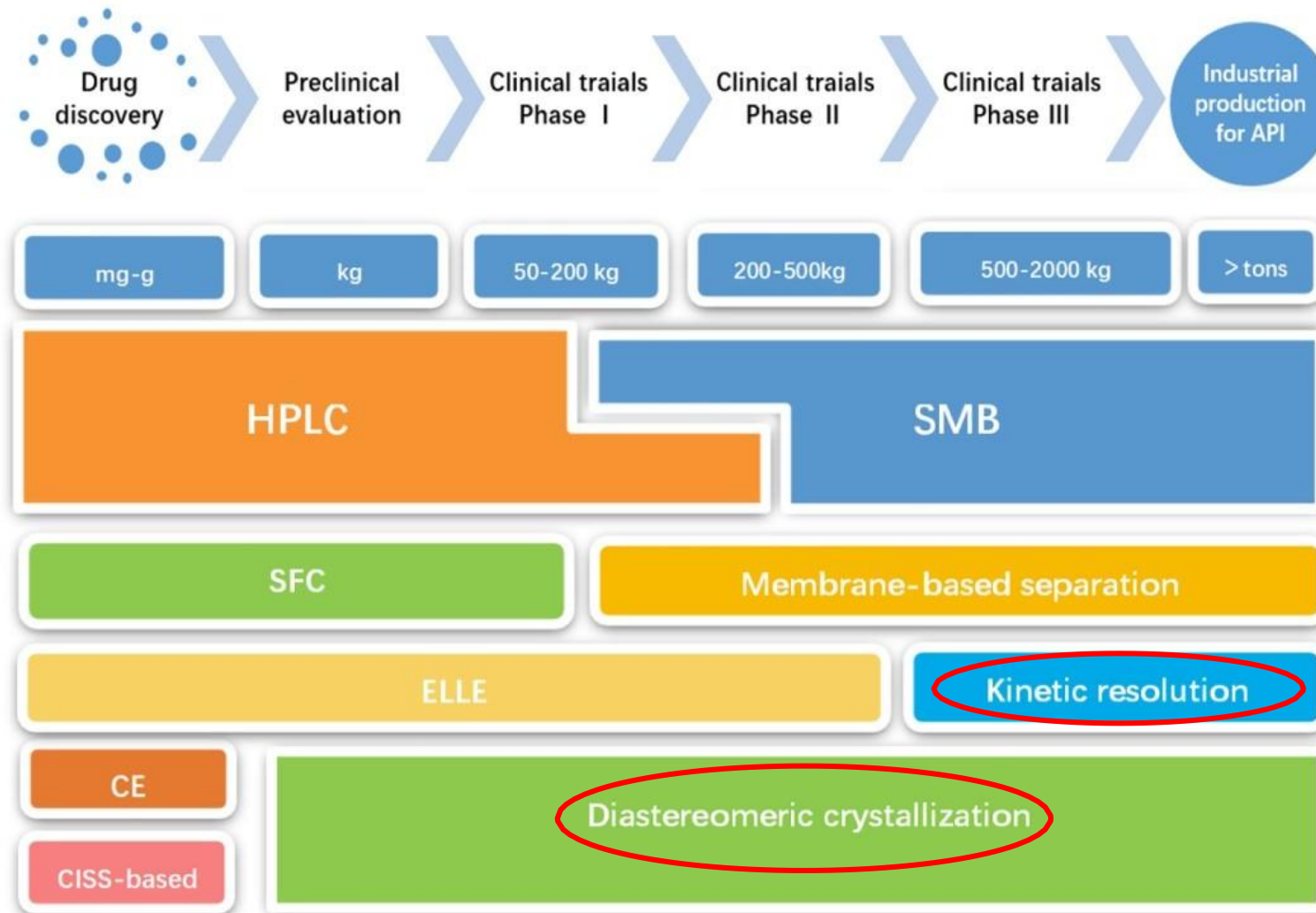

Metodologie sintetiche ed analitiche in chimica farmaceutica

METODI OTTENIMENTO EPC
(Enantiomerically Pure Compounds)

RISOLUZIONE RACEMO

OTTENIMENTO EPC

RISOLUZIONE RACEMO

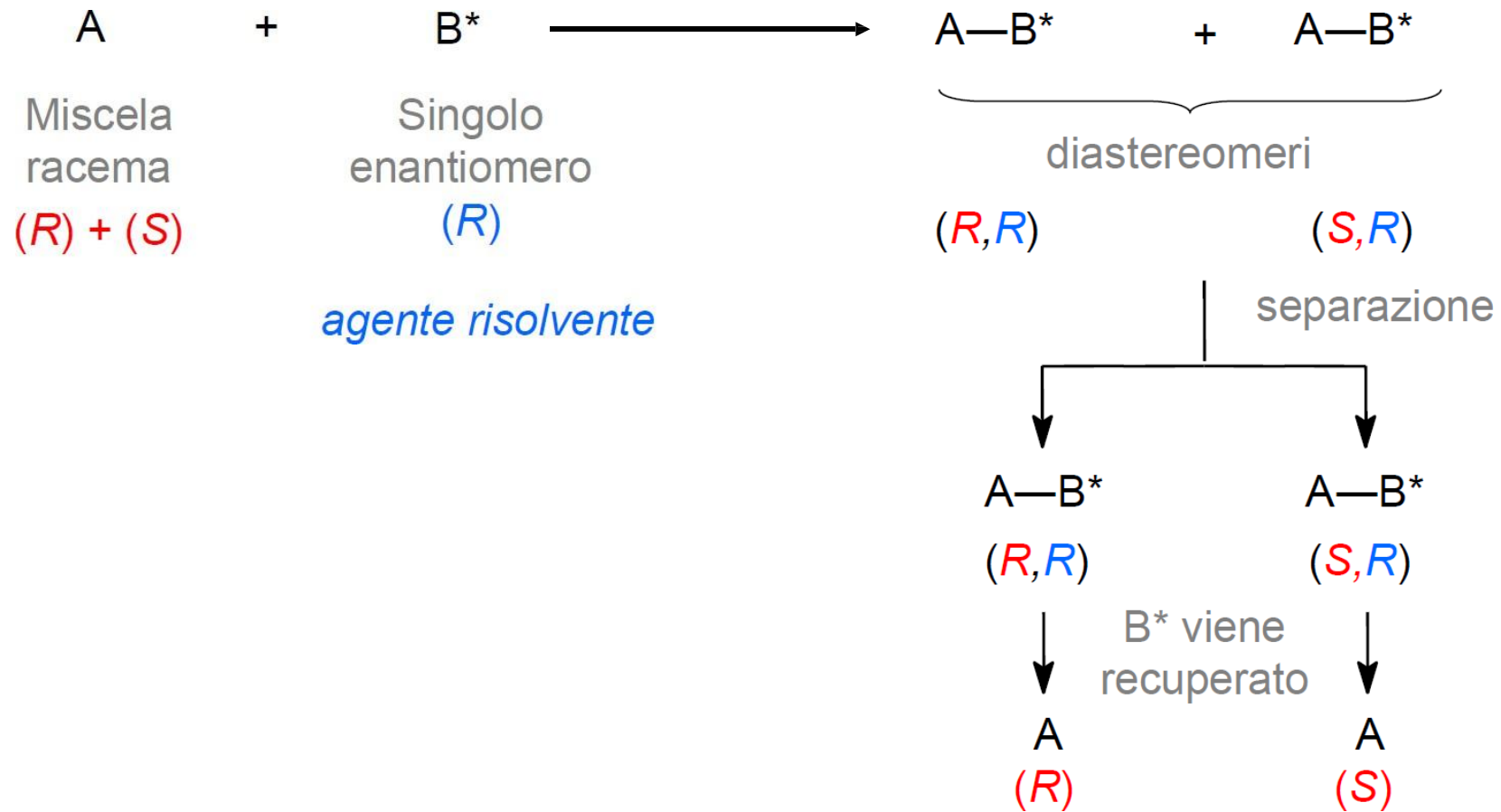


CE: Capillary electrophoresis
CISS: Chirality-induced spin selectivity
ELLE: Enantioselective liquid-liquid extraction
HPLC: High performance liquid chromatography
SMB: Simulated moving bed
SFC: Supercritical fluid chromatography

OTTENIMENTO EPC

RISOLUZIONE CLASSICA

- RISOLUZIONE CLASSICA**



- **RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI SALI DIASTEREOISOMERI**

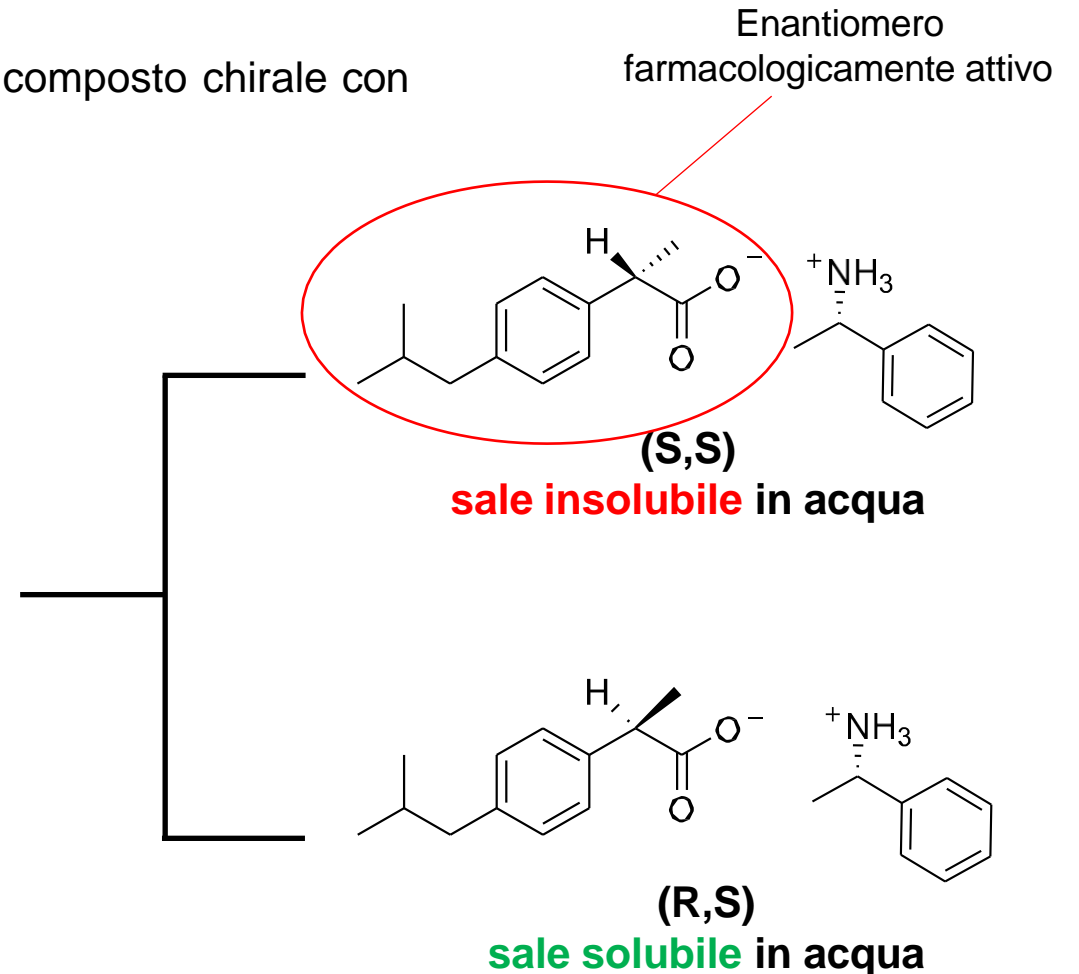
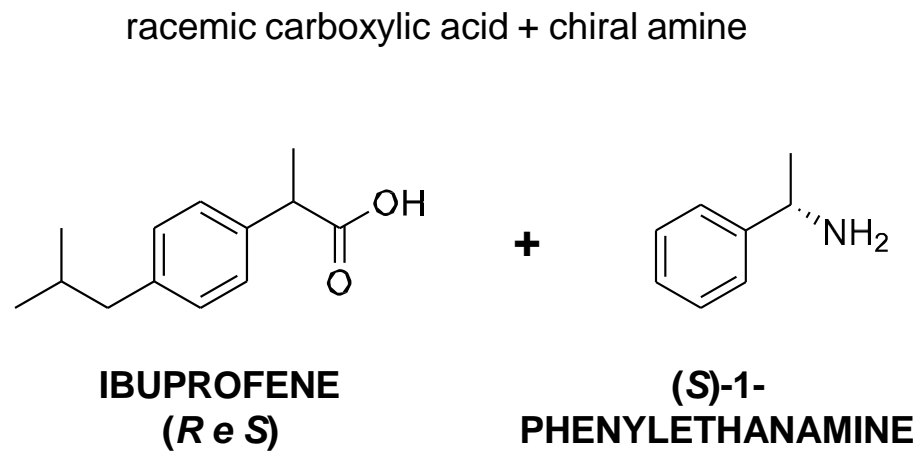
1. Formazione di una coppia di sali diastereomerici di un composto chirale con un agente risolvente chirale
2. Risoluzione mediante separazione dei due sali distereoisomeri e cristallizzazione in un solvente comune
3. Recupero del composto enantiomericamente arricchito

