intermedier enantiomertiszta formában történő előállítására (7. ábra), ezért egy újabb sor előkísérletre volt szükség. A kísérletekhez szükséges kiindulási anyagokat az

irodalomból ismert úton állítottuk elő.^{16c,d} Az előkísérleteket folyamatos üzemű rendszerben végeztük, kihasználva a módszerben rejlő előnyöket (rövid reakcióidő).



7. Ábra. A (±)-2 vegyület enzim katalizált acilezése.

Az előkísérleteket ebben az esetben is enzimvizsgálattal kezdtük. A vizsgált enzimek közül CAL-A, PS IM és a PPL lipáz esetében nem volt reakció tapasztalható. AK lipáz használata esetében alacsony 1,6-os enantioszelektivitást mértünk (6. táblázat, 1 sor), CAL-B lipáz használata esetében ez az érték 5,2 volt (2. sor).

6. Táblázat. A (±)-2^a vegyület enzim és hőmérséklet vizsgálata.

Sor sz.	Ezim	T (°C)	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	AK lipáz	45	10	20	33	1,6
2	CAL-B	60	41	56	42	5,2
3	CAL-B	40	17	80	18	10
4	CAL-B	25	17	90	16	22

^a 0,012 M szubsztrát, 4 ekv. vinil-acetát, toluol, 80 bar, 0,1 mL min⁻¹

^b HPLC-vel meghatározva [Chiralpak IA oszlop, eluens: *n*-hexán:IPA (85:15), áramlási sebesség: 0,5 mL min⁻¹, detektálás 260 nm-en].

Az előkísérleteket hőmérséklet vizsgálattal folytattuk az optimális reakciókörülmények meghatározása végett (6. táblázat) és a hőmérséklet csökkentésének hatására a reakció enantioszelektivitása nőtt, a konverzió pedig csökkent (3. és 4. sorok).

7. Táblázat. A (±)-2^a vegyület oldószer vizsgálata.

Sor sz.	Oldószer	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	<i>t</i> -BuOMe	7	26	21	1,8
2	<i>n</i> -hexán	4	5	44	1,1
3	toluol	17	90	16	22

^a 0,012 M szubsztrát, 4 ekv. vinil-acetát, CAL-B, 80 bar, 60 °C, 0,1 mL min⁻¹

^b HPLC-vel meghatározva.

Különböző oldószerekben (7. táblázat) is elvégeztük a reakciókat azonban a legnagyobb szelektivitási értéket a toluolban végzett kísérletek esetében értük el (3. sor). A folyamatos áramú üzemű rendszerben végzett előkísérletek után szakaszos üzemű rendszerben folytattuk és megvizsgáltuk különböző adalékanyagok (katalitikus mennyiség) hatását az enantioszelektivitásra és reakciósebességre 3 °C-on (8.

táblázat). Et₃N és Na₂SO₄ egyidejű használata esetében értük el a legjobb enantioszelektivitást ($E = 88$).

8. Táblázat. A (\pm)-2^a vegyület enzim katalizált acilezéséhez használt adalékanyagok hatása a reakciósebességre és az enantioszelektivitásra.

Sor sz.	Adalékanyag	ee_s^b (%)	ee_p^b (%)	Konv. (%)	E
1	-	12	96	11	55
2	LiCl	15	83	15	12
3	KCl	14	86	14	15
4	N,N-diizopropiletamin	41	81	34	14
5	Et ₃ N	22	96	19	60
6	Et ₃ N + Na ₂ SO ₄	30	97	24	88

^a0,012 M szubsztrát, 30 mg mL⁻¹ CAL-B, 4 ekv. vinil-acetát, 1 mL toluol, 3 °C, reakcióidő 10 min.

^bHPLC-vel meghatározva.

Majd ezen optimalizált paraméterek között elvégeztük a preparatív mennyiségű rezolválást két lépésben, melyek során jó ee -vel ($\geq 94\%$) kaptuk meg az aminoésztert (R)-**8** és az el nem reagált aminoalkoholt (S)-**2**. Ezen termékekből az enantiomerfelesleg csökkenése nélkül ($ee \geq 94\%$) tudtuk a kívánt homokalikotomin mindkét enantiomerét előállítani.^{17c}

3. Összefoglalás

Optimalizáltuk a kalikotomin, homokalikotomin és kriszpin A intermedierjeinek folyamatos és szakaszos üzemmódban végzett enzim rezolválásának körülményeit. A preparatív mennyiségű rezolválásokat mindegyik esetben szakaszos módszerrel valósítottuk meg és a termékeket nagy enantiomerfelesleggel ($ee \geq 94\%$) izoláltuk.

Szisztematikusan vizsgáltuk a reakciócentrum kiralitás-centrumtól való távolságának az enantioszelektivitásra és a reakciósebességre gyakorolt hatását, két optimalizált körülményre. PS lipáz használata esetén a távolság csökkenése az enantioszelektivitás csökkenéséhez vezetett ($E = 59 \rightarrow 1$), míg CAL-B esetén a távolság növelése eredményezte az enantioszelektivitás csökkenését ($E = 200 \rightarrow 1$).

