

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Інститут високих технологій

Кафедра супрамолекулярної хімії

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії
д.х.н., професор Ігор Володимирович Комаров
Протокол №____засідання кафедри
Від «__»_____2021 року

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА БАКАЛАВРА
на тему:

Синтез оптично чистих похідних 4-заміщених- β -пролінів

студентки 4 курсу бакалаврату

спеціальності 102 «Хімія»

Вітрової Софії Андріївни

Науковий керівник професор, д. х. н.

Рябухін Сергій Вікторович

Оцінка захисту роботи

Київ - 2021

Анотація

В роботі розроблено синтез енантіомерно чистих похідних 4-заміщених- β -пролінів методом ензиматичного кінетичного розділення рацемічних сумішей. Перевірена селективність дії ліпаз *Burkholderia cepacia lipase* – Amano-PS, *Candida antarctica lipase B* – Novozym в реакціях ензиматичного гідролізу естерів та ензиматичного ацилювання спиртів. Визначено та найбільш ефективні методи розділення для кожного типу речовин. Так найкращим для метил заміщеного проліну виявився метод ензиматичного гідролізу естеру з ліпазою *Candida antarctica lipase B* (Novozym 435). А для диметилзаміщеного піролідину успішним був метод ацилювання спирту з *Burkholderia cepacia lipase* (Amano-PS). Також в роботі було оптимізовано методи отримання вихідних рацемічних естерів в масштабах десятків грам.

The synthesis of enantiomerically pure derivatives of 4-substituted- β -prolines by the method of enzymatic kinetic separation of racemic mixtures is developed in this work. The selectivity of the action of *Burkholderia cepacia lipase* - Amano-PS, *Candida antarctica lipase B* - Novozym lipases in the reactions of enzymatic hydrolysis of esters and enzymatic acylation of alcohols was tested. The most effective methods of separation for each type of substances are determined. Thus, the method for enzymatic hydrolysis of the ester with *Candida antarctica lipase B* (Novozym 435) proved to be the best for methyl substituted proline. And for dimethyl-substituted pyrrolidine, the method of acylation of alcohol from *Burkholderia cepacia lipase* (Amano-PS) was successful. Also in the work the methods of obtaining the initial racemic esters on the scale of tens of grams were optimized.

Ключові слова: похідні 4-заміщених- β -пролінів, метод ензиматичного кінетичного розділення, рацемічні суміші.

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ..... | 4 |
| 1.ВСТУП | 5 |
| 2.ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД | 8 |
| 2.1.Методи синтезу рацемічних 4-заміщених- β -пролінів..... | 8 |
| 2.2Методи синтезу оптично чистих 4-заміщених- β -пролінів | 10 |
| 2.2.1.Використання оптично чистої вихідної сполуки..... | 11 |
| 2.2.2.Розділення суміші діастереомерів..... | 12 |
| 2.2.3Розділення енантіомерів за допомогою хіральної хроматографії.... | 13 |
| 2.2.4Розділення за допомогою використання ензимів. | 14 |
| 3.ОБГОВОРЕННЯ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ | 15 |
| 3.1 Селективність дії ліпази на досліджуваних об'єктах..... | 16 |
| 3.2 Отримання рацемічних метилових естерів 4- заміщених Вос-захищених - β пролінів | 20 |
| 3.3 Реакції ензиматичного розділення | 25 |
| 3.4 Отримання оптично чистого 4-диметилзаміщеного Вос β -проліну | 26 |
| 4.ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА | 27 |
| 4.1 Загальний метод отримання рацемічних метилових естерів 1.1 та 2.1 . | 27 |
| 4.2.Загальний метод постановки ензиматичного розділення | 28 |
| 4.3Метод отримання оптично чистого 1.5a..... | 30 |
| 4.4 Спектри речовин, досліджених у роботі..... | 30 |
| 5.ВИСНОВКИ..... | 35 |
| 6.ДОДАТКИ..... | 36 |
| 7. СПИСОК ПОСИЛАНЬ | 45 |

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

| | |
|---------------------|---|
| DCM | дихлорметан |
| dd | дублет дублетів |
| d | дублет |
| DMCO | диметилсульфоксид |
| DMCO-D ₆ | дейтерований диметилсульфоксид |
| кв | квартет |
| КССВ | константа спін-спінової взаємодії |
| m | мультиплет |
| м.ч. | мільйонна частка |
| s | синглет |
| t | триплет |
| TMS | тетраметилсилан |
| ЯМР | ядерний магнітний резонанс |
| ee% | енантіомерний надлишок |
| <i>J</i> | константа спін-спінової взаємодії, Гц |
| RT | кімнатна температура |
| δ | хімічний зсув, м.ч. (ЯМР-спектроскопія) |

1.ВСТУП

Актуальність теми. Заміщені піролідини вважаються цінним матеріалом для розробки фармацевтичних препаратів (рис.1)[1]. На основі заміщених піролідинів вже існує ціла низка сполук з різномітними властивостями, що знаходяться на різних стадіях розробки медпрепаратів [2,3].

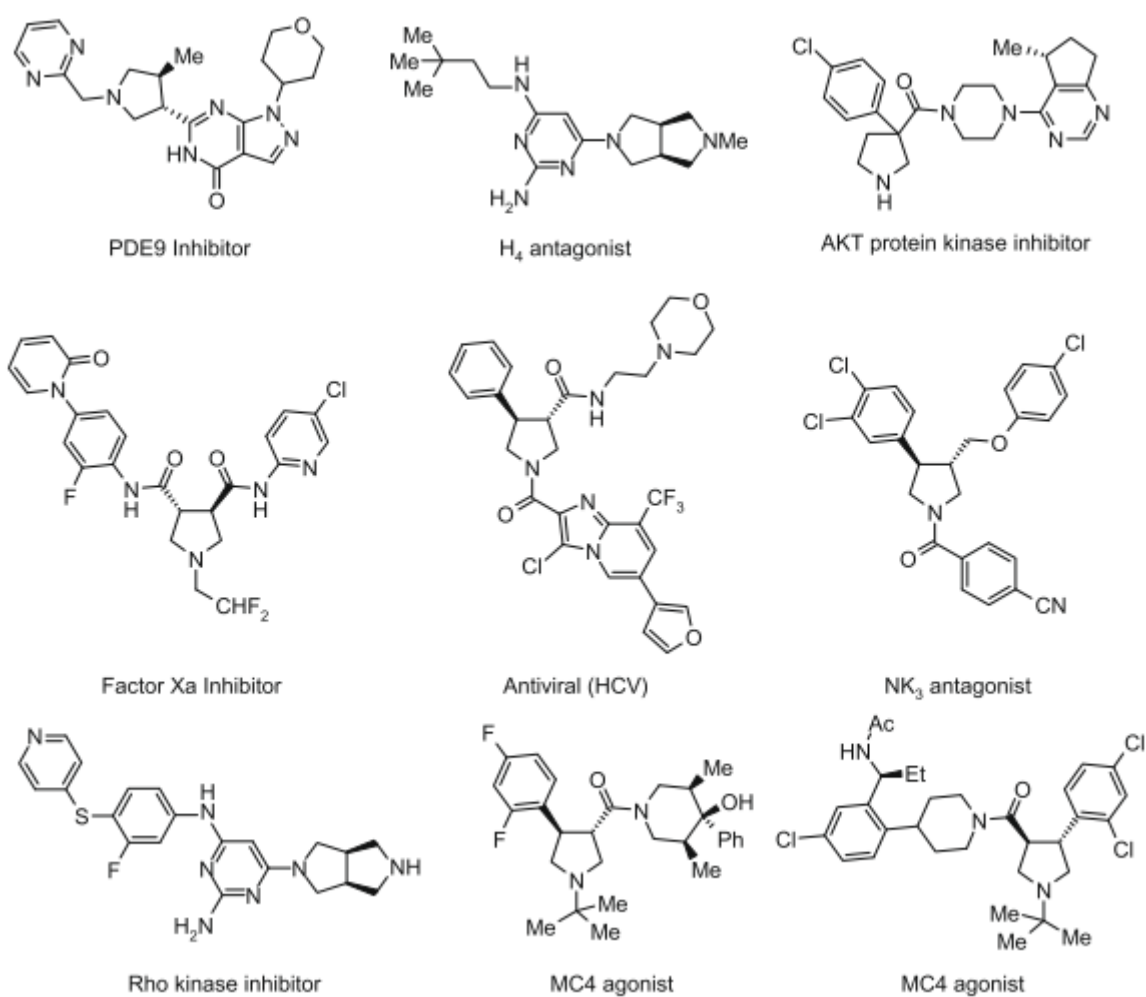


Рис.1 Приклади біологічно активних сполук з фрагментом піролідинів

Також останнім часом медична хімія надає перевагу молекулам з високою часткою sp^3 гібридизованих атомів вуглецю, що відкриває широкі можливості перед полізаміщеними піролідинами для використання як будівельних блоків у скринінговому пошуку біологічно активних сполук [4].

Проте в той же час накладає суворі обмеження щодо використання саме чистих енантіомерів. З іншого боку карбоксильна група відкриває можливості для різноманітних синтетичних перетворень, та може бути модифікована в будь-яку іншу функціональну групу. Тобто з отриманих речовин за допомогою певних хімічних перетворень, можна отримати широкий спектр білдинг блоків, які згодом можна використовувати в медичній хімії (Рис.2).



Рис.2. Потенціал β -пролінів для синтезу будівельних блоків.

Саме тому синтез енантіомерно чистих 4-заміщених похідних β -пролінів є сучасною та науково обґрунтованою задачею.

Мета дослідження. Розробити методи отримання оптично чистих похідних 4-заміщених- β -пролінів методом ензиматичного кінетичного розділення за допомогою ензимів *Burkholderia cepacia* lipase та *Candida*

antarctica lipase B.; перевірити селективність та доцільність використання ензимів для отримання оптично активних 4-заміщених- β -пролінів.

Об'єкт дослідження - похідні 4-заміщених- β -пролінів, ензими *Burkholderia cepacia* lipase та *Candida antarctica* lipase B.

Предмет дослідження – метод кінетичного ензиматичного розділення та синтез хіральних будівельних блоків.

Методи дослідження: органічний синтез, ензиматичне розділення, спектроскопія – ЯМР, мас – спектрометрія, препаративна хроматографія.

Особистий внесок здобувача. Систематизацію наявної літератури, препаративна частина роботи, аналіз спектральних даних, узагальнення та оформлення отриманих результатів, дослідження та встановлення будови одержаних сполук було проведено здобувачем особисто. Постановка завдання дослідження та обговорення результатів проводились разом з науковим керівником, д. х. н., проф. Рябухіним С.В.

Структура та обсяг роботи. Дипломна робота викладена на 46 сторінках і складається зі вступу, трьох розділів, висновків, додатків, переліку використаних джерел (22 найменування). Перший розділ присвячений літературному огляду методів отримання рацемічних вихідних естерів та синтезу оптично чистих 4-заміщених- β -пролінів. Другий розділ складається з обговорення експериментальної частини та аналізу результатів. У третьому розділі описані детальні методики, використані в дипломній роботі та описані спектри отриманих речовин.

2.ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

2.1.Методи синтезу рацемічних 4-заміщених-β-пролінів

Для синтезу рацемічних 4-заміщених β-пролінів використовують відносно недорогі та легкодоступні вихідні матеріали, якими є кетони або альдегіди. З них синтезують за допомогою реакції Хорнера-Водсворта-Еммонса алкени з електроно-акцепторними замісниками. В реакція Хорнера-Водсворта-Еммонса – використовують фосфонати і основу для депротування фосфонату з утворенням фосфонатного карбаніону. Електроноакцепторна група в альфа-положенні до фосфонату забезпечує заключне елімінування. За відсутності електроноакцепторної групи продуктом реакції є α-гідроксифосфонати (рис.3)[5].

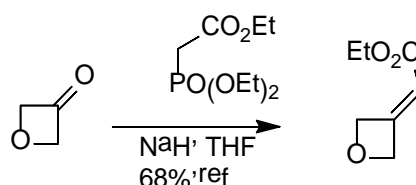


Рис.3 реакція Хорнера-Водсворта-Еммонса

Співвідношення (E)- та (Z)-ізомерів алкenu залежить від стереохімічного виходу початкової стадії приєднання карбаніону та від здатності інтермедіатів екви́лібрувати. У результаті реакції Хорнера—Водсворта—Еммонса переважно утворюються (E)-алкени. Загалом, чим більше урівноважування інтермедіатів, тим вища селективність до утворення (E)-алкенів [6].

(Z)-алкени можна отримати в результаті реакції Корі-Фукса і подальшим відновленням отриманого алкіна на каталізаторі Ліндлара (рис.4)[7].

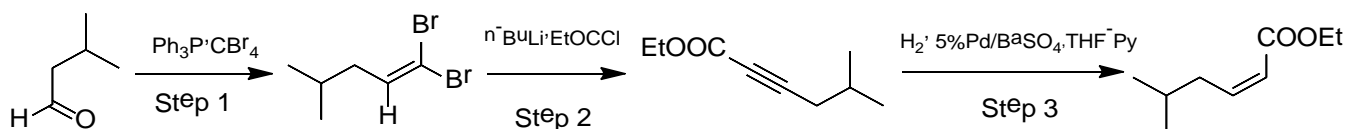


Рис.4 отримання (Z)-алкенів

Наступний етап - [2+3] циклоприєднання – взаємодія електронно-дефіцитного алкену з нестабілізованим азометин-ілідом, який генерується із N-(метоксиметил)-N-(триметилсилілметил)бензиламіну під дією кислоти або фторид аніону. В результаті такого циклоприєднання утворюються заміщені піролідини. Реакція, відповідно, узгоджується із відносною стереохімією в алкені (E або Z) та переноситься в продукт (транс або цис) (рис.5)[1].

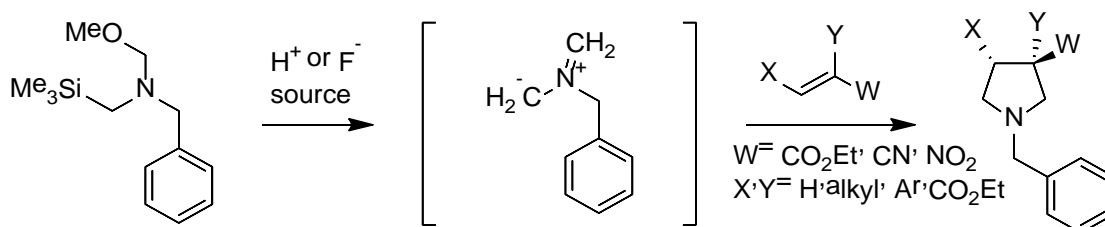


Рис.5 отримання (Z)-алкенів та [2+3] циклоприєднання

Реакція стає небезпечною через екзотерму з більш реакційноздатними алкенами, такими як метилкротонат та N-метилмалеймід. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є попереднє змішування алкену та TFA та додавання попередника азометин-іліду повільно для контролю температури реакції. В якості альтернативи реакцію можна пом'якшити суспензією LiF в ацетонітрилі. Також проблему можна вирішити за допомогою використання проточного реактора (рис.6)[1].