N.B

- ✓ I sali diastereoisomerici possono spesso essere separati mediante cristallizzazione. La ricristallizzazione conferisce un'elevata purezza diastereoisomerica e il processo è applicabile su larga scala.
- ✓ Gli enantiomeri puri possono essere facilmente separati dall'agente risolvente alla fine del processo mediante semplice estrazione con solvente (acido/base), che è ancora una volta applicabile su larga scala.

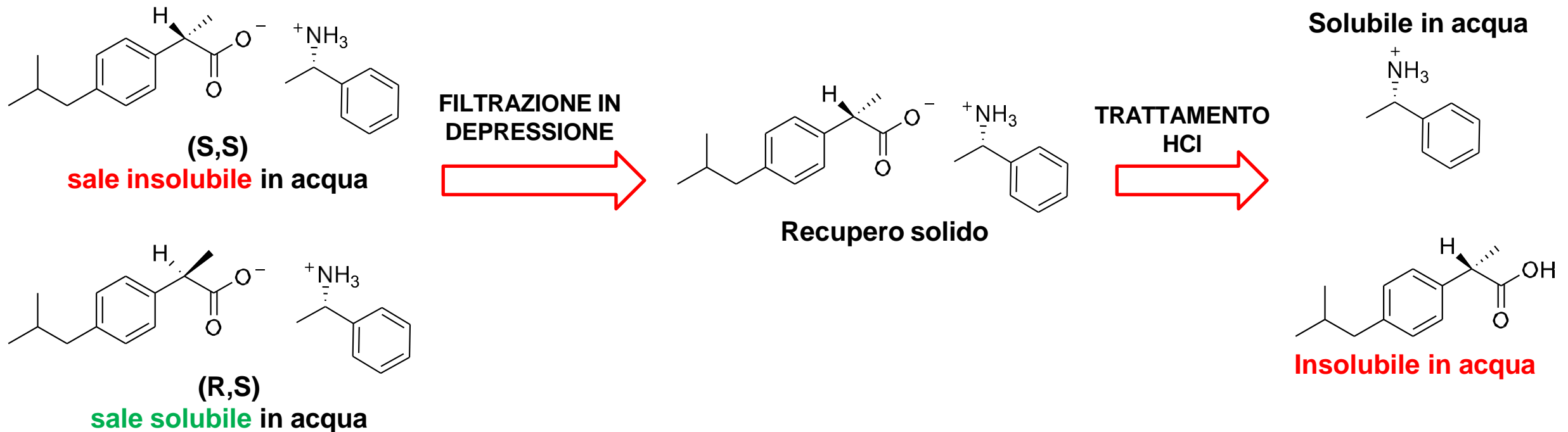
- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI SALI DIASTEREOISOMERI**

1. Formazione di una coppia di sali diastereomerici di un composto chirale con un agente risolvente chirale



• RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI SALI DIASTEREOISOMERI

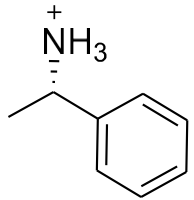
2. Risoluzione mediante separazione dei due sali diastereoisomeri e cristallizzazione in un solvente comune
3. Recupero del composto enantiomericamente arricchito



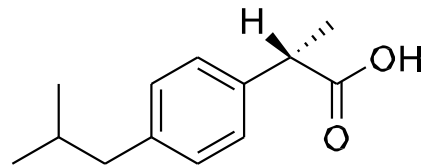
- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI SALI DIASTEREOISOMERI**

- Risoluzione mediante separazione dei due sali diastereoisomeri e cristallizzazione in un solvente comune
- Recupero del composto enantiomericamente arricchito

Solubile in acqua

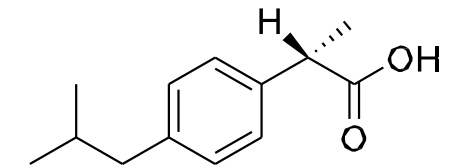


FILTRAZIONE IN
DEPRESSIONE

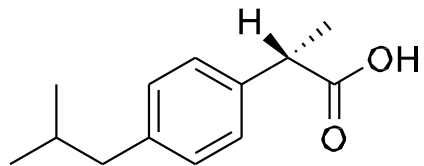


Recupero solido

CRISTALLIZZAZIONE



(S)-acido 2-[4-(2-
metilpropil)fenil]propanoico

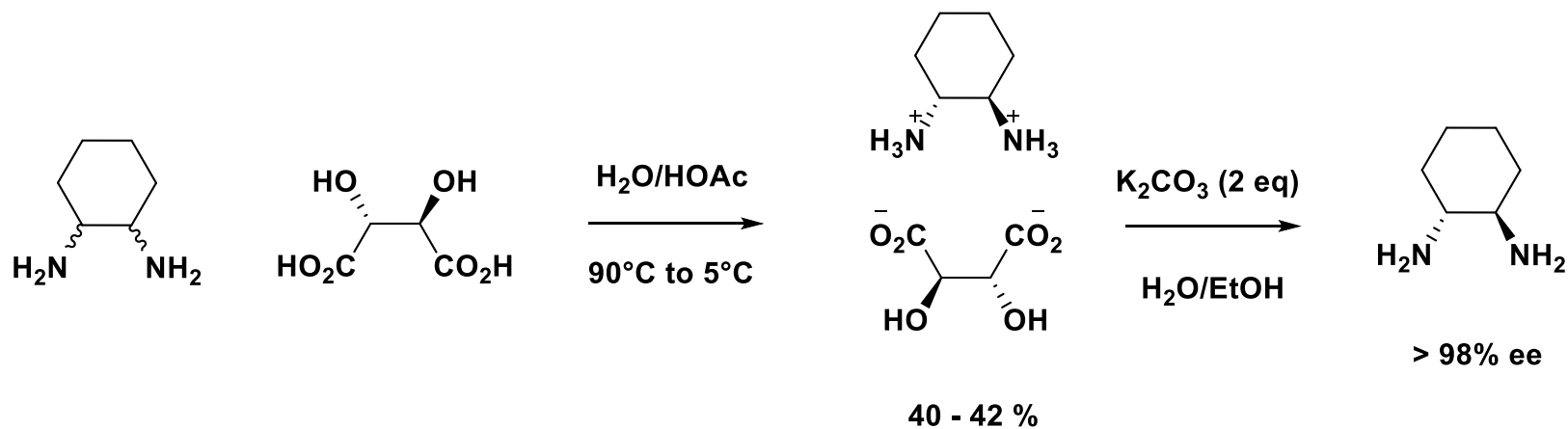


Insolubile in acqua

OTTENIMENTO EPC

RISOLUZIONE CLASSICA

- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI SALI DIASTEREOISOMERI**



- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI COMPOSTI DIASTEREOISOMERI**



A)

MISCELA
RACEMICA

AGENTE
RISOLVENTE OTT.
PURO
(es. enantiomero *R*)

(*R*)-alcol (*R*)-carbossilato
(*S*)-alcol (*R*)-carbossilato

B)

AGENTE
RISOLVENTE OTT.
PURO
(es. enantiomero *R*)

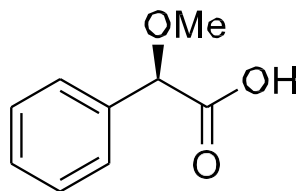
MISCELA
RACEMICA

(*R*)-alcol (*R*)-carbossilato
(*R*)-alcol (*S*)-carbossilato

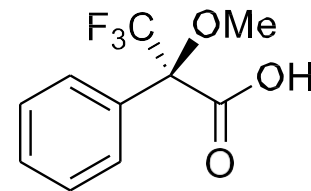
• RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI COMPOSTI DIASTEREOISOMERI

Esempi agenti risolventi

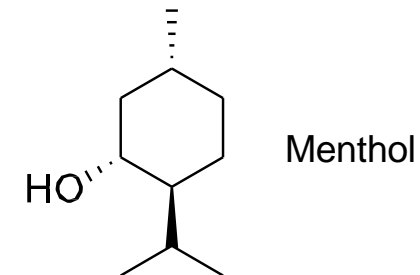
(poco costosi, disponibili commercialmente entrambi gli enantiomeri)