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA NK-81371, K-108943 és a TÁMOP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0035 támogatásáért

Hivatkozások

- (a) Herbert, R. B. in *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, Eds.; Philips, J. D.; Roberts, M. F.; Zenk, M. H. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, **1985**, pp. 213. (b) Chrzanowska, M.; Rozwadowska, M. D.; *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 3341-3370. (c) Miyazaki, M.;

- Ando, N.; Sugai, K.; Seito, Y.; Fukuoka, H.; Kanemitsu, T.; Nagata, K.; Odanaka, Y.; Nakamura, K. T.; Itoh, T. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 534-542.
- Zhang, Q.; Tu, G.; Zhao, Y.; Cheng, T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6795-6798.
- White, E. P. *New Zealand J. Sci. Tech.* **1944**, *25B*, 137-162.
- Al-Yahya, M. A.; Hassan, M. M. A. *Anal. Profiles Drug Subst.* **1982**, *11*, 407-461.
- Boyd, E. M.; Knight, L. M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1964**, *16*, 118-124.
- (a) Ortín, I.; González, J. F.; Cuesta, E.; Manguan-García, C.; Perona, R.; Avendaño, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9065-9078. (b) Cuevas, C.; Francesch, A. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 322-337. (c) Schwartsman, G.; Brondani da Rocha, A.; Mattei, J.; Lopes, R. M. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 1367-1383.
- Taniyama, D.; Hasegawa, M.; Tomioka, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 221-223.
- Sabbani, S.; Hedenström, E.; Andersson, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1712-1720.
- Morimoto, T.; Suzuki, N.; Achiwa, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 183-187.
- Paál, T. A.; Liljebblad, A.; Kanerva, L. T.; Forró, E.; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5269-5276.
- Wegner, J.; Ceylan, S.; Kirschning, A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4583-4592.
- Wiles, C.; Watts, P. *Green Chem.* **2012**, *14*, 38-54.
- Falus, P.; Boros, Z.; Hornyánszky, G.; Nagy, J.; Darvas, F.; Üрге, L.; Poppe, L. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1310-1312.
- Ötvös, S. B.; Mándity, I. M.; Fülöp, F. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 266-269.
- Tomin, A.; Hornyánszky, G.; Kupai, K.; Dorkó, Zs.; Üрге, L.; Darvas, F.; Poppe, L. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 859-865.
- (a) Lázár, L.; Fülöp, F.; Bernáth, G.; Mattinen, J. *Org. Prep. Proc.* **1993**, *25*, 91-97. (b) Campbell, J. A.; Lee, W. K.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4602-4616. (c) Fülöp, F.; Forró, E.; Martinek, T.; Günther, G.; Sillanpää, R. *J. Mol. Struct.* **2000**, *554*, 119-125. (d) Kóbor, J.; Fülöp, F.; Bernáth, G. *Heterocycles* **1986**, *24*, 2227-2231.
- (a) Forró, E.; Schönstein, L.; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1255-1260. (b) Schönstein, L.; Forró, E.; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 202-206. (c) Schönstein, L.; Forró, E.; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *In Press*.

Enzymatic resolution of tetrahydroisoquinoline derivatives in batch and continuous-flow systems

The tetrahydroisoquinoline derivatives are important building blocks for a large number of naturally-occurring alkaloids. Enantiomerically pure tetrahydroisoquinoline derivatives with biological activity are applied in the synthesis of several drugs, such as the antitumour agent trabectedin (as Yondelis®), the antitussive noscapin and the expectorant emetin. 1-Methyl- and 1-p-henyltetrahydroisoquinoline play significant roles in the prevention of certain neurological diseases and Parkinson's disease.

A new enzymatic strategy was developed for the preparation of the enantiomers of tetrahydroisoquinoline derivatives such as calycotomine [1-(hydroxymethyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (S)-**7** and (R)-**7**], homocalycotomine [1-(2-hydroxyethyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (S)-**9** and (R)-**9**] and crispine A [8,9-dimethoxy-1,2,3,5,6,10-hexahydro- γ -irrolidino[2,1a]isoquinoline, (S)-**5** and (R)-**5**]. Two of these substances were initially isolated from plants: calycotomine from *Calycotome spinosa* and crispine A from *Carduus crispus*, but several synthetic methods have also been described. For example, a new enzymatic dynamic kinetic resolution was developed for the synthesis of (R)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic

acid, from which (*R*)-calycotomine was prepared with a relatively modest *ee* of 91%. (*S*)-Calycotomine has also been prepared by asymmetric synthesis involving catalytic hydrogenation with an iridium(I)-(*R*)-BINAP-phthalimide complex.