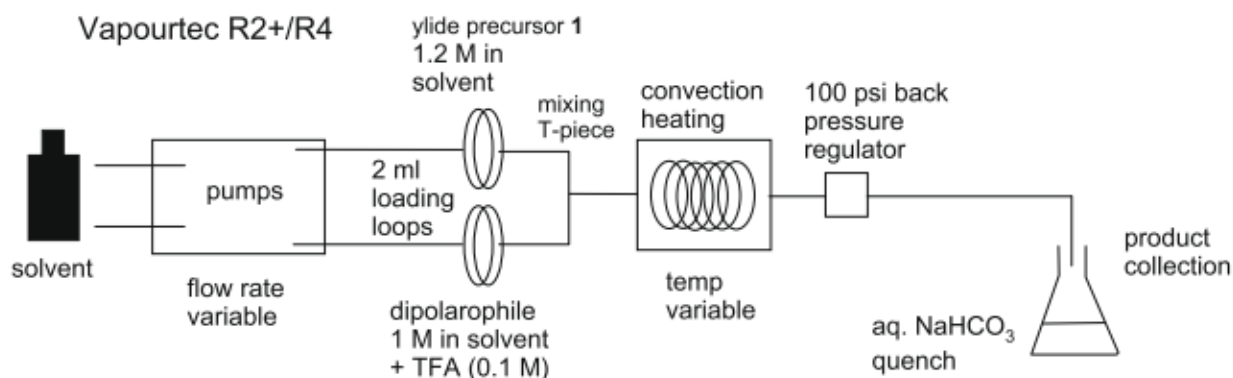


Рис.6 схема проточного реактора

Подальшим зняттям бензильного захисту і гідролізом естеру можна отримати 4-заміщені β -проліни [4,8].

2.2 Методи синтезу оптично чистих 4-заміщених- β -пролінів

Хіральні сполуки із значенням оптичної чистоти 95% ee (відсоток енантіомерного надлишку) вважаються оптично чистими [9].

Відомі синтетичні методи отримання оптично активних сполук поділяють на дві основні групи:

1. Методи, що базуються на асиметричному синтезі, що об'єднують всі шляхи отримання оптично активних сполук, в яких утворення оптичного центру відбувається безпосередньо в процесі реакції. Варто зазначити, що природа оптичного центру та оптична чистота кінцевого продукту реакції залежить від умов реакції та природи хірального каталізатора, який був використаний в синтезі.

2. Методи, що базуються на розділенні рацемічних сполук, що об'єднують всі шляхи отримання оптично активних сполук із вихідних рацематів та базуються на застосуванні кінетичного розділення, розділення діастереомерних похідних, хіральної хроматографії та ін.

Ефективно використовувати одразу два підходи: спочатку метод асиметричного синтезу для отримання збагаченого одним енантіомером продукта, а після цього – методи оптичного очищення, що базуються на методах розділення рацематів та суттєво корелюють із ними.

Взагалі в літературі можна виділити декілька принципово різних підходів до синтезу оптично чистих 4-заміщених- β -пролінів, а саме:

2.2.1. Використання оптично чистої вихідної сполуки.

За реакцією Міхаеля з використанням літійової солі L-фенілаланіна, в якості хірального каталізатора, взаємодією енолізуємих альдегідів із електродефіцитними алкенами можна отримати енантіомерно чисту сполуку, яка має альдегідну та нітро групи в своєму складі (рис.7)[10].

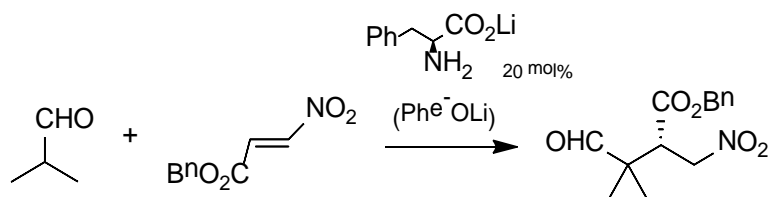


Рис.7 реакція Міхаеля

Далі під дією водню, у присутності палладієвого каталізатора, нітро група відновлюється до аміно групи, яка в свою чергу відразу утворює з альдегідною групою основу Шифа, яка також відновлюється в умовах реакції. В результаті цього отримують оптично чисті 4-заміщені- β -проліни (рис.8)[10].

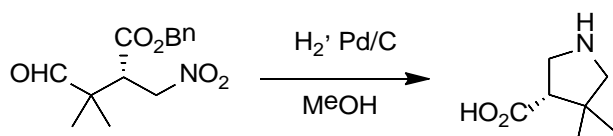


Рис.8

Ще один схожий підхід базується на використанні сполук типу **1**, 1,2-приєднання якої до акцептора Міхаеля призводить до утворення продукту **2**. Далі сполуку **2** за допомогою літійдіізопропіламіна і подальшим переметалюванням на цинкорганічний інтермедіат циклізують в **3** з високою діастерео- та енантіоселективністю. Видалення захисних груп призводить до утворення оптично чистих 4-заміщених- β -пролінів (рис.9)[11].

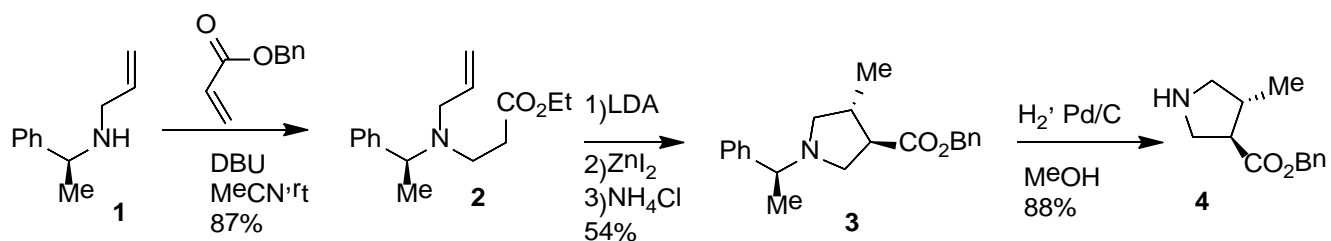


Рис.9

2.2.2. Розділення суміші діастереомерів.

Циклізація сполуки **6** під дією етилату натрію в етанолі при -78°C призводить до утворення діастереомерної суміші (рис.10)[12,13], яку потім можна розділити за допомогою рідинної хроматографії.

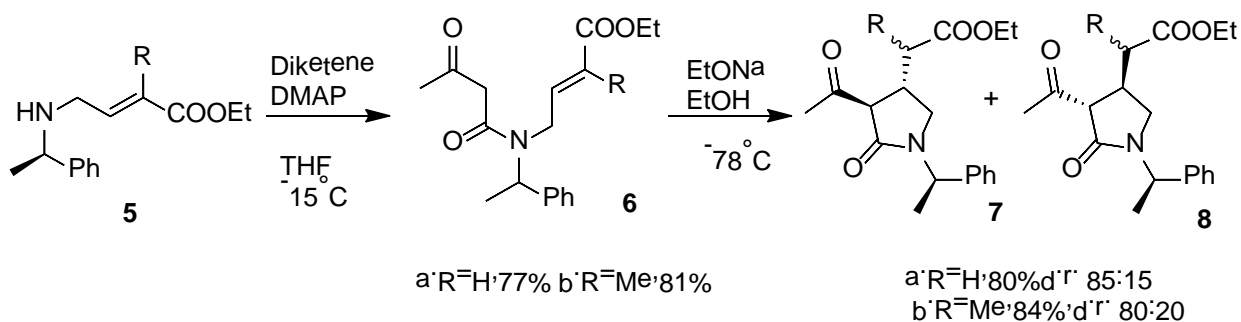
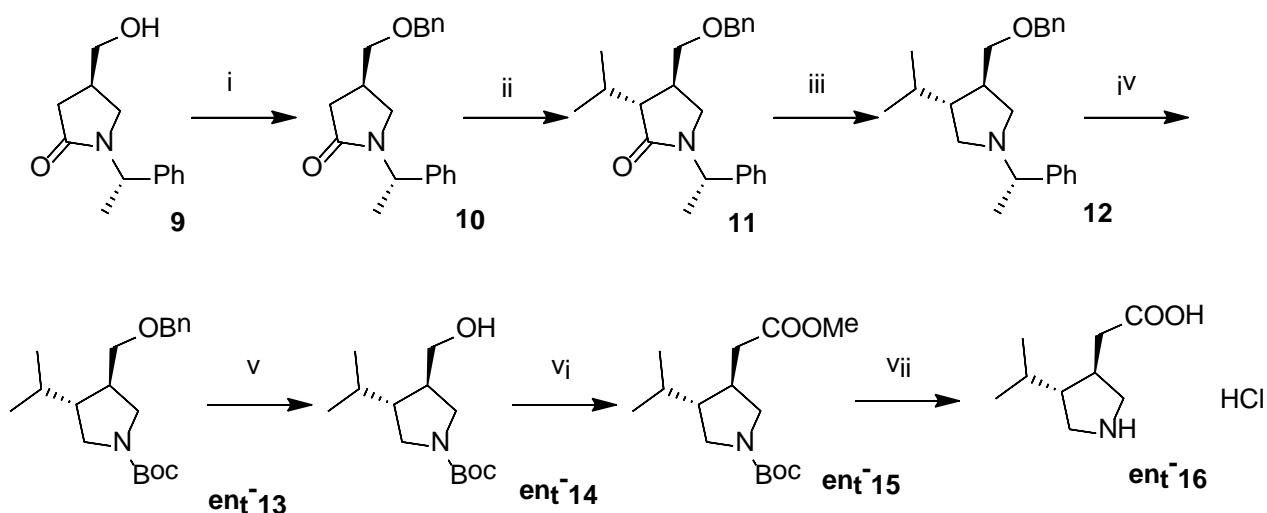


Рис.10

За цим методом можна отримати сполуку **9** і далі за певних умов, які представлені нижче, можна отримати оптично чисті 4-заміщені- β -проліни (рис.11)[14,15].



Reagents and conditions: (i) n-BuLi THF, HMPA, 0°C, then benzyl bromide, 93%; (ii) LiHDMS, THF, 0°C, then 2-methyl-3-iodopropane, 91%; (iii) LiAlH₄, refluxing THF, 77%; (iv) CH₃CH(Cl)OCOCl, refluxing DCM, refluxing MeOH, then Boc₂O, Et₃N, DMAP, DCM, 79%; (v) Pd-C 10%, HCOOH, EtOH, 80%; (vi) Jone's reagent, -10°C, then IRA 120 in the hydroxide form, CH₃I, refluxing cyclohexane, 78%; (vii) 3 M HCl, rt 72%; (viii)

Рис.11

Ще один приклад – приєднання оксазолідонів Еванса, який доволі часто застосовують в асиметричній синтезі на досить різних субстратах. Таке приєднання створює додатковий хіральний центр у вихідній молекулі і підвищує діастереоселективність реакції (рис.12)[16]. Ще перевагою такого методу є те, що після гідролізу аміда оксазолідони Еванса можна виділити і використовувати повторно. В літературі зустрічається досить багато прикладів застосування даного методу [17,18].

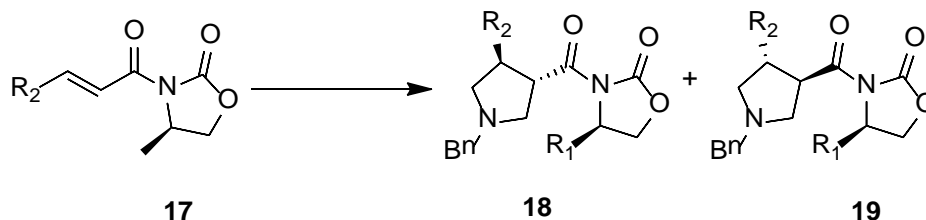


Рис.12

2.2.3 Розділення енантіомерів за допомогою хіральної хроматографії.

Цим методом досить рідко користуються через те, що він дозволяє отримати лише досить малі маси речовин і є дуже дорогим. Хіральною хроматографією є сенс користуватися з науковою метою, аби отримати невелику кількість речовини, щоб перевірити її біоактивність. Цей метод підходить для розділення 4-заміщених- β -пролінів, які можуть згодом використовуватись в медичній хімії [19].

2.2.4 Розділення за допомогою використання ензимів.

Велику цікавість на сьогоднішній день становлять методи розділення рацемічних сполук із використанням різноманітних ферментів та ензимів.

Ацилази є одними із найпоширеніших та найдешевших ензимів, що використовуються в синтетичній хімії, тому останніми роки все більше збільшується кількість публікацій із їх використанням. Серед великої кількості ацилаз важливо згадати про дешеві та комерційно доступні *Burkholderia cepacia lipase* та *Candida antarctica lipase B (CAL-B)*, що підповідають торговим назвам Lipase PS «Amano» та Novozym 435. Саме цих два ензими стали «відправною точкою» у розвитку каталітичного ацилювання та деацилювання фенетанолів та фенетиламінів. З часом почали з'являтися наукові статті, де Amano PS використовували не лише для розділення класичних фенетанолів, а і для різних більш заміщених похідних. Ось наприклад, було розроблено методику ензиматичного ацилювання на сполуці **20** (рис.13)[4]. Суміш ацильованого та неацильованого спиртів можна розділити за допомогою рідинної хроматографії. І навпаки, якщо в нас є рацемат ацильованого спирту, то ензиматичним деацилюванням можна отримати оптично чистий спирт.

Далі спирти можна окислити до альдегідів, а згодом і до кислот, отримавши енантіомерно чисті 4-заміщені- β -проліни.