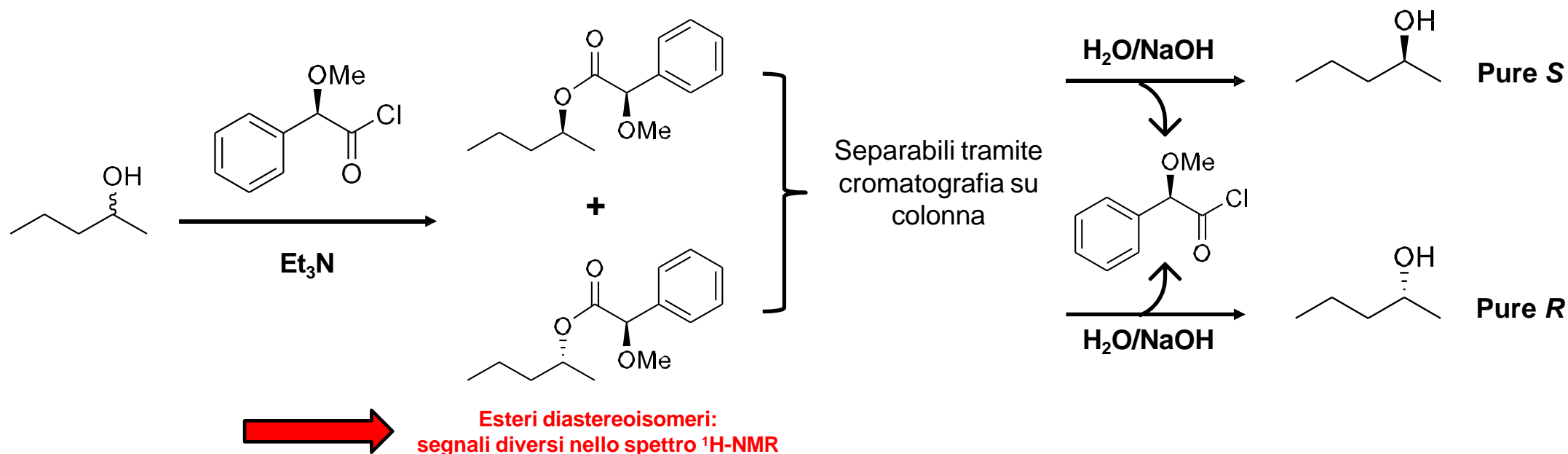
(*R*)-*O*-methylmandelic acid



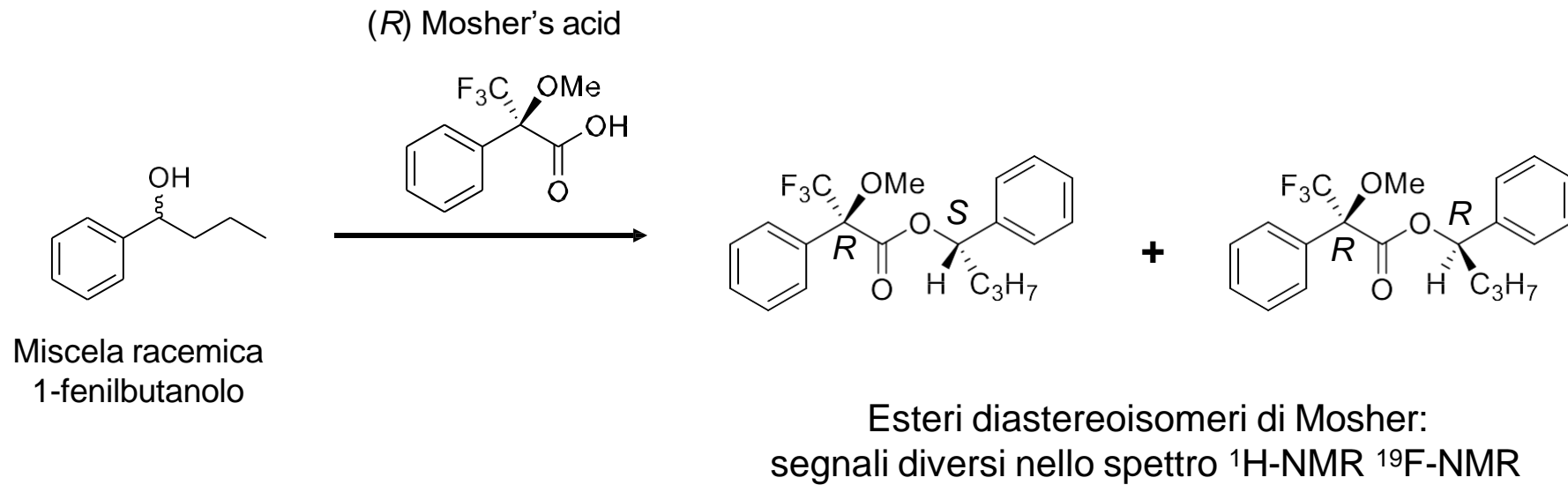
(*R*) Mosher's acid



Menthol



- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI ESTERI DI MOSHER**



- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI ESTERI DI MOSHER**

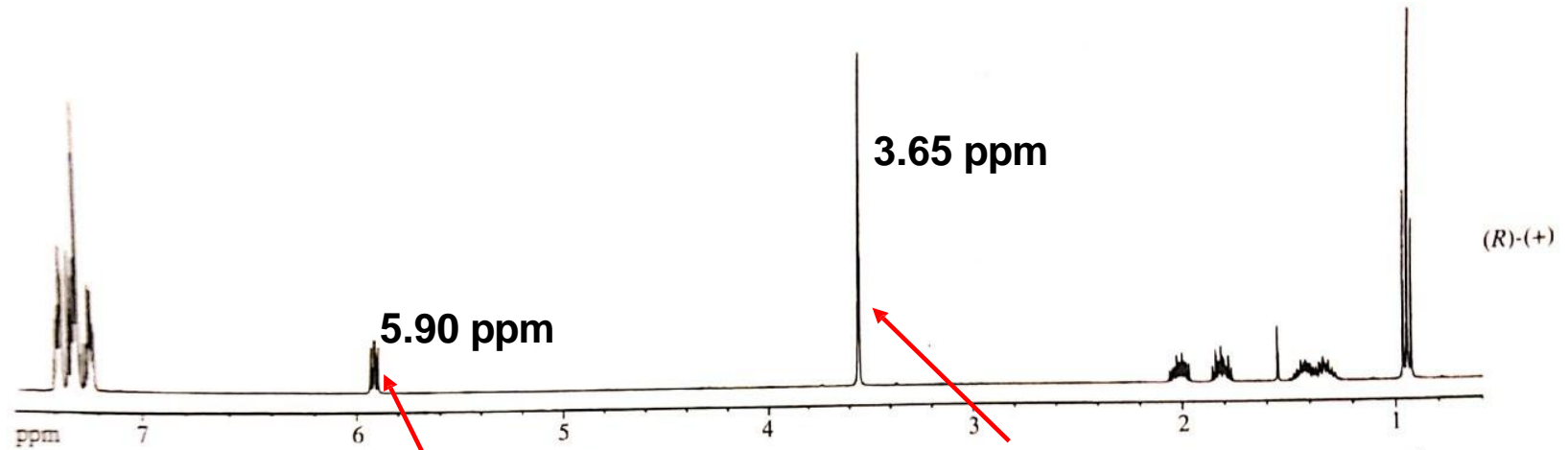
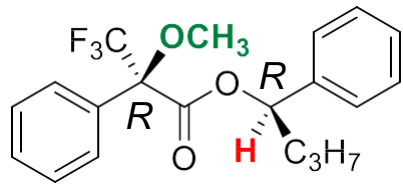


Fig. 6.6(b) Mosher's ester derivative of *(R)*-(+)-1-phenylbutan-1-ol.

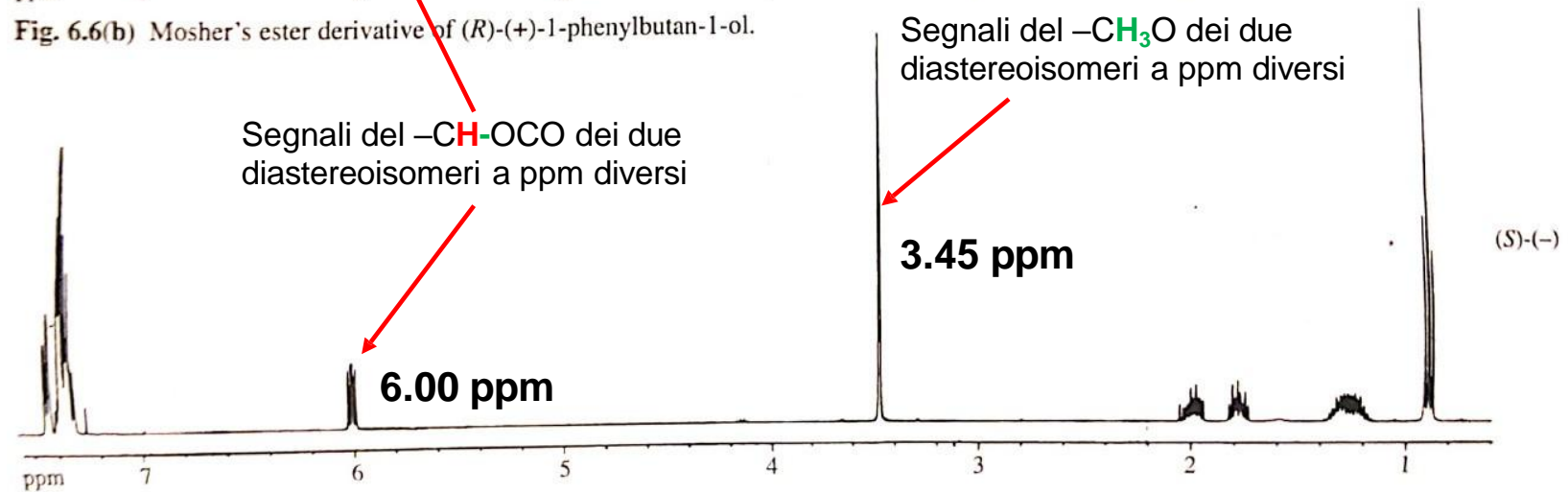
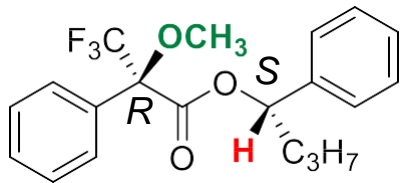
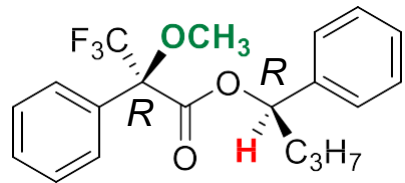


Fig. 6.6(c) Mosher's ester derivative of *(S)*-(-)-1-phenylbutan-1-ol.