The enzymatic resolutions of (\pm)-**1** - (\pm)-**3** (Scheme 1) were achieved through lipase (PS or CAL-B)-catalysed acylation of the primary OH group of these compounds with a remote stereogenic centre. A few literature articles dealing with the possibility of the enzymatic acylation of primary alcohols with a remote stereogenic centre have reported only low to moderate selectivity ($E \leq 11.6$) and *ee* values.

In order to determine the optimum conditions for the enzyme-catalysed *O*-acylations of (\pm)-**1** - (\pm)-**3**, preliminary reactions were performed in both continuous-flow and batch systems. An incubator shaker was used for the batch reactions, while the continuous-flow reactions were performed in a flow reactor (H-Cube in "no H₂" mode). The continuous-flow technique has many advantages, such as rapid heating and compression, a short reaction time and safer solvents, which explains its current popularity. The continuous-flow techniques are widely applied in heterogeneous catalysis procedures such as catalysis with metals or metals on activated charcoal, peptide catalysis and enzyme catalysis.

The effects of the enzyme, acyl donor, solvent, temperature and additive on the enantioselectivity and reaction rate were investigated in the acylation of *N*-Boc-protected 1-(3-hydroxypropyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [(\pm)-**1**] (Table 1). The highest enantioselectivity ($E = 59$) was obtained in the presence of lipase PS with vinyl decanoate and catalytic amounts of Et₃N and Na₂SO₄ in *t*-BuOMe as a green solvent, at 45 °C (Scheme 2). After the preliminary experiments, the gram-scale resolution of [(\pm)-**1**] was performed in two steps and the product amino ester (*S*)-**4** and the unreacted amino alcohol (*R*)-**1** were obtained with good *ee* ($\geq 94\%$). The *O*-acylated amino ester (*S*)-**4** was hydrolysed to the corresponding alcohol. The deprotection and the cyclization of the *N*-Boc-protected amino alcohol enantiomers were performed in one step, which resulted in the corresponding crispine A enantiomers [(*R*)-**5** and (*S*)-**5**] without loss in enantiopurity (*ee* $\geq 94\%$) (Scheme 3).

To prepare both calycotomine enantiomers [(*R*)-**7** and (*S*)-**7**] (Scheme 4), the optimum conditions for the enzymatic resolution

were determined in continuous-flow reactions. In the preliminary reactions, the effects of the enzyme, solvent, temperature and substrate concentration on the enantioselectivity and reaction rate were tested (Tables 2 and 3). The use of a continuous-flow system also allows the possibility of testing the effect of pressure (Scheme 5). The optimized conditions for the enzymatic acylation of *N*-Boc-protected 1-(hydroxymethyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [(\pm)-**3**] were as follows: CAL-B as enzyme with vinyl acetate as acyl donor in toluene, at 80 bar, 60 °C and a flow rate of 0.1 mL min⁻¹. A small-scale enzymatic batch reaction was performed in the presence of CAL-B with vinyl acetate in toluene at 60 °C in an incubator shaker. After a reaction time of 1 h, high enantioselectivity ($E > 200$) was observed at 50% conversion. The preparative-scale batch reaction was performed under the optimized conditions and the resulting amino ester (*S*)-**6** and the unreacted amino alcohol (*R*)-**3** were obtained with high *ee* ($\geq 99\%$). The product enantiomers were further transformed into the desired calycotomine enantiomers (*R*)-**7** and (*S*)-**7** with *ee* = 99%.

The homocalycotomine enantiomers [(*R*)-**9** and (*S*)-**9**] were prepared (Scheme 7) through an enzyme-catalysed *O*-acylation of *N*-Boc-protected 1-(2-hydroxyethyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. In the preliminary small-scale experiments, the effects of the enzyme, solvent, temperature and pressure on the enantioselectivity and reaction rate were investigated in a continuous-flow system (Tables 6 and 7) and the effects of additives were tested in a batch reaction (Table 8). The preparative-scale resolution of [(\pm)-**2**] was carried out in two steps in the presence of CAL-B with vinyl acetate, Et₃N and Na₂SO₄ in toluene at 3 °C. After hydrolysis and deprotection, homocalycotomine enantiomers (*R*)-**9** and (*S*)-**9** were obtained with high *ee* values ($\geq 94\%$) (Scheme 7).

A systematic study was also performed on the *O*-acylation of amino alcohols with a remote stereogenic centre [$n = 3$: crispine A intermediate, (\pm)-**1**, $n = 2$: homocalycotomine intermediate, (\pm)-**2** and $n = 1$: calycotomine intermediate, (\pm)-**3**] (Scheme 6) under the optimized conditions. In the presence of lipase PS, the enantioselectivity increased from 1 to 59 when the distance between the hydroxy group and the stereogenic centre increased from one carbon atom [(\pm)-**3**] to three carbon atoms [(\pm)-**1**] (Table 4), while with CAL-B the enantioselectivity decreased from 200 to 1 when the distance increased from 1 to 3 carbon atoms (Table 5).