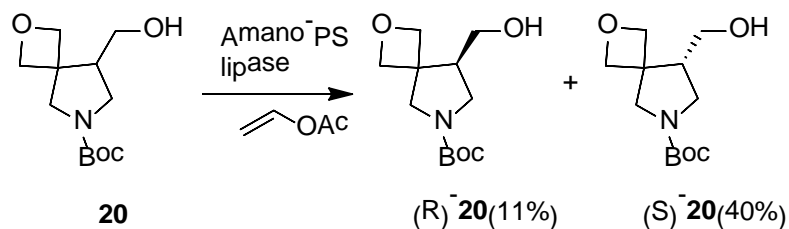


Рис.13

Також за допомогою ліпаз можна ензиматично гідролізувати естери. Це дозволяє уникнути проведення додаткових стадій, таких як відновлення до спирту і подальшого його окиснення після розділення. Цей метод потребує постійного контролю рН (реакція проходить в буферному розчині з рН=7.2), підбору ензиму та температури для кожного субстрату [20].

3. ОБГОВОРЕННЯ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ

Поширеним методом отримання β -пролінів та їх похідних є [3+2]-циклізація відповідних ненасичених естерів. Синтез рацемічних сполук відпрацьований. Проте отримання енантімерно чистих транс-, цис- та 3,3-дизаміщених β -пролінів в літературних джерелах описано переважно через кристалізацію із хіральними амінами або кислотами, через хроматографічне розділення дериватів, а також ці сполуки синтезували шляхом використання

реагентів із хіральними центрами заданої конфігурації. Ці методи не завжди є ефективними. Використання ензимів для вирішення цих проблем в літературі не описано, що, безумовно, підтверджує новизну вибраного нами методу. В роботі було використано як метод селективного ензиматичного гідролізу естерів, так і ензиматичного ацилювання первинних спиртів (Рис.14) Ми вважаємо, що даний метод можна застосувати для отримання великої кількості різноманітних транс та цис-β-пролінів, та 3,3-заміщених β-пролінів.

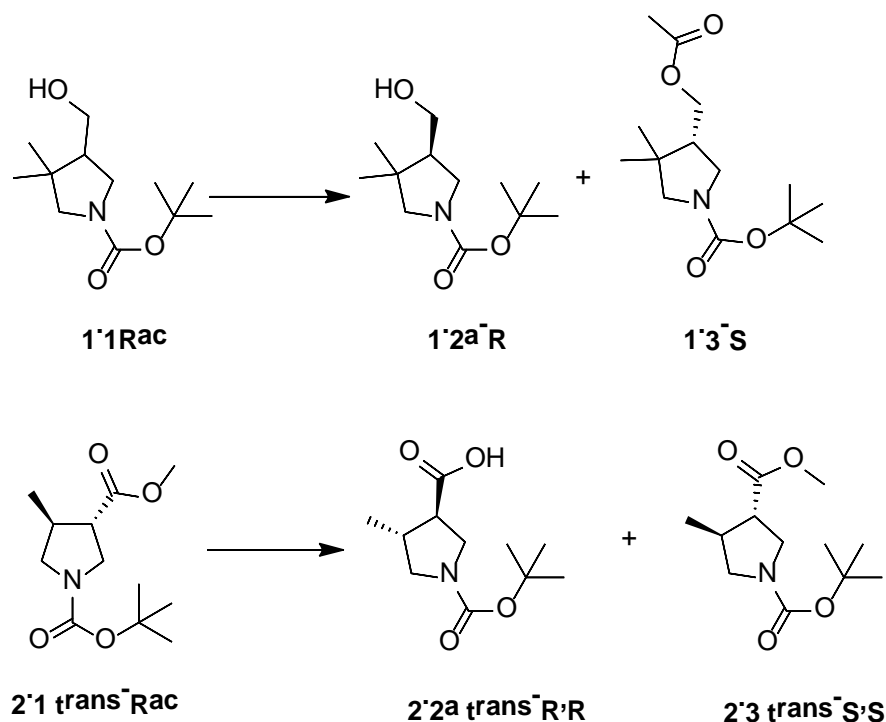


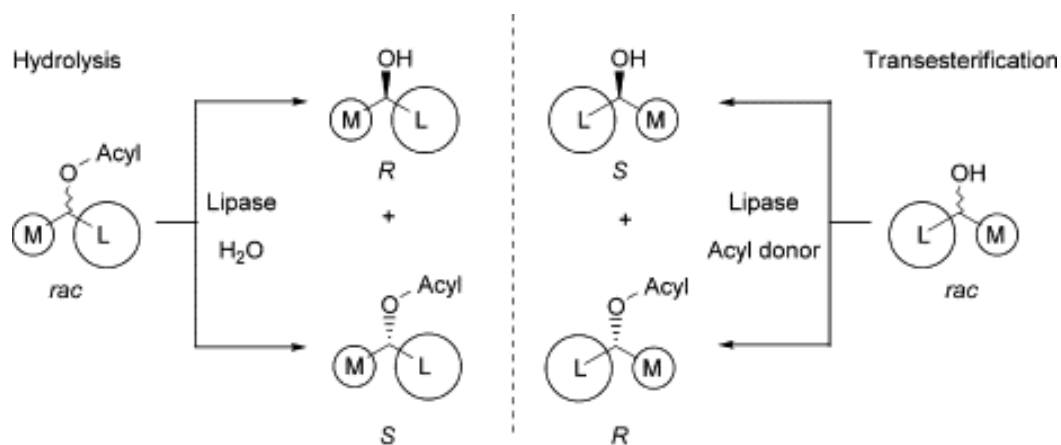
Рис.14 Загальна схема перетворень, що досліджена у роботі

3.1 Селективність дії ліпази на досліджуваних об'єктах

В роботі було використано принципово новий метод отримання оптично чистих 4-заміщених-β-пролінів з використанням ензимів *Burkholderia Cepacia lipase (Amano PS)* та *Candida antarctica lipase B (Novozym 435)*. Ензим – це певна білкова структура, що має свою просторову будову та може каталізувати ті чи інші перетворення субстрату. Ці перетворення відбуваються в так званому «активному центрі», який, в примітивній інтерпретації, є особливим місцем в загальній білковій структурі ензиму, з яким зв'язується субстрат і зазнає перетворень.[21]

Використані ензими за своєю природою є ацилазами, тобто каталізують реакції ацилювання. Вони є комерційно доступними, та довгий час були об'єктами багатьох наукових досліджень. А цікавим є саме те, що за допомогою будови їх активного центру ми можемо отримати з рацемічної суміші оптично чисту речовину. Відомості про просторову будову активного центру дають змогу перебачити будову підходящих субстратів, механізм дії та селективність ензиматичного розділення.

Було визначено, що активні центри *Burkholderia Cepacia lipase* (Amano PS) та *Candida antarctica lipase B* (Novozym 435) мають вигляд кишені, в якій відбувається активування ацилюючого агента та безпосередня реакція ацилювання субстрату, який там знаходиться. Будова цієї кишені визначає структурні особливості субстрату, який може без зусиль туди входити. За правилом Казлаускаса [22] для об'єктів, що мають хіральну вторинну спиртову групу, ефективність взаємодії із активним центром залежить лише від різниці розміру двох інших груп (Рис.15). В ідеальному випадку ці групи мають відповідати критеріям розміру L (зазвичай ароматична система) та M (зазвичай алкільний замісник). При розташуванні на схемі великого замісника зліва, а середнього справа, ізомер, що містить гідроксильну групу, спрямовану на схемі від нас, має більш підходящу структуру для входження в ензиматичну кишеню, тому й вищу швидкість реакції ацилювання, аніж інший ізомер, який не може увійти до ензиматичної кишені через стеричні перешкоди.



M = medium, L = large; sequence rule order of large > medium assumed

Рис.15 Демонстрація правила Казлаускіса

В даній роботі це правило використовувалось для отримання оптично чистого диметил заміщеного проліну. Сполуку **1.1** запускали в ензиматичне ацилювання (Рис.16) Розміру М відповідав диметильний замісник, а L-циклічна система. Згодом, перевіривши абсолютну конфігурацію за допомогою визначення кута обертання, ми ще раз переконалися в правильності правила Казлаускіса. Для отримання речовини з ee більшим за 95% потрібен постійний контроль конверсії та оптичної чистоти. На даному об'єкті при конверсії 50% ee(**1.2a**)=85%. Тобто селективність дії ліпази не дуже висока. Щоб отримати оптично чистою сполуку **1.2R** реакцію доводили до співвідношення 1.3b:1.2a=2:1, отримавши ee(**1.2a**)=98%. Оптичну чистоту на всіх об'єктах, описаних в роботі, визначали за допомогою хіральної хроматографії(див.Додатки)

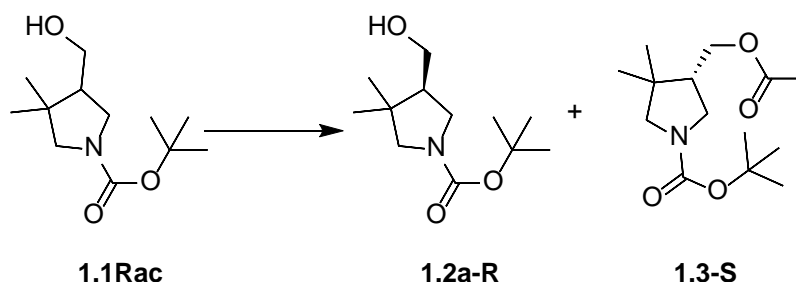


Рис.16

Щоб отримати чистий **1.2b** ізомер, потрібно провести реакцію ензиматичного гідролізу(Рис.17) Щоб зрозуміти до якої конверсії потрібно довести реакцію, слід визначити, з якою оптичною чистотою ми маємо справу. Тому спочатку за допомогою K_2CO_3 в MeOH ми знімаємо ацильний захист та визначаємо оптичну чистоту **1.3** ee=50%. Тобто при ідеальній селективності, при конверсії реакції 75% ми отримуємо чистий спирт. Проте, оцінюючи селективність на стадії ацилювання, доводимо конверсію до 60% та отримуємо **1.2b** ee=99%. На даному об'єкті ензиматичний гідроліз естерів для отримання оптично активної кислоти також було випробувано. Проте, на жаль, жодні умови не дозволили отримати бажаний результат, не було помічено утворення продукту, і на спектрі ми бачили лише вихідний естер.

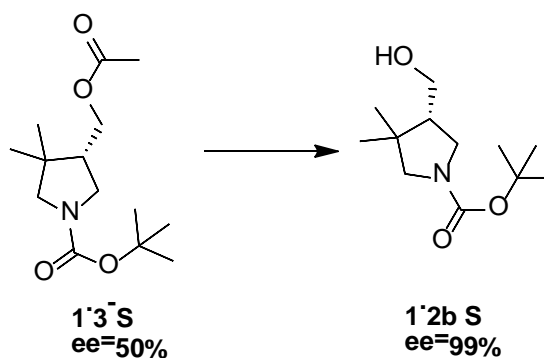


Рис.17

На метил заміщеному проліні було використано принципово новий метод, адже ми ензиматично гідролізували естер(Рис.18), отримуючи оптично чисту кислоту. Передбачити селективність та конфігурацію отриманого ізомеру складно, адже правила схожого на правило Казлаускіса в даному випадку немає. На цьому об'єкті при конверсії 50% ми отримали $ee(2.2a)=85\%$. В цьому випадку, задля отримання оптично чистої речовини, ми не доводили реакцію до 50% конверсії, а виділяли при проходженні на 35%, отримавши при цьому чистоту $ee\ 2.2a=96,61\%$. Перевіривши оптичну чистоту **2.3**($ee=50\%$), ми цей естер знову запускаємо в стадію ензиматичного гідролізу, доводимо до конверсії 30% та виділяємо, отримавши при цьому оптично чистий **2.3**.

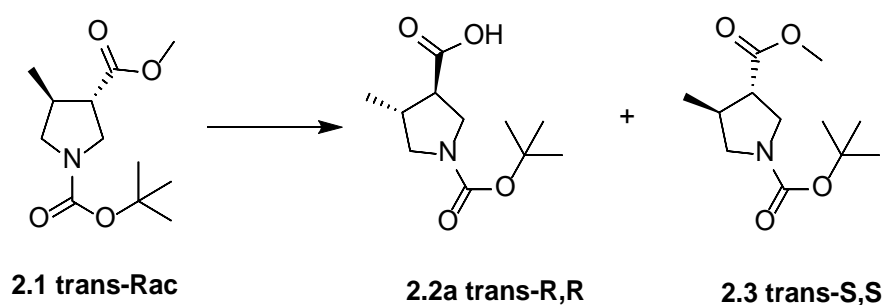


Рис.18

Далі отриманий **2.3** гідролізуємо (Рис.19) за допомогою LiOH, в суміші розчинників THF:H₂O, при RT ніч, та отримуємо $ee\ 2.2b=100\%$.

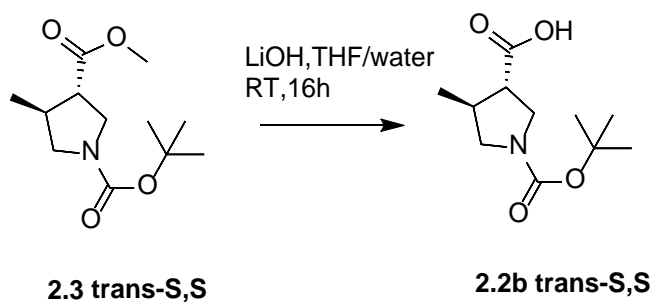


Рис.19

Як вже було сказано вище, абсолютну конфігурацію отриманих речовин перевіряли за допомогою кута обертання площини поляризації світла. В літературі описаний кут на (S)4диметилзаміщеному β-проліні $[\alpha]^{18.3}D = -5.0$ ($c = 1.0, \text{MeOH}$) [10], та (R,R)4метилзаміщеному β-проліні $[\alpha]^{23}D = +13.5$ ($c = 1.0, \text{MeOH}$) [11], зображених на Рис.20.

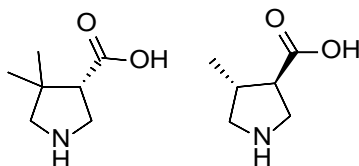


Рис.20

3.2 Отримання рацемічних метилових естерів 4- заміщених Вос- захищених -β пролінів

Щоб запусити наші речовини в реакцію ензиматичного розділення, спочатку потрібно отримати рацемічні **1.1** та **2.1**. Основними вимогами для планування синтезу даних речовин були наявність доступних та недорогих вихідних сполук, відтворюваність результатів та достатньо високі виходи на кожній із стадій.