Segnali del $-\text{CH}-\text{OCO}$ dei due diastereoisomeri a ppm diversi

Segnali del $-\text{CH}_3\text{O}$ dei due diastereoisomeri a ppm diversi

- RISOLUZIONE CLASSICA: FORMAZIONE DI ESTERI DI MOSHER**



Miscela dei due diastereoisomeri

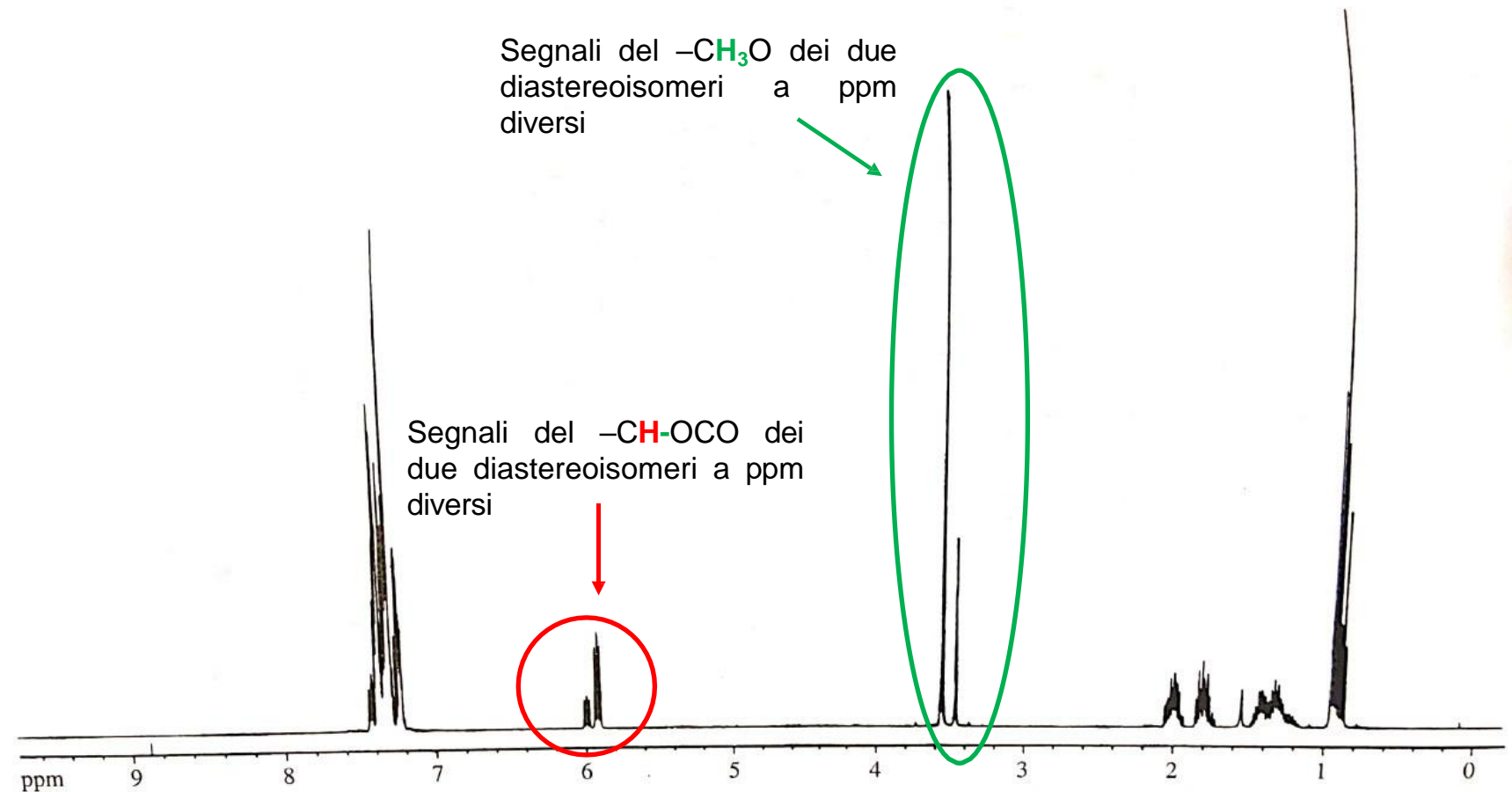
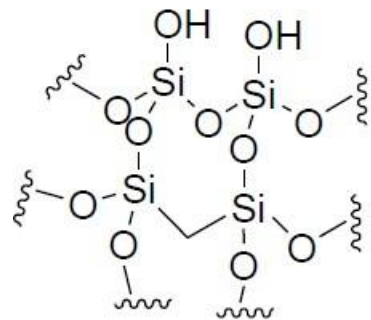
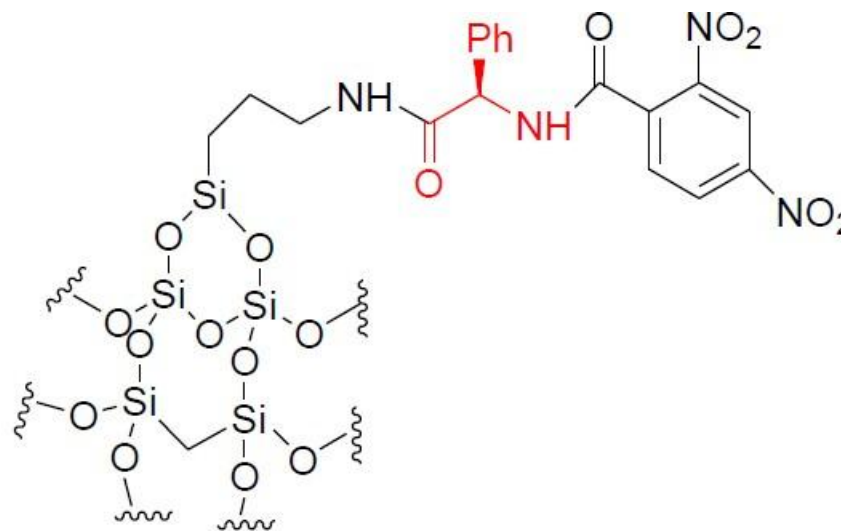


Fig. 6.6(d) Spectrum of a mixture of the Mosher's esters of (*R*)-(+)- (major) and (*S*)-(-)- (minor) 1-phenylbutan-1-ol.

- **RISOLUZIONE CLASSICA: RISOLUZIONE FISICA**



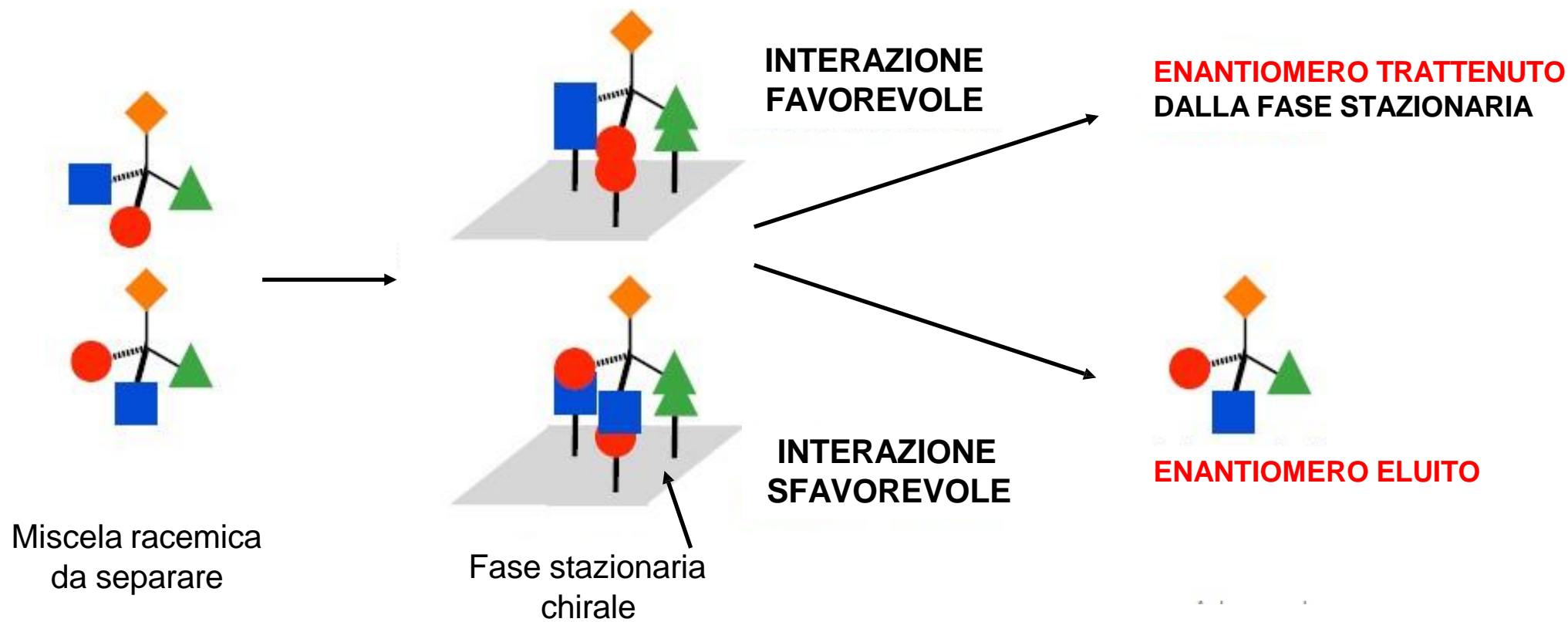
Gel di silice
**Fase stazionaria
achirale**



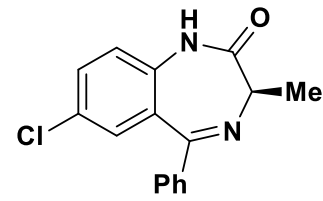
Gel di silice derivatizzata con composto chirale
enantiomericamente puro
Fase stazionaria chirale

- RISOLUZIONE CLASSICA: RISOLUZIONE FISICA**

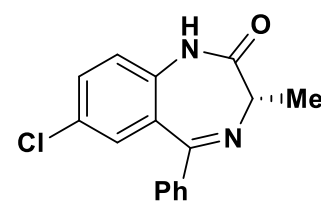
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
GC: Gas Chromatography



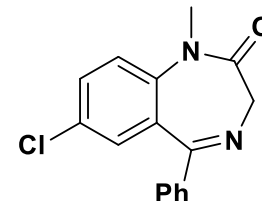
- RISOLUZIONE CLASSICA: RISOLUZIONE FISICA**



enantiomero (R)



enantiomero (S)