Вихідними речовинами виступали 3.1,4.1 та 5, а синтез відбувався за схемою, що зображена на Рис.21.

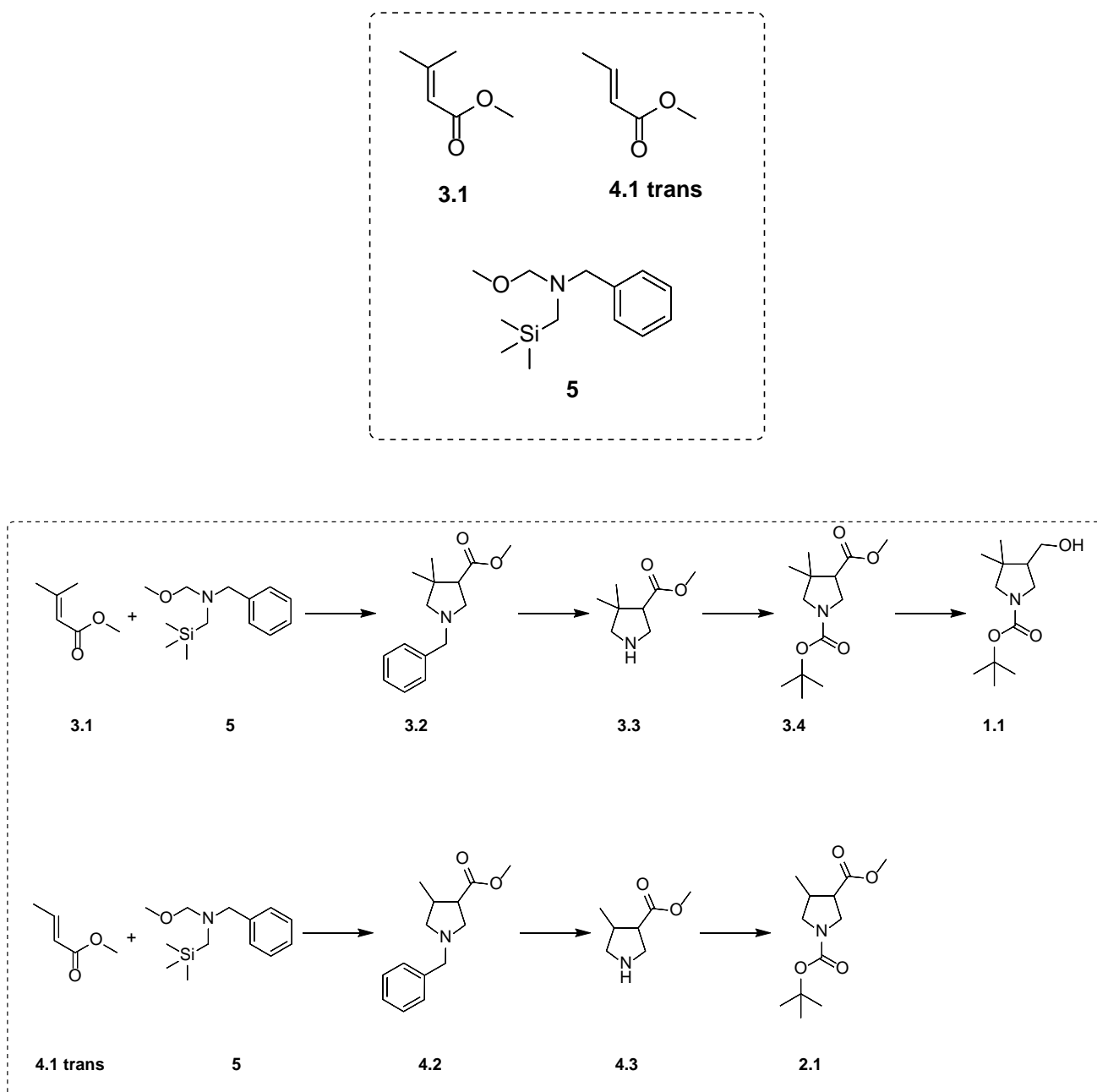


Рис.21

Для отримання речовини **4.2** було застосовано методику, яка описана в багатьох літературних джерелах. В реакції змішуються реагенти **4.1** та **5** в CH_2Cl_2 та додається каталітична кількість трифтороцтової кислоти. Реакція доволі екзотермічна, тому її рекомендують ставити в проточному реакторі, адже навіть дуже невелика кількість TFA сприяє швидкому перебігу циклізації. Речовину **4.2** було отримано з хорошими виходами, а утворення транс продукту забезпечувалось вихідною транс- речовиною **4.1**.

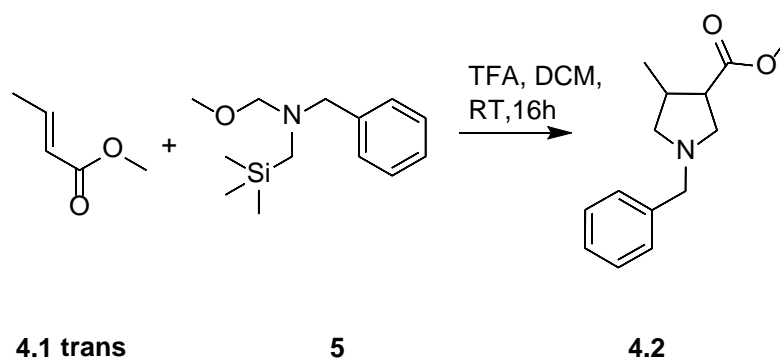


Рис.22

Такі ж умови застосовувались і для отримання речовини **3.2**. Проте таке перетворення йшло із набагато меншими виходами, і в результаті ми бачили значно більшу кількість вихідної речовини, ніж очікуваного продукту. Тому задля оптимізації реакції, було змінено умови та взято замість TFA джерело аніонів F⁻, LiF (Рис.23). Циклізація проходить в ацетонітрилі при температурі 60 °С за 2 доби. Хоча отримуємо продукт зі значно кращими виходами, ніж з використанням TFA, все одно потрібна хроматографічна очистка.

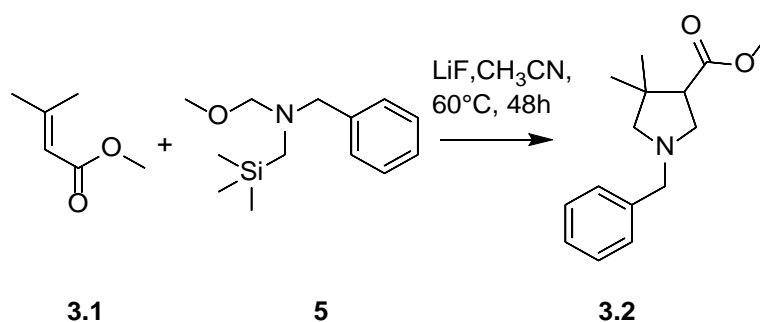


Рис.23

Після хроматографічної очистки речовин **3.2** та **4.2**, для подальшого отримання Вос-захисених пролінів потрібно зняти бензильний захист. Задля пом'якшення умов відновлення ми переводимо наш амін в форму гідрохлориду. Реакцію проводили в діоксані з додаванням Diox/HCl, при RT (Рис.24)

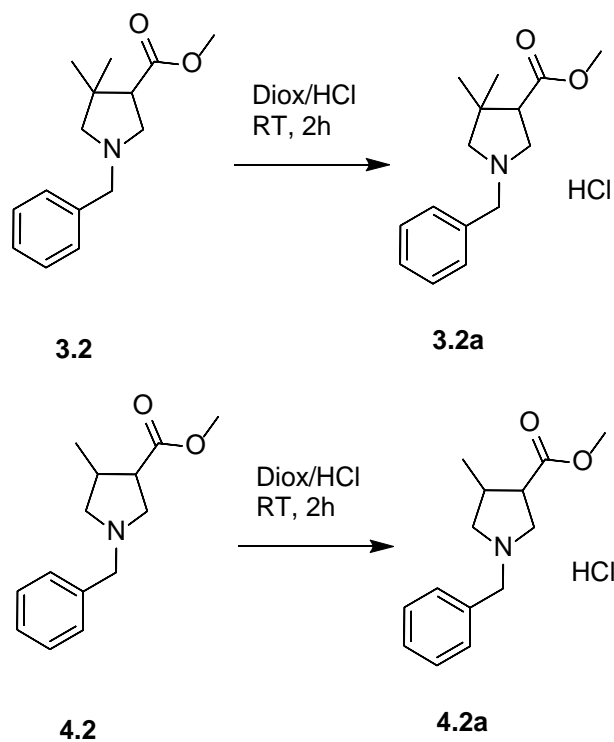


Рис.24

Зняття бензильного захисту проводимо в метанолі з Pd/C в середовищі водню при нагріванні 50°C (Рис.25).

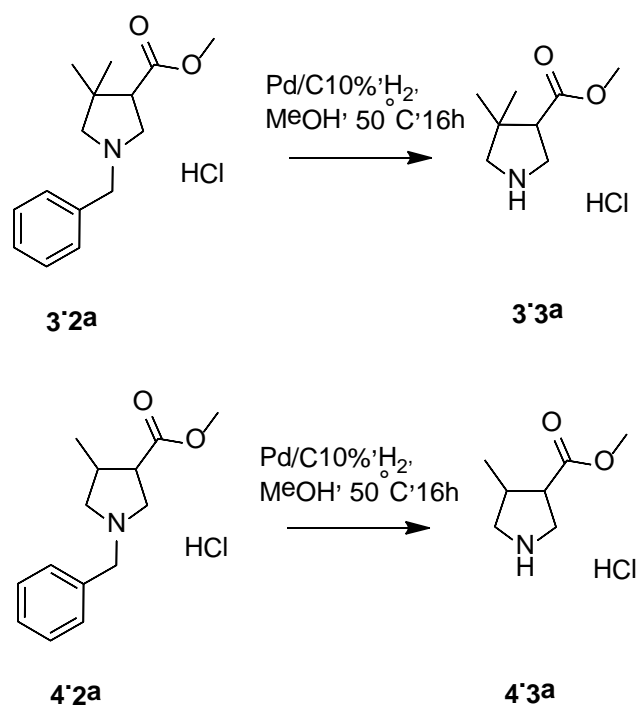


Рис.25

Задля уникнення в подальшому утворення цвітер-іона та роботи з незахищеним аміном, що може призвести до поганих виходів, псування речовини під дією багатьох реагентів та набагато кращої розчинності у воді було отримано речовини **3.4** та **2.1**(Рис.26). Реакцію проводили з додаванням TEA, щоб перевести гідрохлорид в основу, та з Boc_2O в CH_3CN при RT. Отриману речовину **2.1** запускали далі в ензиматичний гідроліз.

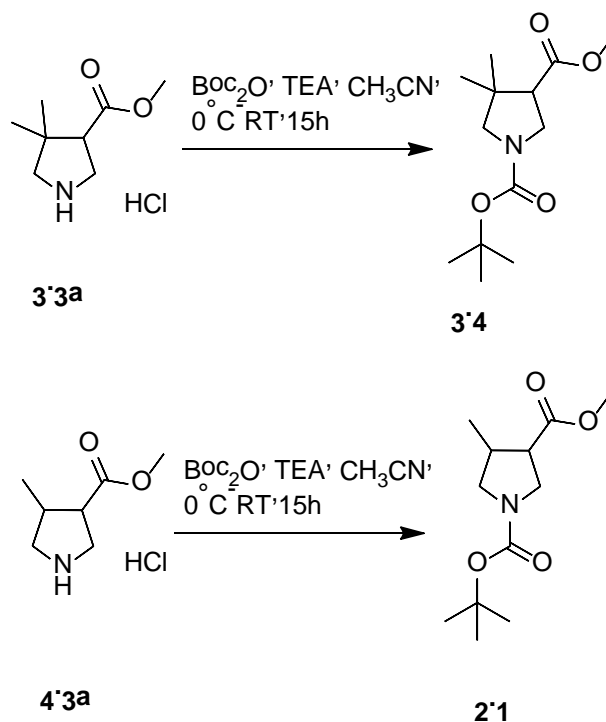


Рис.26

Так як для отримання оптично чистого диметил заміщеного β-проліну ми ацилювали спирт, то нам потрібно отримати рацемічну речовину **1.1** (Рис.27). Відновлюємо естер до спирту за допомогою LiAlH_4 , в THF. За 2 години реакція повністю пройшла.

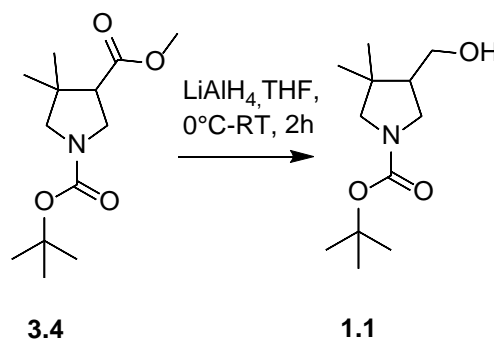


Рис.27

3.3 Реакції ензиматичного розділення

Реакція ензиматичного ацилювання **1.1** відбувалася в органічному середовищі МТБЄ з використанням ліпази *Burkholderia Cepacia lipase* (*Amano PS*) при кімнатній температурі (Рис.28). В якості ацилюючого агента реакції використовували ізопропенілацетат. Спроби використання *Candida antarctica lipase B* (*Novozym 435*) були невдалими, тому що вже за 2 години конверсія досягала 100%.

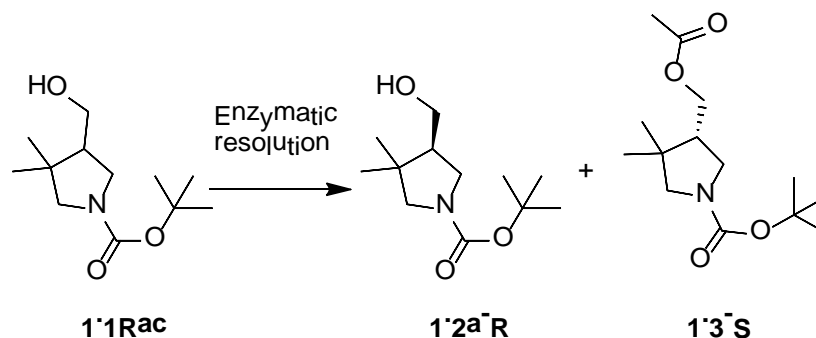


Рис.28

В реакції ензиматичного гідролізу (Рис.29) також використовувалася ліпаза *Burkholderia Cepacia lipase* (*Amano PS*). Реакція проходила при кімнатній температурі в суміші МТБЄ та фосфатного буферу, з постійним контролем рН=7,2.

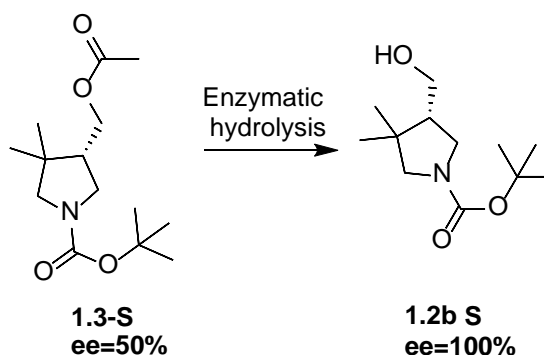


Рис.29

Для отримання оптично чистих **2.2a** та **2.3** було використано ліпазу *Candida antarctica lipase B* (*Novozym 435*). З *Burkholderia Cepacia lipase* (*Amano PS*) утворення продукту не спостерігалось. Реакція проходила при

кімнатній температурі в розчині МТБЄ та фосфатного буферу (pH=7,2) (Рис.30).

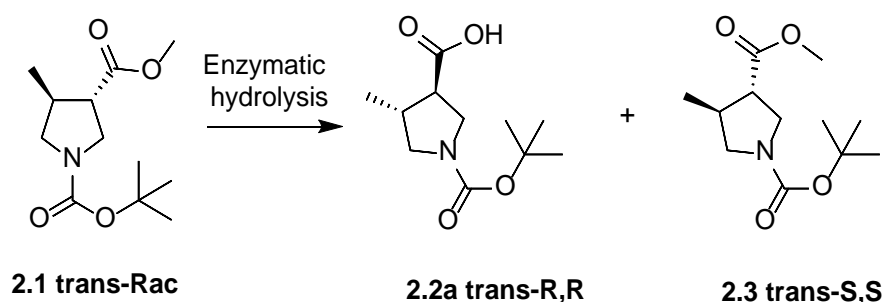


Рис.30

3.4 Отримання оптично чистого 4-диметилзаміщеного Вос β-проліну

Отримавши речовини **1.2a** та **1.2b**, нам ще залишається окиснити спирти до кислот. Існує безліч відомих способів даної реакції, проте аналізуючи всі отримані нами результати, можна прийти до висновку, що найкращим методом синтезу **1.5** є спочатку окиснення спирту в альдегід, а потім в кислоту (Рис.31). Реакція отримання **1.4** найкраще проходила з періодатом Десса -Мартіна в CH_2Cl_2 за 2 години. Але виходи були не дуже високими, імовірно через те, що залишки оцтової кислоти частково знімали захист. А сполуку **1.5** отримували за допомогою окисників NaClO та NaClO_2 , з каталітичною кількістю TEMPO в CH_3CN . Отримана речовина **1.5a** мала таку ж оптичну чистоту, як і вихідна сполука **1.2a**. Аналогічні реакції було проведено і з іншим енантіомером.

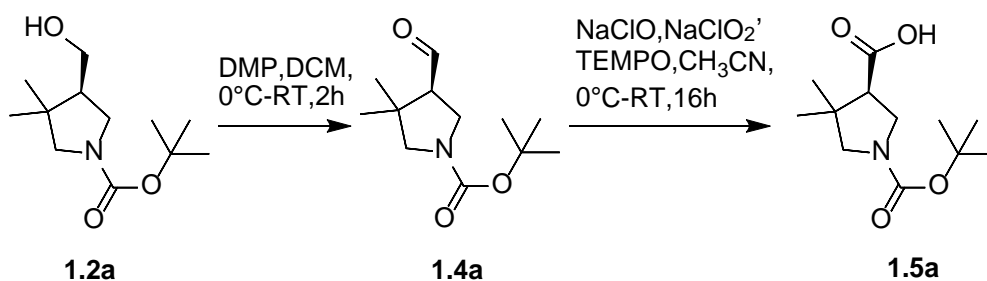


Рис.31

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

4.1 Загальний метод отримання рацемічних метилових естерів 1.1 та 2.1

Отримання 4.2

Алкен **4.1** (0.02 моль, 1 екв) та реагент **5** (0.02 моль, 1 екв) розчинити у сухому DCM (20 мл). До розчину дуже повільно прикапати каталітичну кількість TFA (0.1 екв). Перемішувати при кімнатній температурі ніч. Контроль реакції відбувається спектрально за фактом відсутності сигналів подвійного зв'язку. Після проходження реакції до реакційної суміші при охолодженні лід+вода додають насичений водний розчин NaHCO_3 (5 мл). Тричі екстрагують DCM (по 10 мл) із води. Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Отриману речовину чистять хроматографічно. Вихід=75%.

Отримання 3.2

Алкен **3.1** (0.02 моль, 1 екв) та реагент **5** (0.02 моль, 1 екв) розчинити у сухому CH_3CN (20 мл). До розчину додати LiF (0.06 моль, 3 екв). Перемішувати при 60°C 2 доби. Контроль реакції відбувається спектрально за фактом відсутності сигналів подвійного зв'язку. Після проходження реакції реакційну суміш упарюють, заливають EtOAc (30 мл), промивають 3 рази H_2O (по 10 мл). Органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Отриману речовину чистять хроматографічно. Вихід=70%.

Загальний метод отримання 3.2а та 4.2а

Піролідин **3.2** (2 г) розчинити у сухому діоксані (15 мл) та додати Diox/HCl (20 мл). Перемішувати при кімнатній температурі 2 год. Реакційну суміш упарити. Отриману речовину **3.2а** без додаткової очистки запускають далі.

Загальний метод отримання 3.3а та 4.3а

Естер **3.2а** (3 г) розчиняють в MeOH (30 мл), додають 10% Pd/C (0.1% по масі). Реакцію проводять в автоклаві, в середовищі водню під тиском 30 атм при температурі 50°C. Контроль реакції відбувається спектрально за фактом

відсутності сигналів бензильного захисту. Після проходження реакції, реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, фільтрують від каталізатора, упарюють та без додаткової очистки запускають в наступну стадію. Вихід=95%.

Загальний метод отримання 3.4 та 2.1

Піролідін **3.4**(0,017моль, 1екв) розчинити у сухому CH_3CN (30 мл) та додати TEA (0.033моль, 2 екв.). При охолодженні лід+вода прикапати Vos_2O (0,017моль, 1.1 екв). Вивести температуру до кімнатної. Перемішувати при кімнатній температурі ніч. Контроль реакції по спектру ЯМР. Після проходження реакції, реакційну суміш упарюють, заливають H_2O (10мл) та екстрагують 3 рази МТБС(по 15 мл) з води. Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Отриману речовину **3.4** без додаткової очистки запускають далі.

Вихід=95%.

Отримання 1.1

До сухого THF(15мл) при охолодженні лід+вода в атмосфері аргону дуже обережно присипати LiAlH_4 (0,0036моль, 0.6 екв.), далі при 0°C прикапати естер **3.4** (0,006моль, 1 екв.) Вивести температуру до кімнатної. Перемішувати при кімнатній температурі 2 години. Контроль реакції по ТШХ(система Нех 4:1 EtOAc).Пластину ТШХ проявляти йодом. Після проходження реакції при охолодженні лід/вода до реакційної суміші прикапують 0,2г NaOH в 2мл H_2O , потім прикапують ще 2 мл H_2O . Далі реакційну суміш фільтрують, упарюють THF, екстрагують 3 рази EtOAc(по 10 мл) з води. Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Вихід=92%.

4.2.Загальний метод постановки ензиматичного розділення

Ензиматичне ацилювання 1.1

Спирт **1.1** (0.008 моль, 1 екв) розчинити у МТБС (30 мл), додати ензим «*Amano PS*» (1/10 частина по масі) та ізопропенілацетат (0.016 моль, 2 екв).

Колбу щільно закрити пробкою, зафіксувавши її, і залишити при кімнатній температурі при невеликих обертах магнітної мішалки до моменту отримання потрібної конверсії реакції. Контроль реакції здійснюється спектрально. При досягненні потрібної конверсії ліпаза фільтрується і промивається двічі розчинником. Фільтрат упарюється та отримана суміш ацетату та спирту хроматографічно ділиться.

Ензиматичний гідроліз 1.3

Речовину **1.3** (0.004 моль) розчинити в МТБЄ(10мл) та фосфатному буфері(10мл), додати ензим «*Amano PS*» (1/5 частина по масі) і залишити при кімнатній температурі при невеликих обертах магнітної мішалки до моменту отримання потрібної конверсії реакції. Контроль реакції здійснюється спектрально. При досягненні потрібної конверсії реакції ліпаза фільтрується і промивається двічі МТБЄ. Фільтрат 3 рази екстрагують МТБЄ(по 10мл) з води. Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Отриману суміш ацетату та спирту хроматографічно ділять.

Ензиматичний гідроліз 2.1

Речовина **2.1** (0.02 моль) розчинити в МТБЄ(50мл) та фосфатному буфері(50мл), додати ензим «*Novozym 435*» (1/4 частина по масі) і залишити при кімнатній температурі при невеликих обертах магнітної мішалки до моменту отримання потрібної конверсії реакції. Контроль реакції здійснюється за допомогою мас-спектра. При досягненні потрібної конверсії реакції ліпаза фільтрується і промивається двічі МТБЄ. Далі до фільтрату додають насичений водний розчин K_2CO_3 та доводять до $\text{pH}=10$. Тоді воду екстрагують 3 рази МТБЄ(по 15мл). Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Так отримують метиловий естер **2.3**. А отриману воду підкисляють 3М HCl при охолодженні лід+вода до $\text{pH}=3$. Далі воду екстрагують 3 рази МТБЄ(по 15мл). Об'єднаний органічний шар сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і упарюють. Отримують кислоту **2.2**.

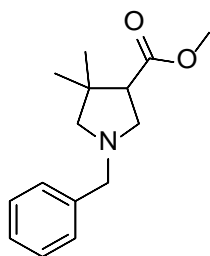
4.3 Метод отримання оптично чистого 1.5а

Спирт **1.2** (0,004 моль, 1 екв.) розчинити в DCM (10 мл), при 0°C обережно присипати Періодат Десса Мартіна. Вивести температуру до кімнатної. Перемішувати при кімнатній температурі 2 години. Контроль реакції по ТШХ (система Нех 2:1 EtOAc). Пластину ТШХ проявляти йодом. Після проходження реакції при охолодженні лід+вода прикапати насичений водний розчин NaHCO₃ (2.5 г) та насичений водний розчин Na₂S₂O₃ (11 г). Тричі воду екстрагнути DCM (по 10 мл). Об'єднаний органічний шар посушити над Na₂SO₄, відфільтрувати і упарити. Отриману речовину **1.4** без додаткової очистки запускають далі.

Вихід=60%

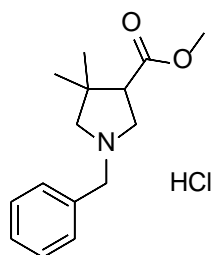
Альдегід **1.4** (0,0066 моль, 1 екв) розчиняють в CH₃CN (15 мл), додають TEMPO (0.07 екв.), при охолодженні лід+вода прикапають NaClO₂ (0.013 моль, 2 екв) в 6 мл H₂O, та прикапають NaClO. Виводять температуру до кімнатної. Перемішують при кімнатній температурі ніч. Контроль реакції по спектру ЯМР. Після проходження реакції реакційну суміш підкисляють H₃PO₄ до pH=3. Воду тричі екстрагують EtOAc (по 8 мл). Далі об'єднаний органічний шар промивають насиченим водним розчином K₂CO₃. Отриманий водний шар підкисляють H₃PO₄ до pH=3. Воду тричі екстрагують EtOAc (по 10 мл). Об'єднаний органічний шар посушити над Na₂SO₄, відфільтрувати і упарити.

4.4 Спектри речовин, досліджених у роботі



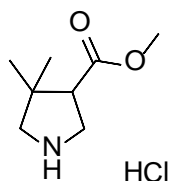
3'2

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.31 – 7.26 (m, 5H), 3.59 (s, 3H), 3.57 – 3.47 (m, 2H), 2.82 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 2.76 – 2.63 (m, 2H), 2.40 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 2.24 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 1.15 (s, 3H), 0.89 (s, 3H). m/z = 248 [M+H]⁺

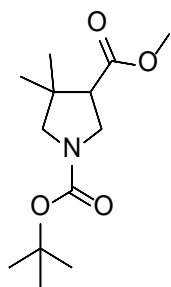


3'2a

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.80 (s, 1H), 7.48 – 7.38 (m, 5H), 4.48 – 4.39 (m, 1H), 4.39 – 4.25 (m, 1H), 3.85 – 3.75 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.45 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 3.42 – 3.28 (m, 1H), 3.21 – 2.90 (m, 2H), 1.23 (d, J = 22.1 Hz, 3H), 0.98 (d, J = 14.0 Hz, 3H).

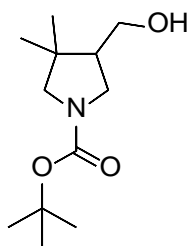


¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.60 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.45 – 3.40 (m, 2H), 3.05 – 2.93 (m, 2H), 2.38 – 2.29 (m, 1H), 1.19 (s, 3H), 0.92 (s, 3H)



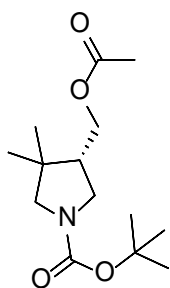
3'4

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 3.73 – 3.67 (m, 3H), 3.64 – 3.51 (m, 1H), 3.34 – 3.04 (m, 2H), 2.86 – 2.64 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.22 – 1.14 (m, 3H), 0.96 (s, 3H). m/z = 280 [M+Na]⁺



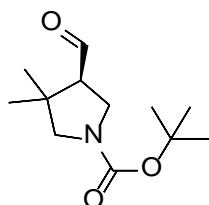
1'1

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 3.76 – 3.71 (m, 1H), 3.63 – 3.50 (m, 2H), 3.18 (d, J = 10.6 Hz, 2H), 3.08 – 3.03 (m, 1H), 2.06 – 1.98 (m, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.09 (s, 3H), 0.92 (s, 3H). GC/MS (EI): m/z = 229 [M]⁺



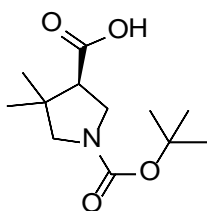
1'3

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ 3.75 – 3.65 (m, 1H), 3.64 – 3.44 (m, 2H), 3.21 – 3.07 (m, 2H), 3.07 – 2.97 (m, 1H), 2.33 (s, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.06 (s, 3H), 0.89 (d, J = 5.3 Hz, 3H).