Valium

1. racemic mixture loaded on to column

R S



column

2. compound forced through column using an eluent



3. S enantiomer has a greater affinity for the chiral stationary phase, so it travels more slowly



4. R enantiomer reaches the bottom of the column first

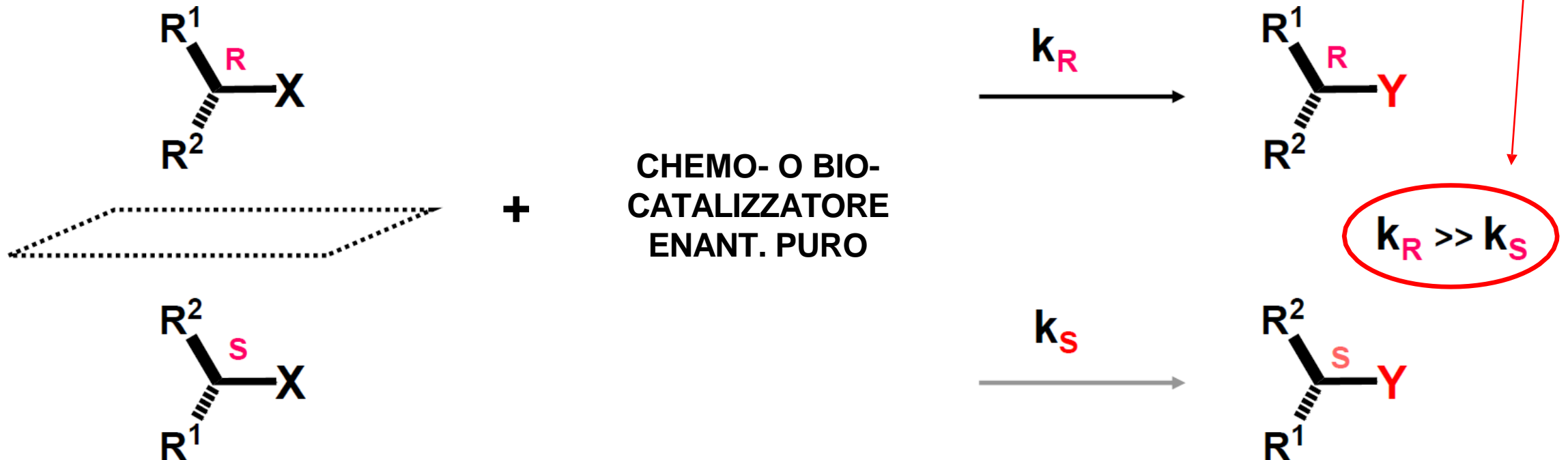


5. the enantiomers are resolved



OTTENIMENTO EPC

- RISOLUZIONE CINETICA**

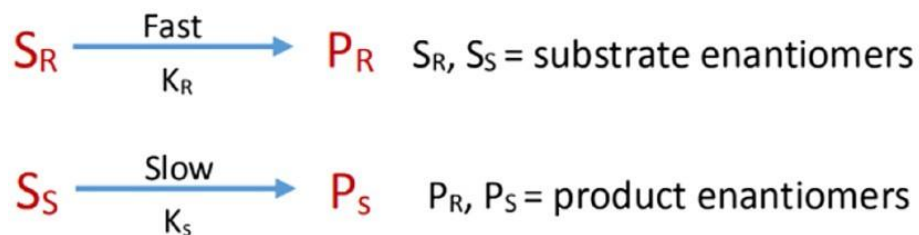


In questo caso *R* enantiomero “veloce” o **eutomero**; *S* enantiomero “lento” o **distomero**

Il principio di base della risoluzione cinetica è la differenza nella velocità di reazione di due enantiomeri con entità chirale

OTTENIMENTO EPC

• RISOLUZIONE CINETICA

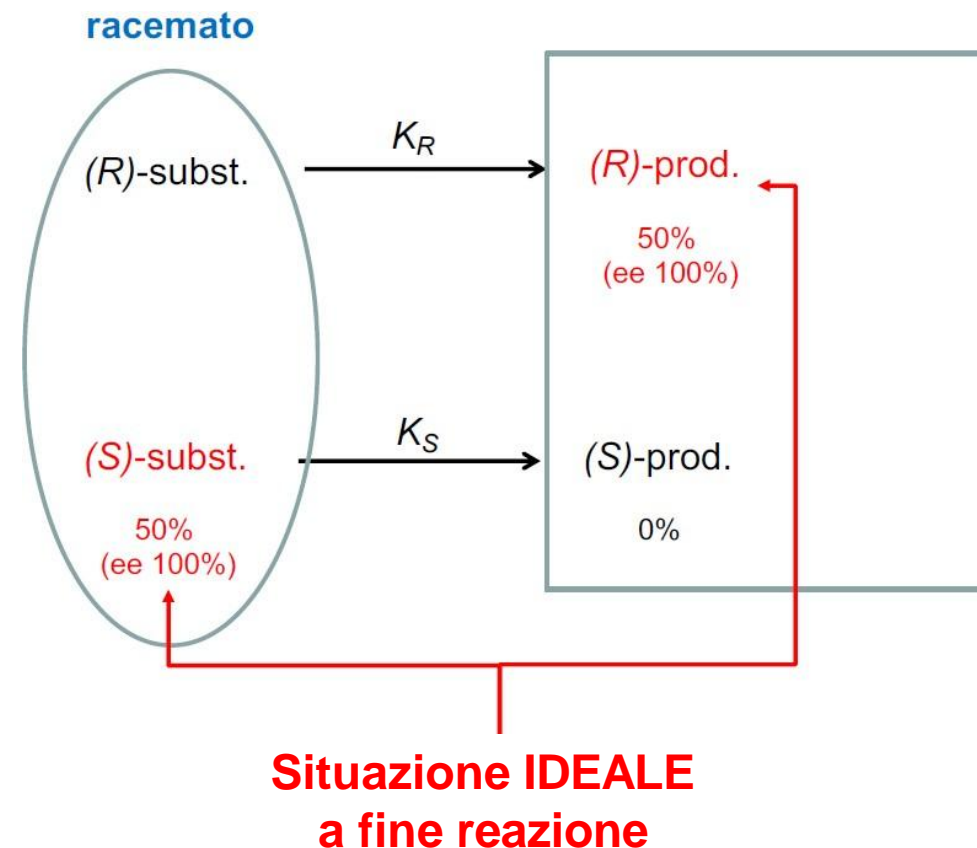


Up to 50% yield

Svantaggi:

1. Massima resa del 50%
2. Separazione del prodotto dal substrato è necessaria
3. ee dei prodotti può non essere ottimale

RISOLUZIONE CINETICA



OTTENIMENTO EPC

• RISOLUZIONE CINETICA

$$E = \frac{k_R}{k_S} \quad \text{Rapporto enantiomerico}$$

$$E = \frac{\ln \left[\frac{ee_P (1 - ee_S)}{ee_P + ee_S} \right]}{\ln \left[\frac{ee_P (1 + ee_S)}{ee_P + ee_S} \right]}$$

R enantiomero "veloce".

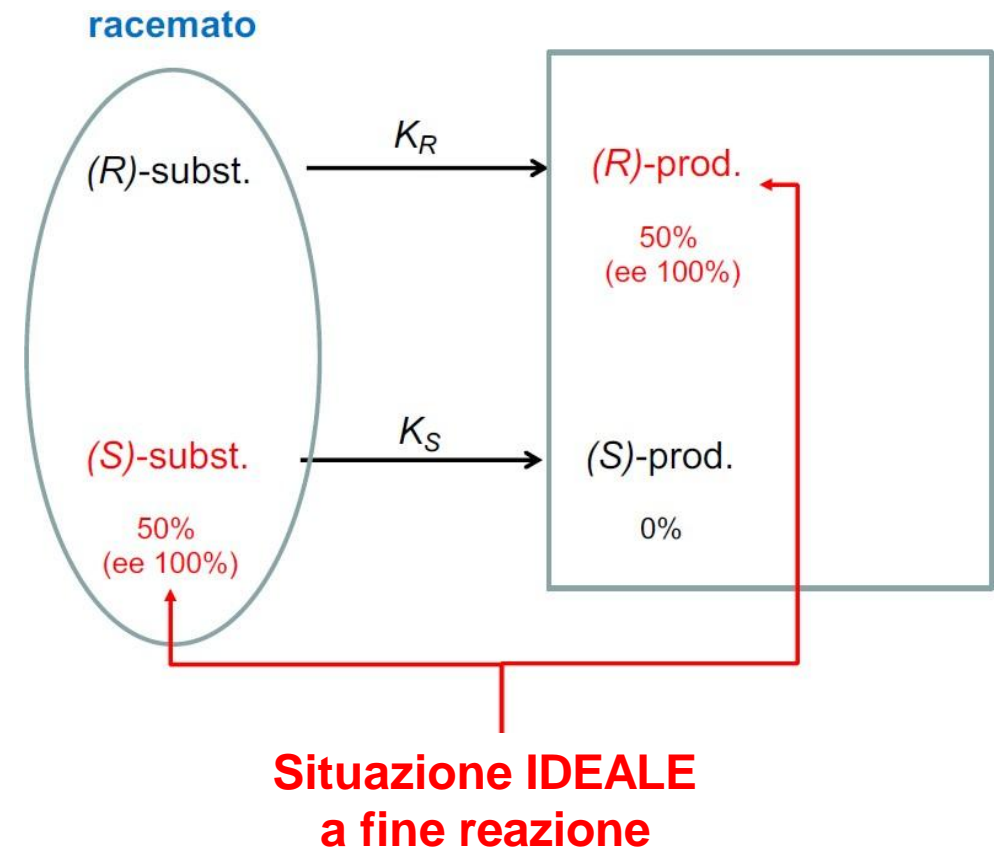
Coincide con P (prodotto) della **seconda relazione**.

S enantiomero "lento".

Coincide con S (substrato non reagito) **della seconda relazione**.

- **ee. dipende dalla conversione**
- ee. del prodotto diminuisce al di sopra del 50% conversione
- ee. del substrato è basso sotto il 40% conversione
- **la conversione è la frazione di substrato convertita nel prodotto**

RISOLUZIONE CINETICA



RISOLUZIONE CINETICA

Allo stesso valore di conversione:

E	ee _P [%]
10	83
19	90
49	95
100	98

E : 1 (nessuna stereoselettività)

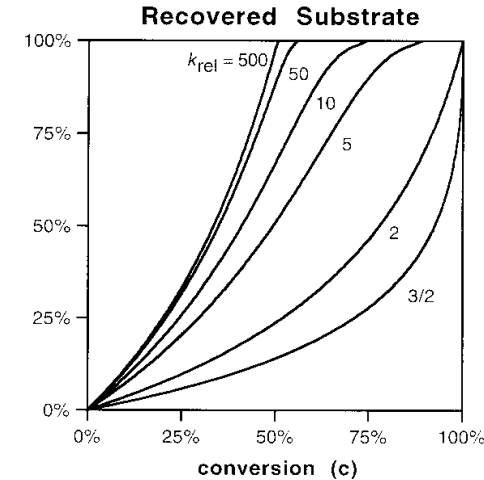
E fino a 10 (bassa selettività)

E: 15 –30 (modesta – buona)

E > 200 (eccellente)

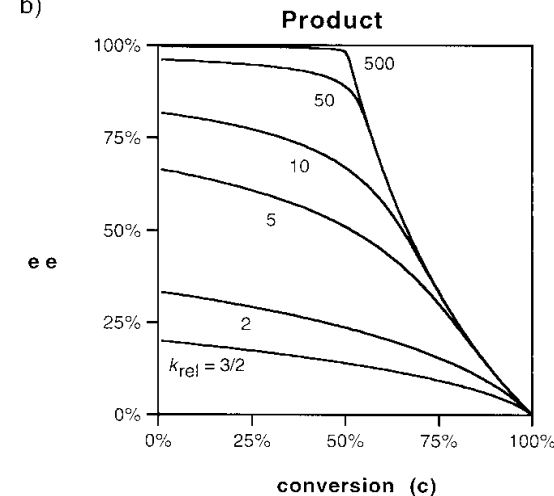
RISOLUZIONE CINETICA

a)



$$k_{rel} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee)]}{\ln[(1-c)(1+ee)]} \quad (\text{Eq. 2})$$

b)



$$k_{rel} = \frac{\ln[1-c(1+ee)]}{\ln[1-c(1-ee)]} \quad (\text{Eq. 3})$$

Il **prodotto** ha la massima purezza ottica prima del 50% di conversione, quando l'enzima o il catalizzatore sono liberi di scegliere: dopo il 50% di conversione, in mancanza dell'enantiomero "giusto", viene convertito l'altro e l'ee del prodotto diminuisce rapidamente

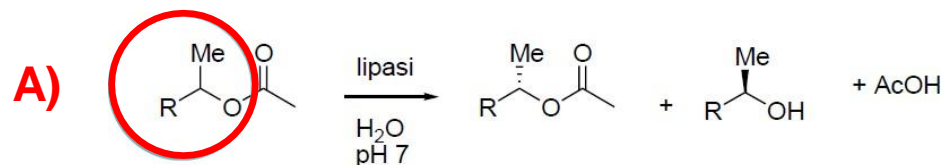
La purezza ottica **dell'enantiomero residuo** resta bassa prima del 40% di conversione, sale significativamente verso il 50%

OTTENIMENTO EPC

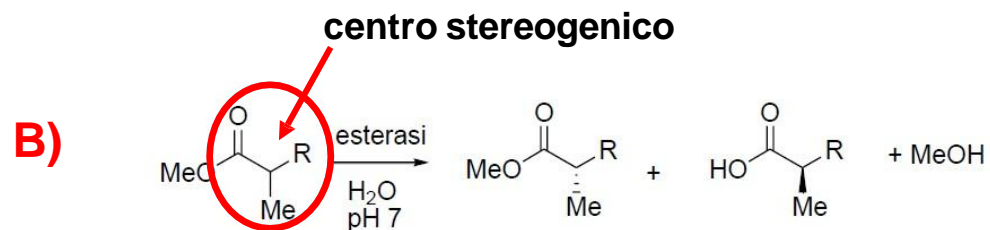
RISOLUZIONE CINETICA

RISOLUZIONE CINETICA: ENZIMI COME CATALIZZATORI

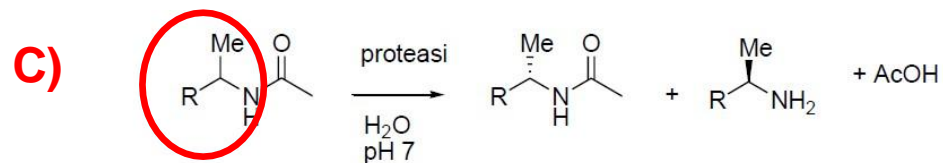
In condizioni ottimali, l'enzima riconosce la chiralità del substrato e converte solo 1 enantiomero nel prodotto



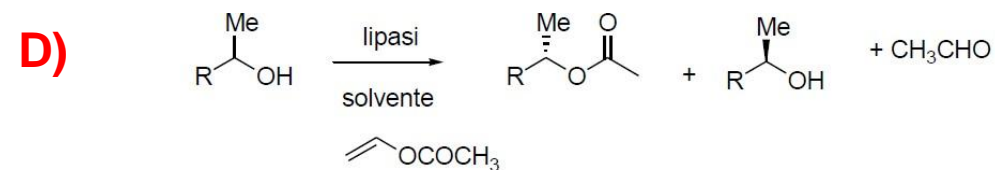
Idrolisi di esteri di alcoli chirali (enzimi preferiti: lipasi)



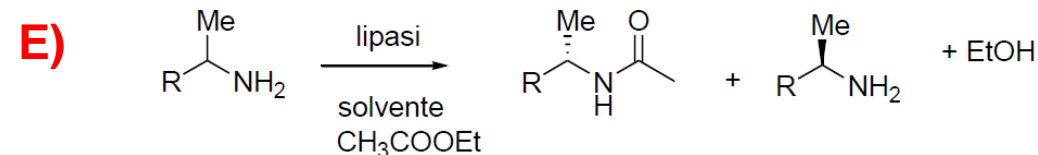
Idrolisi di esteri di acidi carbossilici chirali (enzimi preferiti: esterasi)



Idrolisi di ammidi di ammine chirali (enzimi preferiti: proteasi)



Acetilazioni di alcoli secondari chirali (enzimi preferiti: lipasi)



Acetilazioni di ammine chirali (enzimi preferiti: lipasi)

Esterasi e Lipasi non richiedono cofattori

- **RISOLUZIONE CINETICA: ENZIMI COME CATALIZZATORI**

In condizioni ottimali, l'enzima riconosce la chiralità del substrato e converte solo 1 enantiomero nel prodotto

- ✓ **Chemioselettività**

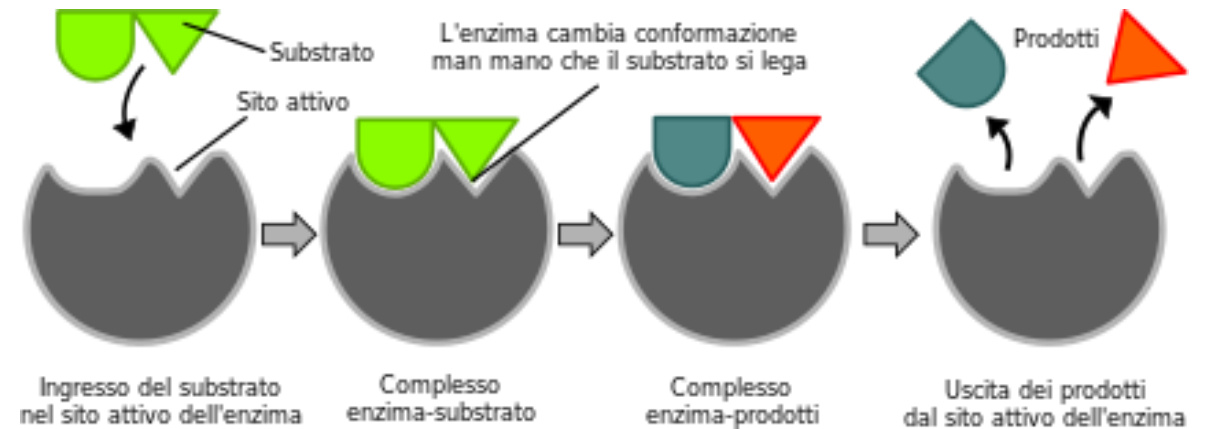
Specificità verso un ben determinato gruppo funzionale (esempi verso -OH, -COOH, -CHO, ecc...)

- ✓ **Regioselettività**

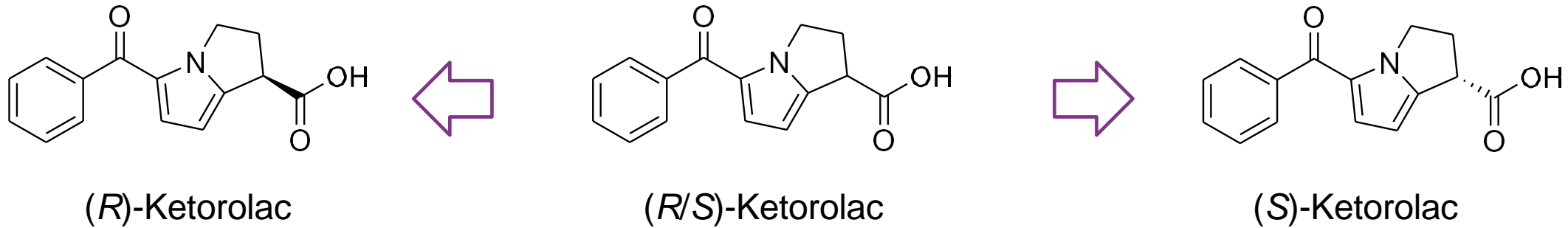
Specificità verso una specifica regione di una molecola rappresentante il substrato

- ✓ **Stereoselettività**

Selettività verso uno stereoisomero ben specifico: un substrato prochirale può essere trasformato in un prodotto enant. puro attraverso un processo di asimmetrizzazione. Enantiomeri di un substrato racemico possono reagire con velocità diverse



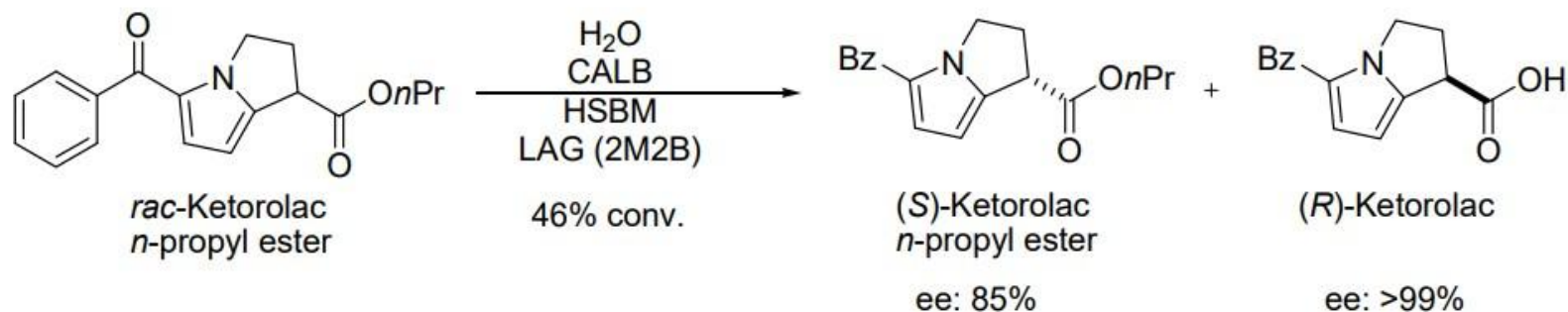
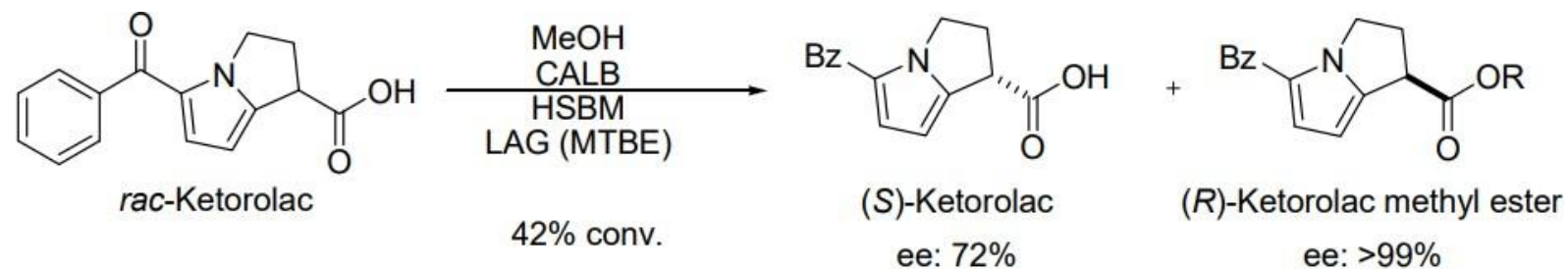
- RISOLUZIONE CINETICA: ENZIMI COME CATALIZZATORI**



Il **ketorolac** è un farmaco antinfiammatorio non steroideo (Fans)

Recenti studi hanno evidenziato la **preponderante attività antinfiammatoria dell'enantiomero (S)-Ketorolac** rispetto all'enantiomero (*R*). Tuttavia, il Ketorolac è commercializzato come miscela racemica (Toradol, Lixidol, Acular, Kevindol, Rikedol)