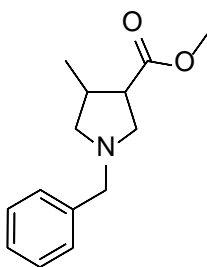
1'4a

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 9.71 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 3.79 – 3.64 (m, 1H), 3.63 – 3.41 (m, 1H), 3.27 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 3.16 (dd, J = 16.2, 11.2 Hz, 1H), 2.72 – 2.57 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (d, J = 17.0 Hz, 3H), 1.05 (d, J = 4.8 Hz, 3H).



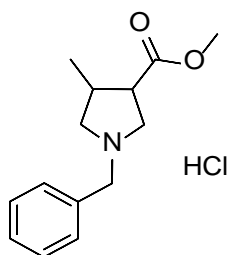
1'5a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12.41 (s, 1H), 3.55 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 3.43 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 3.14 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 3.08 – 2.96 (m, 1H), 2.78 – 2.66 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.13 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 4.8 Hz, 3H) m/z = 188 [M-t-Bu]⁺



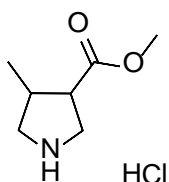
4'2

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.35 – 7.19 (m, 5H), 3.67 (s, 3H), 3.66 – 3.54 (m, 2H), 2.92 – 2.83 (m, 1H), 2.85 – 2.74 (m, 2H), 2.61 – 2.41 (m, 2H), 2.22 (dd, J = 8.8, 6.8 Hz, 1H), 1.13 (d, J = 6.7, 1.3 Hz, 3H). m/z = 234 [M+H]⁺



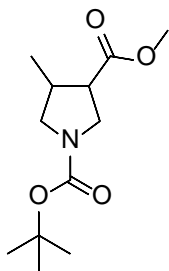
4'2a

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.71 (d, J = 179.0 Hz, 1H), 9.38 (s, 1H), 7.67 – 7.36 (m, 5H), 4.40 – 4.30 (m, 2H), 3.65 (dd, J = 10.3, 3.0 Hz, 3H), 3.49 – 3.23 (m, 2H), 3.09 – 2.81 (m, 2H), 2.68 – 2.41 (m, 1H), 1.17 – 1.08 (m, 3H).



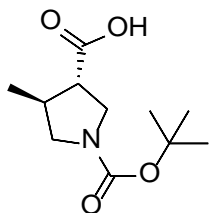
4'3a

¹H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 3.67 (s, 3H), 3.61 – 3.44 (m, 3H), 2.95 – 2.84 (m, 2H), 2.57 – 2.44 (m, 1H), 1.15 – 1.04 (m, 3H).



2'1

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 3.67 (s, 3H), 3.61 (s, 1H), 3.45 (q, J = 10.2 Hz, 1H), 2.87 (q, J = 9.8 Hz, 1H), 2.63 – 2.51 (m, 1H), 2.46 – 2.37 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.10 – 1.03 (m, 3H). $m/z = 266$ [M+Na]⁺



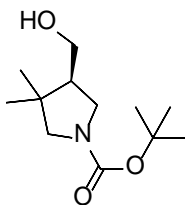
2'2

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 3.75 – 3.58 (m, 2H), 3.56 – 3.49 (m, 1H), 2.97 – 2.89 (m, 1H), 2.67 – 2.62 (m, 1H), 2.48 (s, 1H), 1.44 (d, J = 2.0 Hz, 9H), 1.20 – 1.10 (m, 3H). $m/z = 252$ [M+Na]⁺

5.ВИСНОВКИ

- Доведено ефективність методу ензиматичного розділення 4-заміщених- β -пролінів.
- Розроблено та оптимізовано методи отримання вихідних рацемічних естерів, стартуючи із комерційно доступних алкенів.
- Розроблено ефективні процедури для розділення рацемічних сумішей на основі ліпаз *Burkholderia Cepacia lipase (Amano PS)* та *Candida antarctica lipase B (Novozym 435)*.
- Винайдено критерії для вибору ліпази та методу розділення в залежності від будови субстрату.

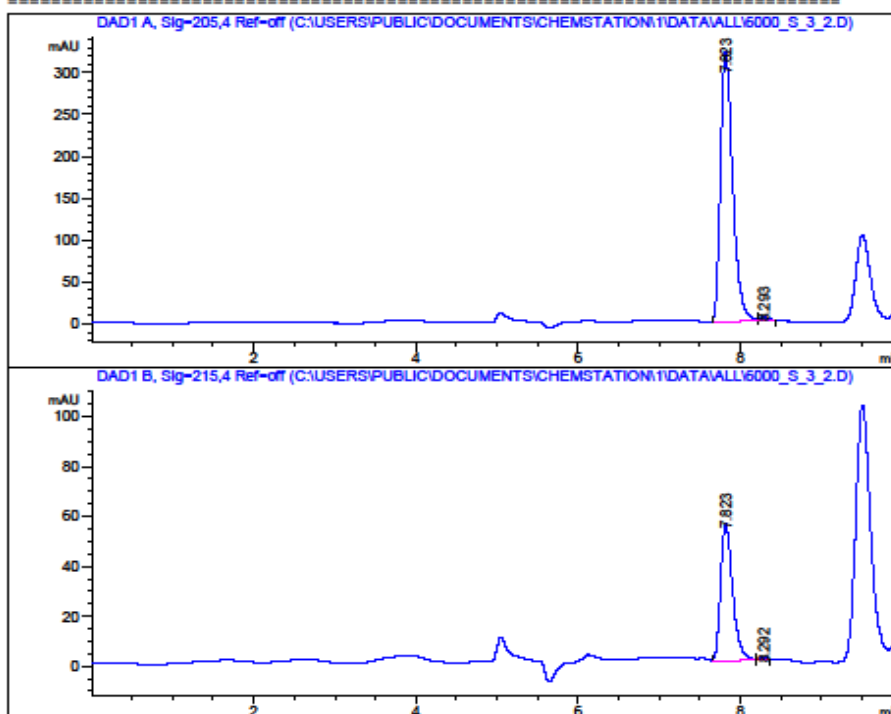
6.ДОДАТКИ



1'2a^rR

Data File: C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\ALL\6000_S_3_2.D
 Sample Name: 6000_S_5902159

Acq. Operator : SYSTEM Location: 62
 Acq. Instrument : 21-7-03
 Injection Date : 8:38:21 PM 11/2/2020
 Injection Volume: 2 µl
 Sample Info: Chiralpak AD-H (250*4.6, 5 µm), Hexane(0.1 % TFA)-IPA, 90-10 ,0.6 ml/min

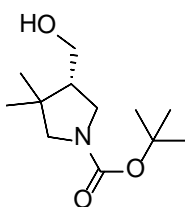


Signal: DAD1 A, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.8232 | 99.04 | 0.676 | | |
| 8.2932 | 0.96 | 0.794 | 1.70 | 1.06 |

Signal: DAD1 B, Sig=215,4 Ref=off

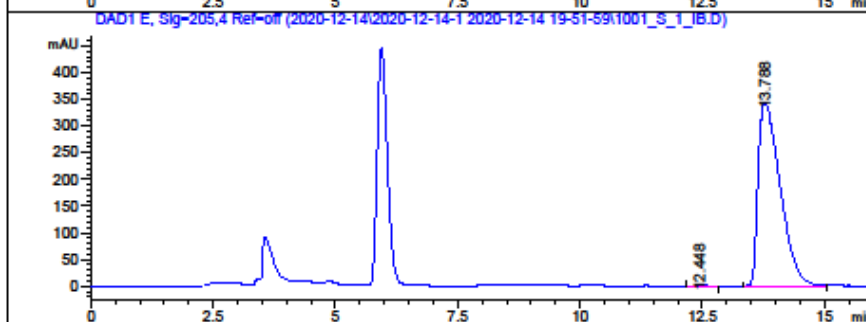
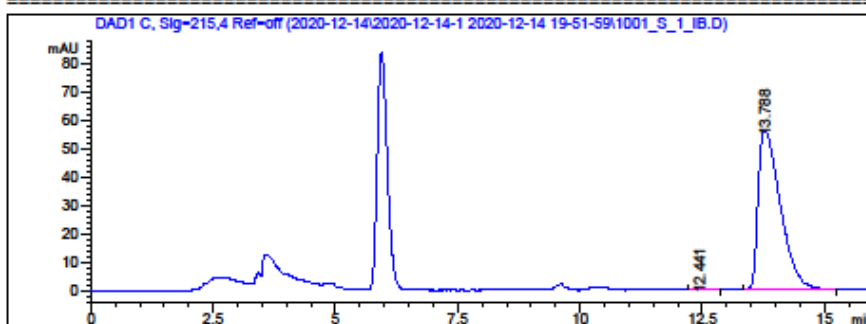
| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.8232 | 98.88 | 0.687 | | |
| 8.2922 | 1.12 | 1.173 | 1.65 | 1.06 |



1'2b S

Data File: C:\CHEM32\1\DATA\2020-12-14\2020-12-14-1 2020-12-14 19-51-59\1001_S_1_IB.D
 Sample Name: 1001_S_U256666

Acq. Operator : I_Shamatulskaya Location: Vial 78
 Acq. Instrument : Instrument 1
 Injection Date : 20:33:13 14.12.2020
 Injection Volume: 5 µl
 Sample Info: Chiralpak IB (250*4.6, 5 µm), Hexane-IPA, 97-3, 1.0 ml/min

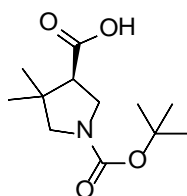


Signal: DAD1 C, Sig=215,4 Ref=off

| RetTime (min) | Area, % | Symm. | Resolution | Selectivity |
|---------------|---------|-------|------------|-------------|
| 12.4412 | 0.49 | 0.189 | 1.82 | 1.11 |
| 13.7882 | 99.51 | 0.000 | 1.82 | 1.11 |

Signal: DAD1 E, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime (min) | Area, % | Symm. | Resolution | Selectivity |
|---------------|---------|-------|------------|-------------|
| 12.4482 | 0.41 | 0.352 | 1.87 | 1.11 |
| 13.7882 | 99.59 | 0.446 | 1.87 | 1.11 |

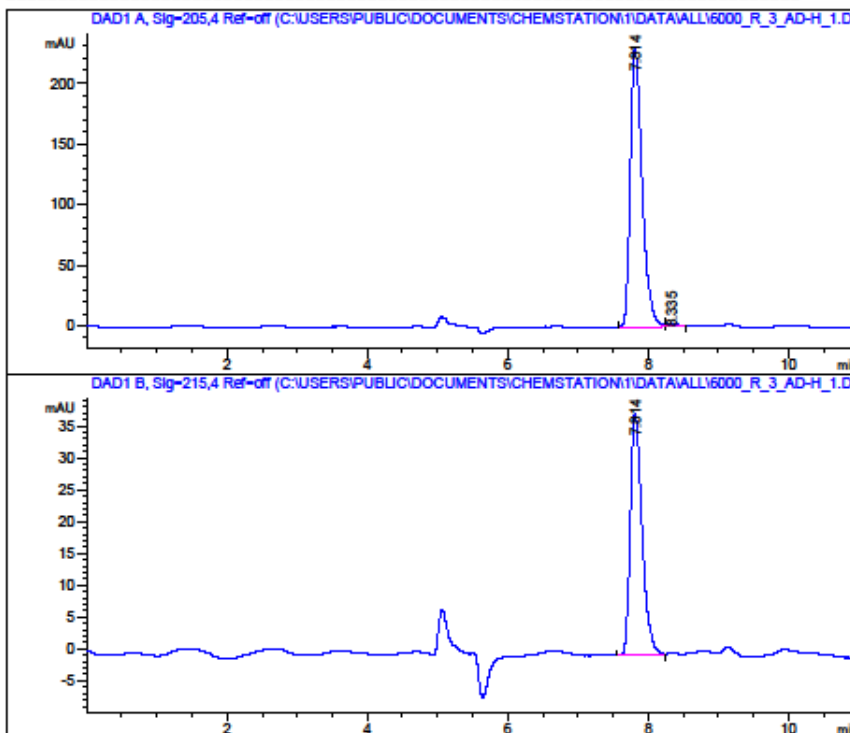


1'5a'R

Оптичний аналіз: -10,94;0,5;CH3OH;589;21;-10,78;8

Data File: C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\ALL\6000_R_3_AD-H_1.D
 Sample Name: R2420941

Acq. Operator : SYSTEM Location: 95
 Acq. Instrument : 21-7-03
 Injection Date : 11:37:01 AM 12/29/2020
 Injection Volume: 5 µl
 Sample Info: Chiralpak AD-H (250*4.6 mm, 5 µm), Hexane(0.1 % TFA)-IPA, 90-10, 0.6 ml/min

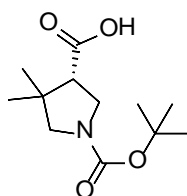


Signal: DAD1 A, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.8142 | 98.88 | 0.650 | | |
| 8.3352 | 1.12 | 0.844 | 1.64 | 1.07 |

Signal: DAD1 B, Sig=215,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.8142 | 100.00 | 0.659 | | |

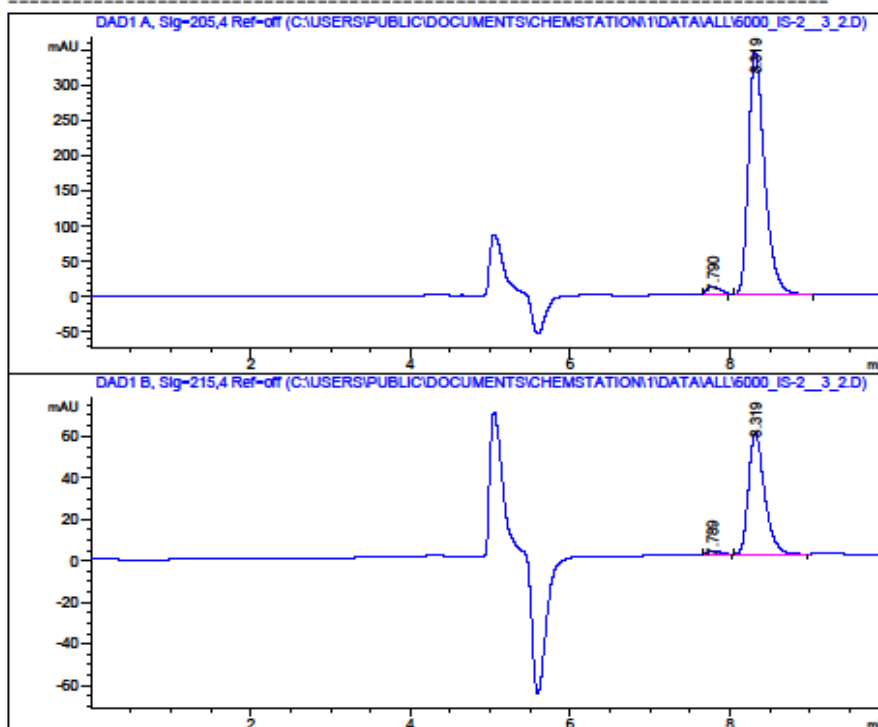


1'5a's

Оптичний аналіз: 11,70;0,5;CH3OH;589;21;11,68;8

Data File: C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\ALL\6000_IS-2_3_2.D
 Sample Name: 6000_IS

Acq. Operator : SYSTEM Location: 47
 Acq. Instrument : 21-7-03
 Injection Date : 4:24:19 PM 1/20/2021
 Injection Volume: 25 µl
 Sample Info: Chiralpak AD-H (250*4.6 mm, 5 µm), Hexane(0.1% TFA)-IPA, 90-10, 0.6 ml/min

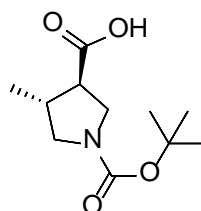


Signal: DAD1 A, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.7902 | 2.17 | 0.796 | | |
| 8.3192 | 97.83 | 0.654 | 1.57 | 1.07 |

Signal: DAD1 B, Sig=215,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 7.7892 | 2.26 | 0.711 | | |
| 8.3192 | 97.74 | 0.661 | 1.56 | 1.07 |

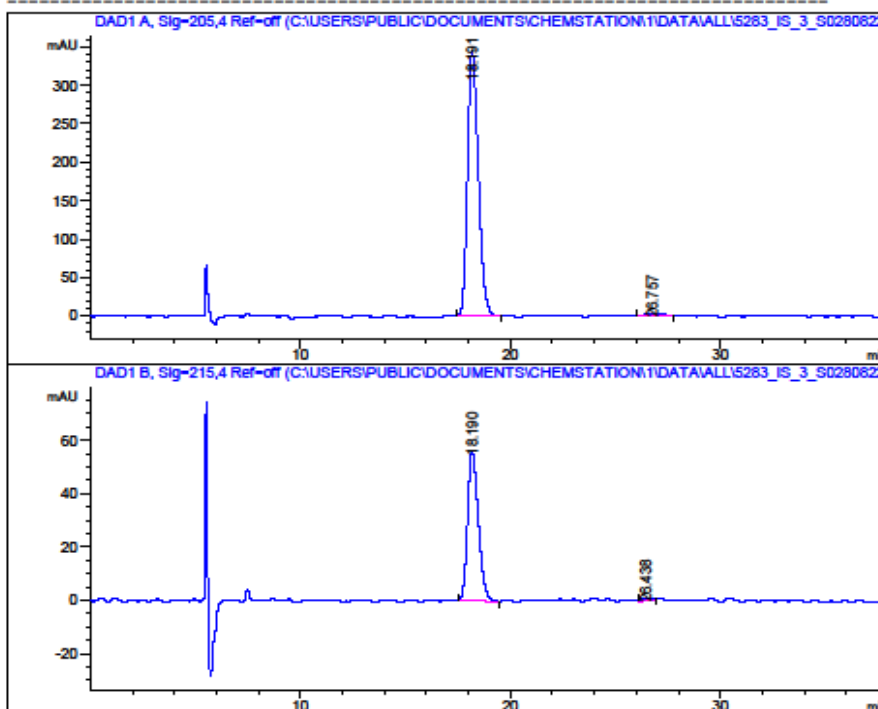


2'2a trans-R,R

Оптичний аналіз:27.02;0.5;CH₃OH;;21;27.08;4

Data File: C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\ALL\5283_IS_3_50280822.D
 Sample Name: 5283_IS_3_5028082

Acq. Operator : SYSTEM Location: 28
 Acq. Instrument : 21-7-03
 Injection Date : 2:29:55 PM 7/20/2020
 Injection Volume: 30 µl
 Sample Info: Chiralpak IC (250*4.6, 5 µm), Hexane(0.1% TFA)-IPA, 90-10, 0.6 ml/min

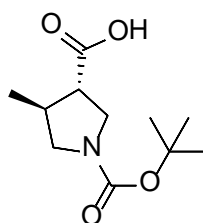


Signal: DAD1 A, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 18.1912 | 98.31 | 0.718 | | |
| 26.7572 | 1.69 | 0.674 | 6.64 | 1.47 |

Signal: DAD1 B, Sig=215,4 Ref=off

| RetTime(min) | Area,% | Symm. | Resolution | Selectivity |
|--------------|--------|-------|------------|-------------|
| 18.1902 | 98.39 | 0.701 | | |
| 26.4382 | 1.61 | 0.762 | 9.16 | 1.45 |

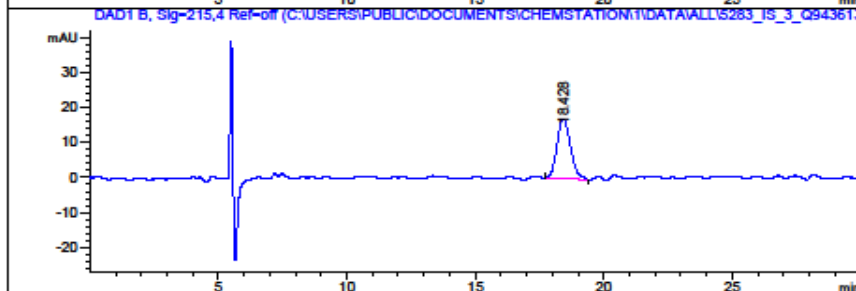
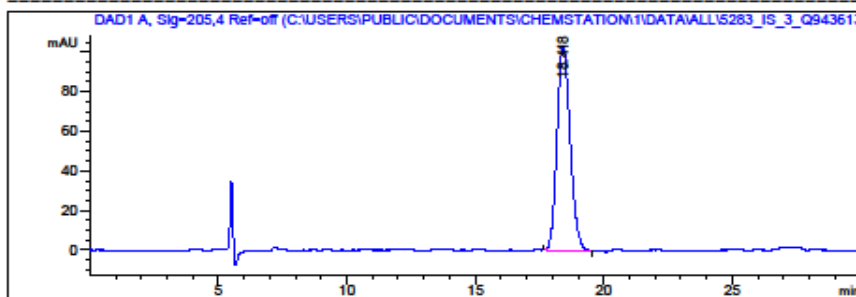


2'2b trans S:S

Оптичний аналіз: -23.98;0,5;CH3OH;;21;-24.00;4

Data File: C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENTS\CHEMSTATION\1\DATA\ALL\5283_IS_3_Q943613.D
 Sample Name: 5283_IS_3_Q943613

Acq. Operator : SYSTEM Location: 91
 Acq. Instrument : 21-7-03
 Injection Date : 4:25:31 PM 7/9/2020
 Injection Volume: 10 µl
 Sample Info: Chiralpac IC (250*4.6, 5 µm), Hexane(0.1%TFA)- IPA, 90-10, 0.6 ml/min

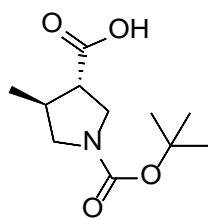


Signal: DAD1 A, Sig=205,4 Ref=off

| RetTime (min) | Area, % | Symm. | ResolutionSelectivity |
|---------------|---------|-------|-----------------------|
| 18.4182 | 100.00 | 0.832 | |

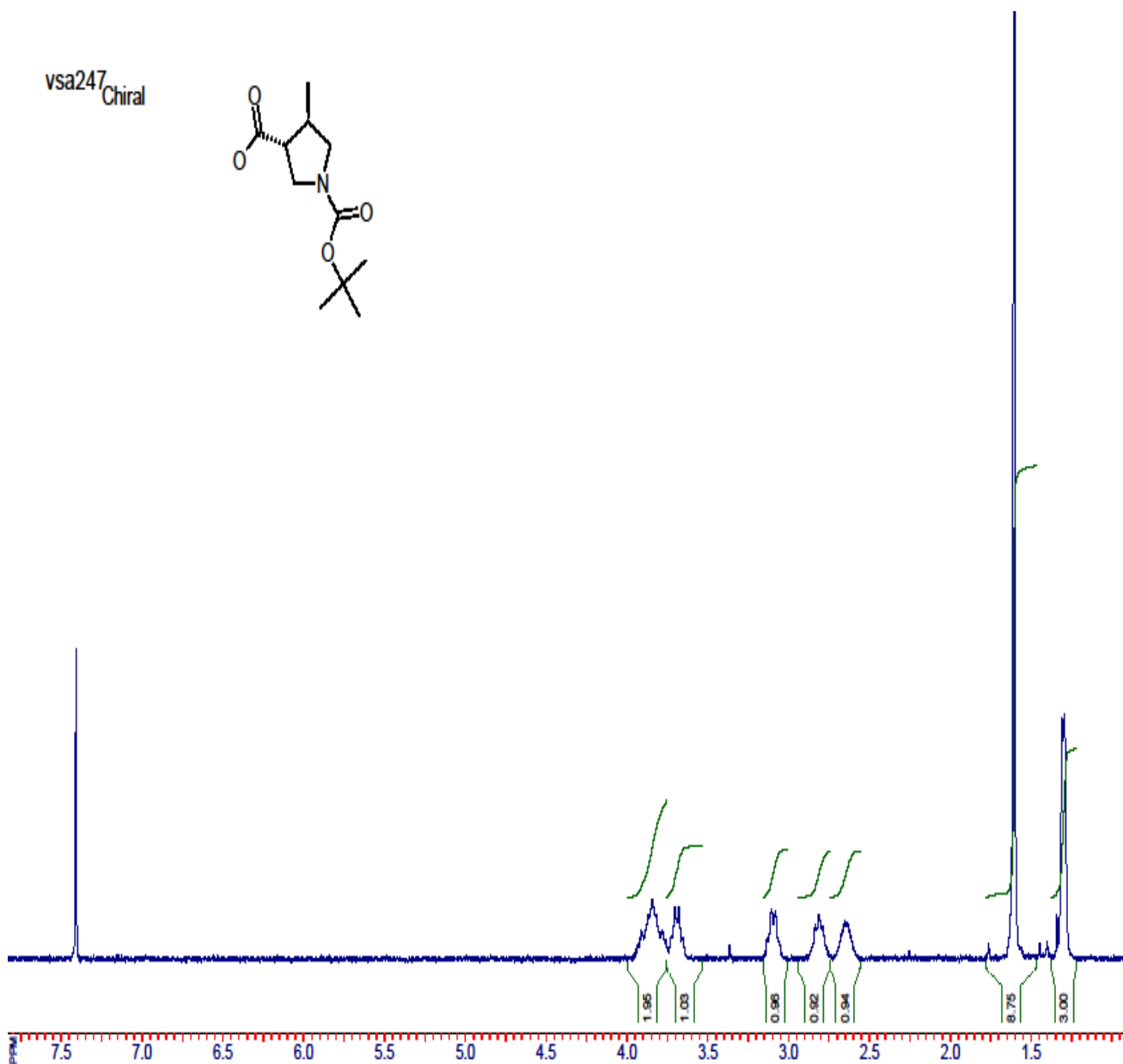
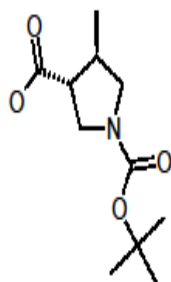
Signal: DAD1 B, Sig=215,4 Ref=off

| RetTime (min) | Area, % | Symm. | ResolutionSelectivity |
|---------------|---------|-------|-----------------------|
| 18.4282 | 100.00 | 0.849 | |

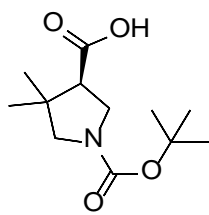


2'2

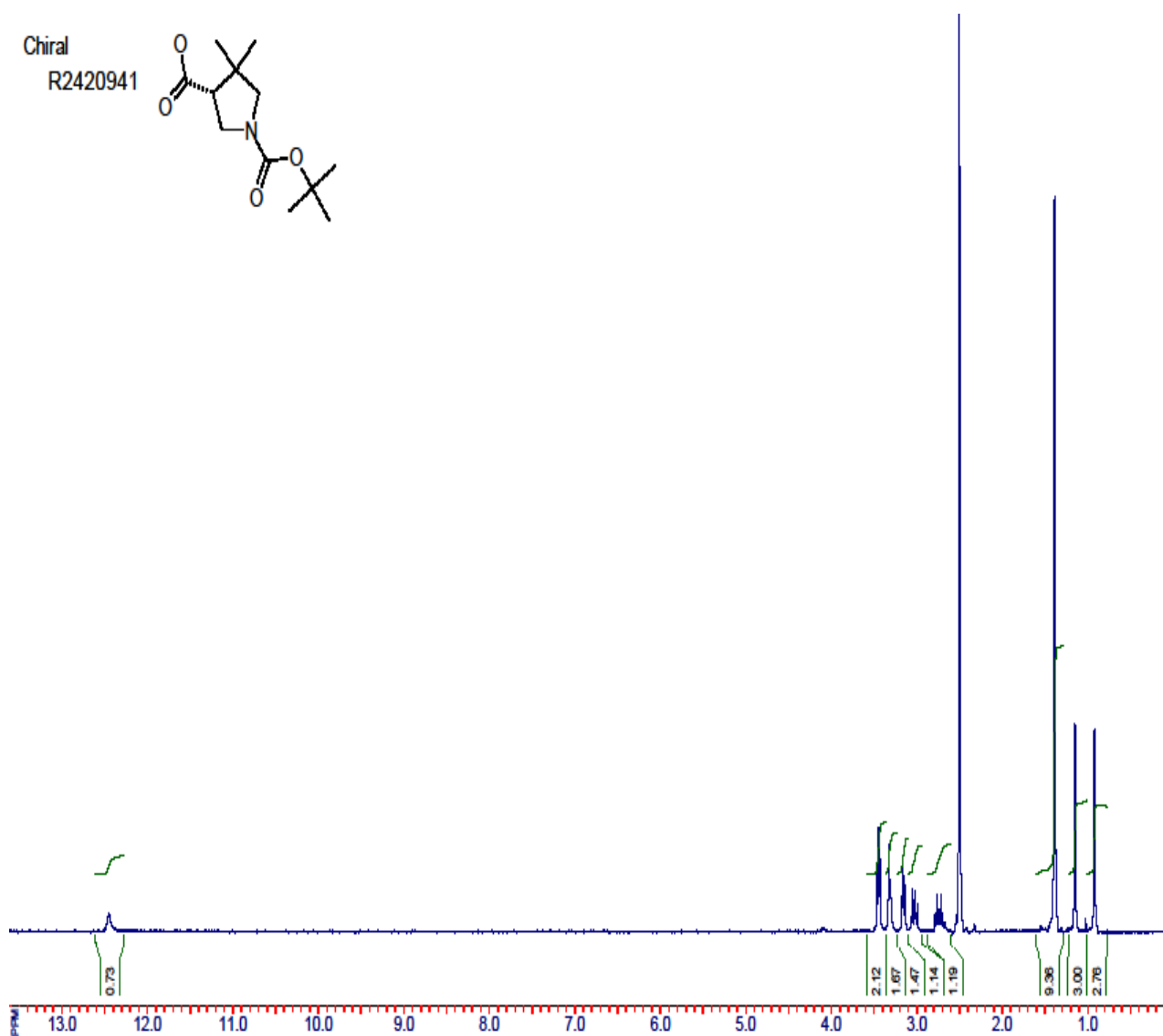
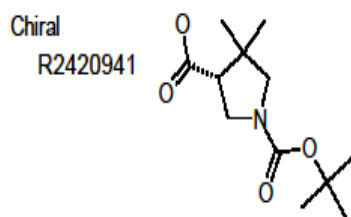
vsa247
Chiral



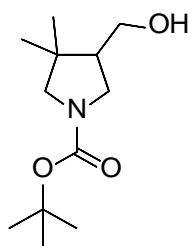
| | | | | | |
|-------------------|----------------|------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| File name: vsa247 | Operator: nmr | SF: 400.1300 MHz | NSC: 1 | PW: 0.00 usec, RG: 25 | SI: 32768 |
| Date: 18-Jul-2020 | Solvent: CDCl3 | SW: 8224 Hz | TE: 298 K | AQ: 1.89 sec, RD: 0.00 sec | |



1'5a

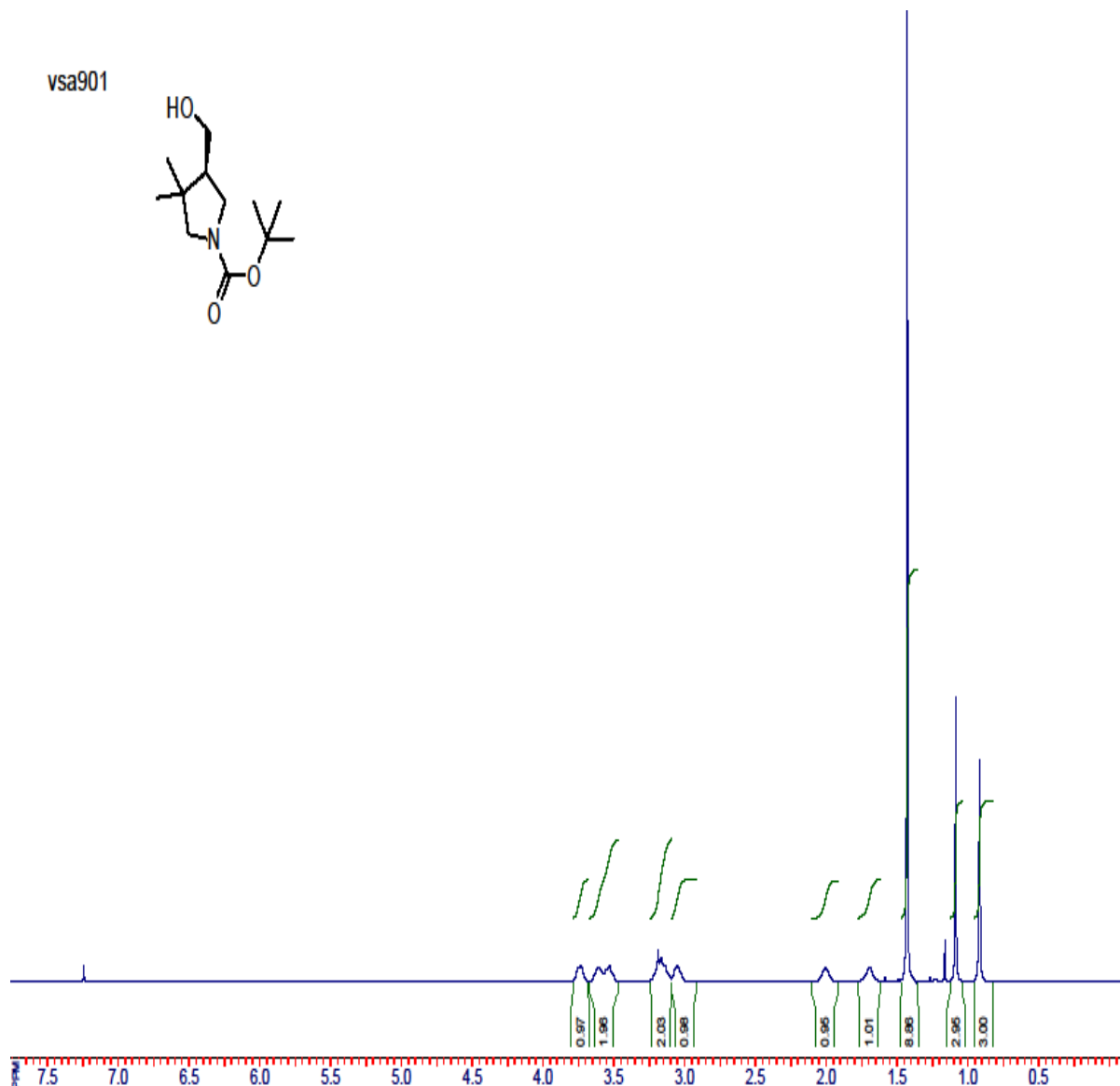
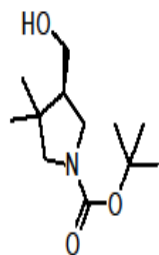


| | | | | | |
|---------------------|---------------|------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| File name: R2420941 | Operator: | SF: 399.9755 MHz | NSC: 0 | PW: 11.60 usec, RG: 40 | SI: 32768 |
| Date: 11-Dec-2020 | Solvent: dmso | SW: 7500 Hz | TE: 294 K | AQ: 2.11 sec, RD: 0.00 sec | |



1'1

vsa901



| | | | | | |
|-------------------|----------------|------------------|-----------|----------------------------|------------------------------------|
| File name: vsa901 | Operator: nmr | SF: 400.1300 MHz | NSC: 1 | PW: 0.00 usec, RG: 25 | SI: 32788 |
| Date: 26-Oct-2020 | Solvent: CDCl3 | SW: 8224 Hz | TE: 297 K | AQ: 1.99 sec, RD: 0.00 sec | Parameter file, TOPSPINVersion 2.1 |

7. СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- [1]. Grafton, M.; Mansfield, A. C.; Fray, M. J. [3+2] Dipolar Cycloadditions of an Unstabilised Azomethine Ylide under Continuous Flow Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (7), 1026–1029.
- [2]. Kim, S. G.; Lee, S. H.; Park, T. H. Novel Stereoselective Synthesis of All Four Diastereomers of 3a-Methyl-Pyrrolo[3,4-c]Piperidine from Glycine Ethyl Ester. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (29), 5023–5026.
- [3]. (1) Cheng, H.; Nair, S. K.; Murray, B. W.; Almaden, C.; Bailey, S.; Baxi, S.; Behenna, D.; Cho-Schultz, S.; Dalvie, D.; Dinh, D. M.; Edwards, M. P.; Feng, J. L.; Ferre, R. A.; Gajiwala, K. S.; Hemkens, M. D.; Jackson-Fisher, A.; Jalaie, M.; Johnson, T. O.; Kania, R. S.; Kephart, S.; Lafontaine, J.; Lunney, B.; Liu, K. K. C.; Liu, Z.; Matthews, J.; Nagata, A.; Niessen, S.; Ornelas, M. A.; Orr, S. T. M.; Pairish, M.; Planken, S.; Ren, S.; Richter, D.; Ryan, K.; Sach, N.; Shen, H.; Smeal, T.; Solowiej, J.; Sutton, S.; Tran, K.; Tseng, E.; Vernier, W.; Walls, M.; Wang, S.; Weinrich, S. L.; Xin, S.; Xu, H.; Yin, M. J.; Zientek, M.; Zhou, R.; Kath, J. C. Discovery of 1-((3R,4R)-3-((5-Chloro-2-((1-Methyl-1H-Pyrazol-4-Yl)Amino)-7H-Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidin-4-Yl}oxy)Methyl]-4-Methoxypyrrolidin-1-Yl}prop-2-En-1-One (PF-06459988), a Potent, WT Sparing, Irreversible Inhibitor of T790M-Containing EGFR Mutants. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (5), 2005–2024.
- [4]. Chalyk, B. A.; Isakov, A. A.; Butko, M. V.; Hrebenuk, K. V.; Savych, O. V.; Kucher, O. V.; Gavrilenko, K. S.; Druzhenko, T. V.; Yarmolchuk, V. S.; Zozulya, S.; Mykhailiuk, P. K. Synthesis of 6-Azaspiro[4.3]Alkanes: Innovative Scaffolds for Drug Discovery. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (31), 4530–4542.
- [5]. Chalyk, B. A.; Butko, M. V.; Yanshyna, O. O.; Gavrilenko, K. S.; Druzhenko, T. V.; Mykhailiuk, P. K. Synthesis of Spirocyclic Pyrrolidines: Advanced Building Blocks for Drug Discovery. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*

- (66), 16782–16786.
- [6]. Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. The Utility of Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (7), 1733–1738.
- [7]. Bryans, J. S., Branched alkyl pyrrolidine-3-carboxylic acids, *United States*; **2001**.
- [8]. Fjelbye, K.; Marigo, M.; Clausen, R. P.; Juhl, K. Preparation of Spirocyclic β -Proline Esters: Geometrically Restricted Building Blocks for Medicinal Chemistry. *Synlett* **2017**, *28* (2), 231–234.
- [9]. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book") (1997). Online corrected version: (1996) "Enantiomer excess".
- [10]. Yoshida, M.; Masaki, E.; Ikehara, H.; Hara, S. Enantioselective Synthesis of Gabapentin Analogues via Organocatalytic Asymmetric Michael Addition of α -Branched Aldehydes to β -Nitroacrylates. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (27), 5289–5297.
- [11]. Caumes, C.; Delsuc, N.; Azza, R. B.; Correia, I.; Chemla, F.; Ferreira, F.; Carlier, L.; Luna, A. P.; Moumné, R.; Lequin, O.; Karoyan, P. Homooligomers of Substituted Prolines and β -Prolines: Syntheses and Secondary Structure Investigation. *New J. Chem.* **2013**, *37* (5), 1312–1319.
- [12]. (1) Galeazzi, R.; Mobbili, G.; Orena, M. Kinetic Control in the Stereoselective Intramolecular Conjugate Addition of Amide Enolates Leading To Chiral. **1999**, *55*, 4029–4042.
- [13]. Galeazzi, R.; Geremia, S.; Mobbili, G.; Orena, M. Cyclisation of (R)- and (S)-N-Allyl-N-(1-Phenylethyl)Methoxycarbonylacetamide Mediated by Mn(III): Preparation and Structural Assignment of 3-Aza-2-Oxobicyclo[3.1.0]Hexanes. *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, *7* (12), 3573–3584.
- [14]. Galeazzi, R.; Martelli, G.; Mobbili, G.; Orena, M.; Rinaldi, S. Synthesis of a Conformationally Restricted Analog of Pregabalin by Stereoselective Alkylation of a Chiral Pyrrolidin-2-One. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (21), 3353–3358.

- [15]. Galeazzi, R.; Martelli, G.; Mobbili, G.; Orena, M.; Politecnica, U. R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *60* (11), 2485–2498.
- [16]. Ling, R.; Ekhatov, I. V.; Rubin, J. R.; Wustrow, D. J. Synthesis of 4- Alkyl-Pyrrolidine-3-Carboxylic Acid Stereoisomers. *Tetrahedron* **2001**, *57* (30), 6579–6588.
- [17]. Kim, S. G.; Lee, S. H.; Park, T. H. Novel Stereoselective Synthesis of All Four Diastereomers of 3 α -Methyl-Pyrrolo[3,4-c]Piperidine from Glycine Ethyl Ester. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (29), 5023–5026.
- [18]. Bryans, J. S.; Horwell, D. C.; Ratcliffe, G. S.; Receveur, J. M.; Rubin, J. R. An in Vitro Investigation into Conformational Aspects of Gabapentin. *Bioorganic Med. Chem.* **1999**, *7* (5), 715–721.
- [19]. Lorthiois, E.; Breitenstein, W.; Cumin, F.; Ehrhardt, C.; Francotte, E.; Jacoby, E.; Ostermann, N.; Sellner, H.; Kosaka, T.; Webb, R. L.; Rigel, D. F.; Hassiepen, U.; Richert, P.; Wagner, T.; Maibaum, J. The Discovery of Novel Potent Trans-3,4-Disubstituted Pyrrolidine Inhibitors of the Human Aspartic Protease Renin from in Silico Three-Dimensional (3D) Pharmacophore Searches. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (6), 2207–2217.
- [20]. Rodríguez Sarmiento, R. M.; Wirz, B.; Iding, H. Chemoenzymatic Preparation of Non-Racemic N-Boc-Pyrrolidine-3,4-Dicarboxylic Acid 3-Ethyl Esters and Their 4-Hydroxymethyl Derivatives. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (11), 1547–1551.
- [21]. Gotor-Fernández, V., Brieva, R., & Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006** *40*(3–4), 111–120.
- [22]. Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., & Cuccia, L. A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Organic Chemistry*, **1991** *56*(8), 2656–2665.