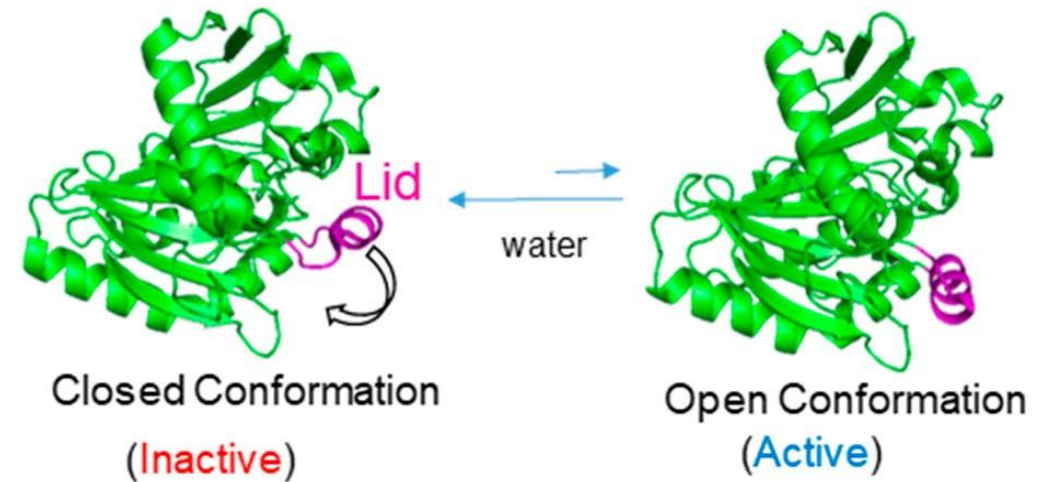
- RISOLUZIONE CINETICA: ENZIMI COME CATALIZZATORI**



LAG: Liquid assisted grinding technique
HSBM: High-speed ball milling
2M2B: 2-methyl-2-butanol
MTBE: methyl *t*-butyl ether
CALB: Candida Antarctica Lipase B

- **RISOLUZIONE CINETICA: ENZIMI COME CATALIZZATORI**

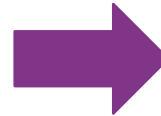
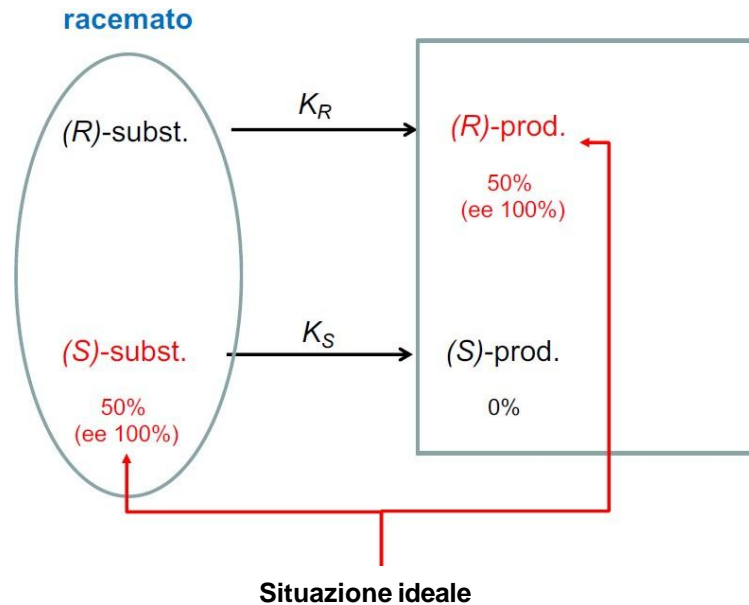
Le **lipasi** presentano un oligopeptide idrofobico (LID) che mantiene chiusa l'entrata del sito catalitico. L'apertura è sfavorita in ambienti idrofilici e favorita in presenza di solventi poco polari. Per questo le lipasi vengono preferibilmente **utilizzate per catalizzare transesterificazioni in solventi organici.**



- ✓ Elevata tolleranza ai **solventi organici** visto che i loro ambienti fisiologici, le riserve di grassi, sono lipofili (ciò le distingue dalle esterasi che invece prediligono ambienti di reazione acquosi)

- RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA**

RISOLUZIONE CINETICA (KR)



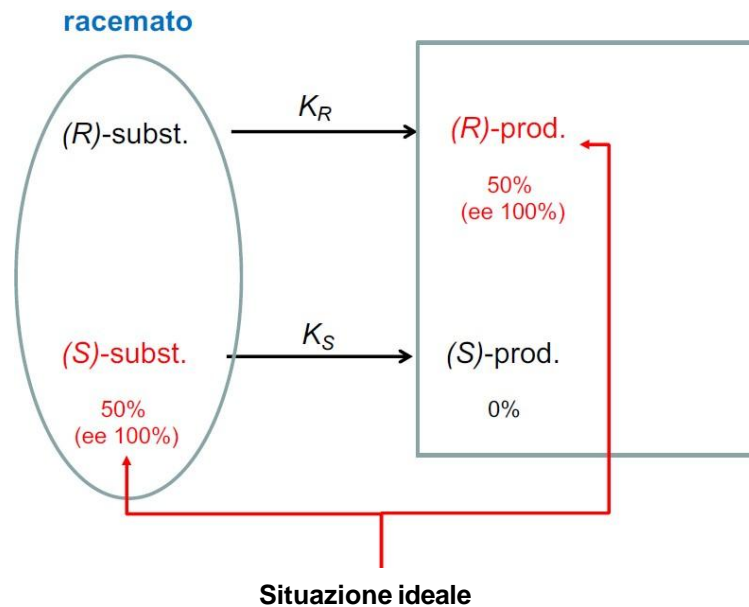
Risoluzione cinetica accoppiata alla
racemizzazione in situ dell'enantiomero "lento"
RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA (DKR)

Svantaggi:

1. Massima resa del 50%
2. Separazione del prodotto dal substrato è necessaria
3. ee dei prodotti può non essere ottimale

• RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA

RISOLUZIONE CINETICA (KR)

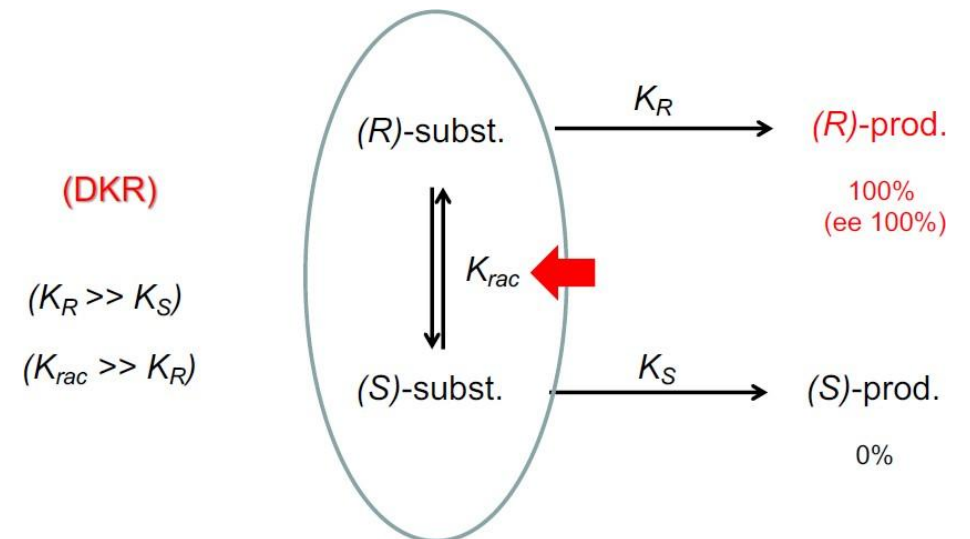


Svantaggi:

1. Massima resa del 50%
2. Separazione del prodotto dal substrato è necessaria
3. ee dei prodotti può non essere ottimale

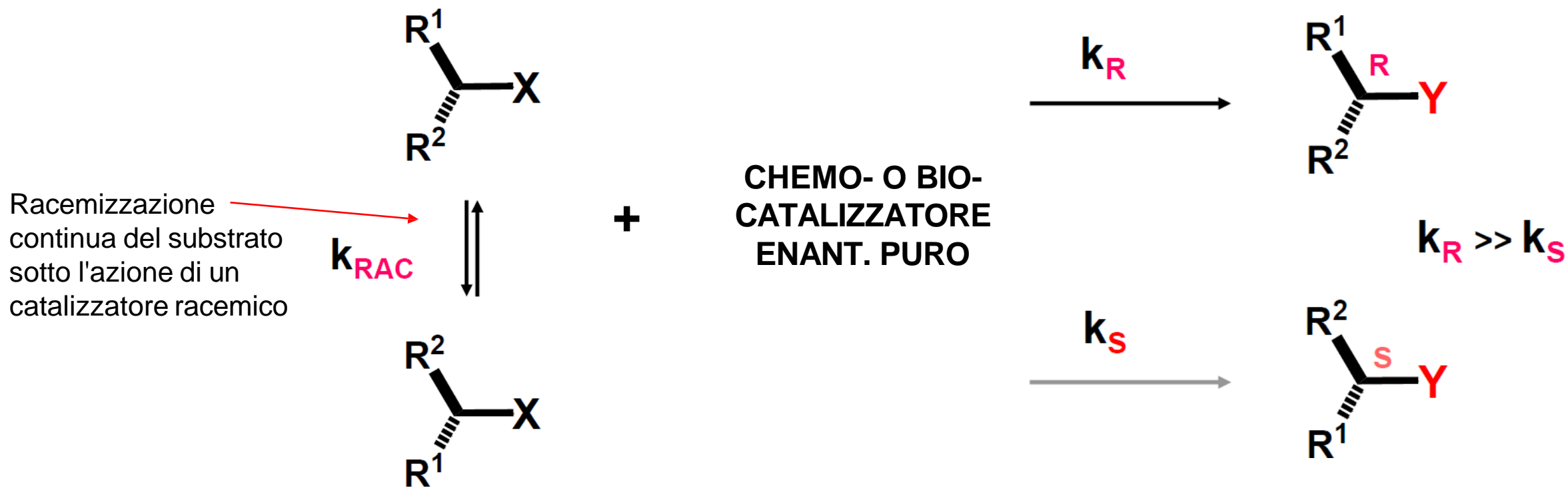
Risoluzione cinetica accoppiata alla racemizzazione in situ dell'enantiomero "lento"

RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA (DKR)



La racemizzazione del substrato di partenza prima della reazione ha il vantaggio che può, in linea di principio, portare a conversione quantitativa del materiale di partenza racemico in un singolo stereoisomero del prodotto

- RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA:**



- **RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA:**

- **Per una DKR efficiente:**

- La corrispondente risoluzione cinetica (K_R) deve essere irreversibile
 - La stereoselettività deve essere alta ($K_S \gg K_R$ o $K_R \gg K_S$), (es. $K_R = 10K_S$)
 - La velocità di racemizzazione deve essere maggiore della velocità di reazione
 - La racemizzazione del prodotto deve essere trascurabile
 - Il catalizzatore di racemizzazione non può interagire con i prodotti della reazione
 - La risoluzione cinetica e la racemizzazione richiedono le stesse condizioni di reazione

- RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA:**

La **racemizzazione dei substrati** è il fattore più critico nella DKR

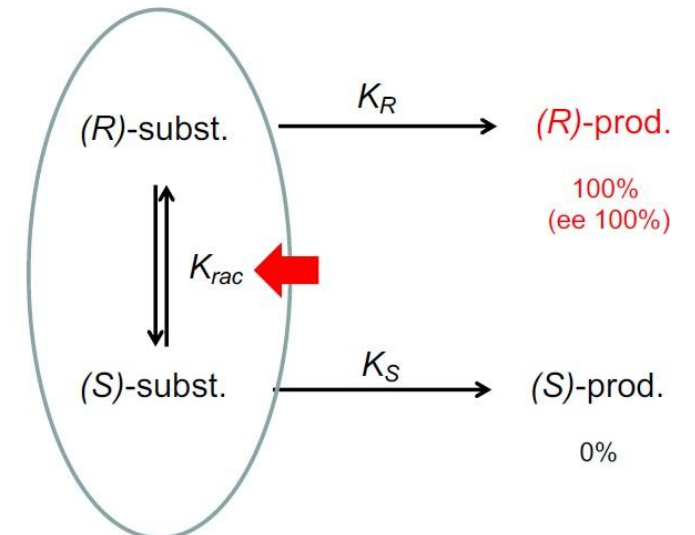


Più veloce è la trasformazione di diastomero in eutomero maggiore sarà la produzione del prodotto desiderato

Se la velocità di RACEMIZZAZIONE è sufficientemente elevata rispetto alla VELOCITÀ DI REAZIONE la resa in prodotti enant. puri dalle miscele racemiche può teoricamente raggiungere il 100%

$$K_{rac} > K_R \gg K_S$$

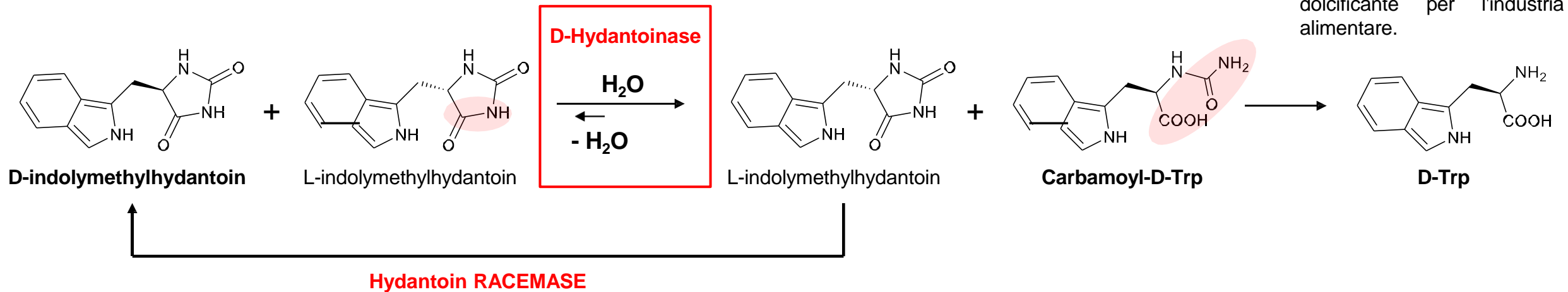
(DKR)
 $(K_R \gg K_S)$
 $(K_{rac} \gg K_R)$



- **RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE**
- enzima-catalizzata
- base-catalizzata
- acido-catalizzata
- catalizzata da metalli di transizione

- RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE**

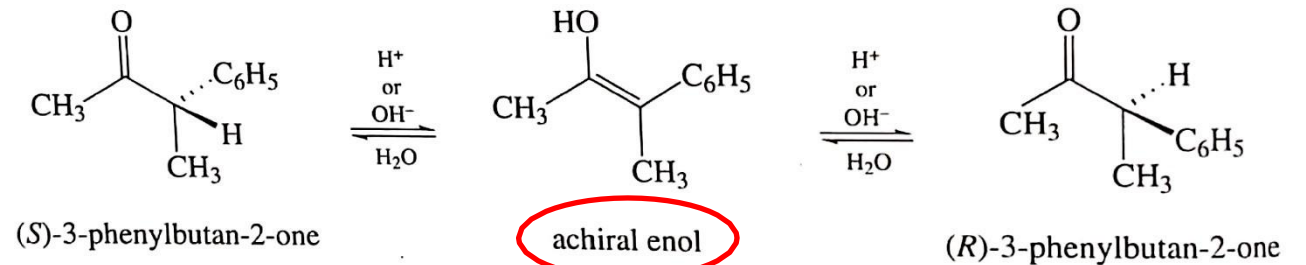
- enzima-catalizzata
- base-catalizzata
- acido-catalizzata
- catalizzata da metalli di transizione



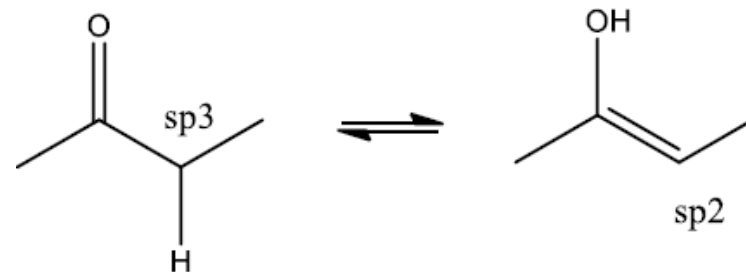
Utilizzato per produrre farmaci importanti nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare, peptidi per il trattamento della dermatite, e come dolcificante per l'industria alimentare.

• RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE

- enzima-catalizzata
- **base-catalizzata**
- **acido-catalizzata**
- catalizzata da metalli di transizione

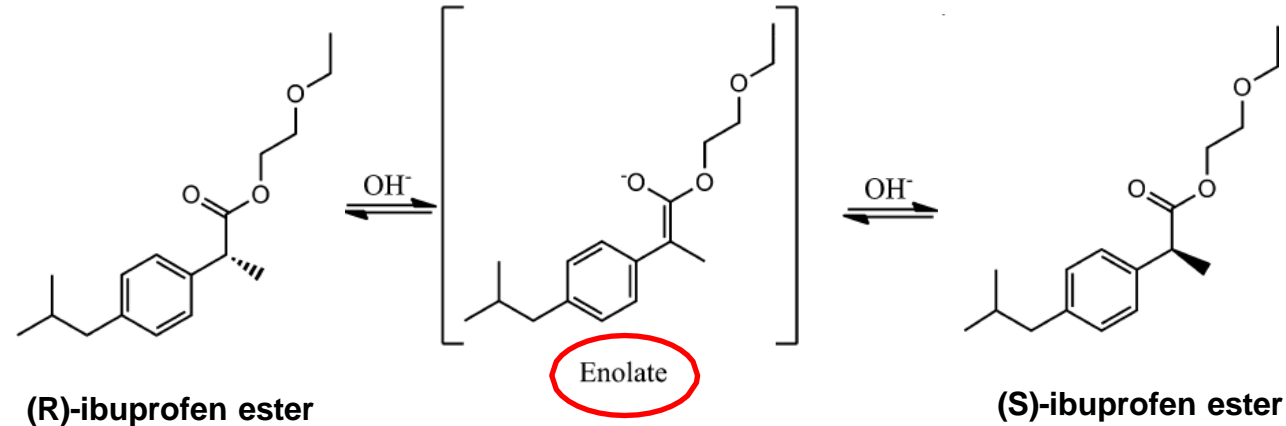


Tautomeria chetoenolica
 Formazione dell'enolo/enolato
favorita da acidi/basi



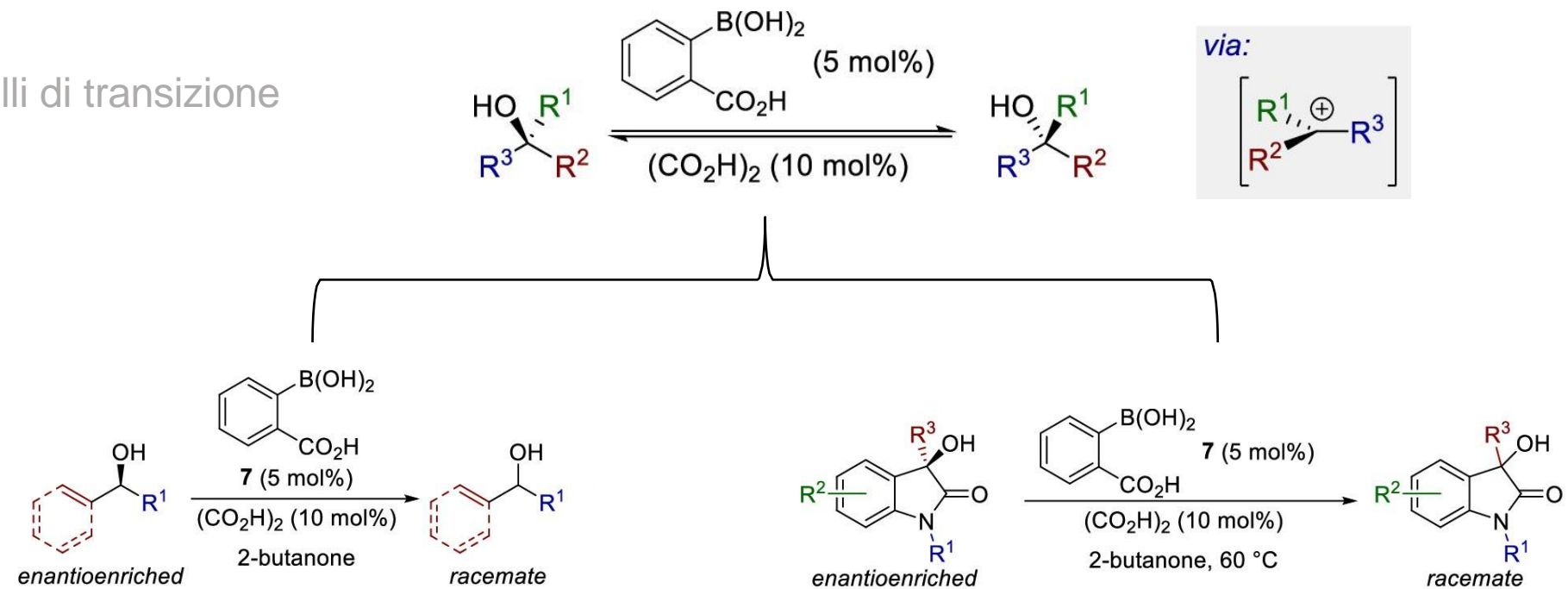
- **RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE**

- enzima-catalizzata
- **base-catalizzata**
- acido-catalizzata
- catalizzata da metalli di transizione



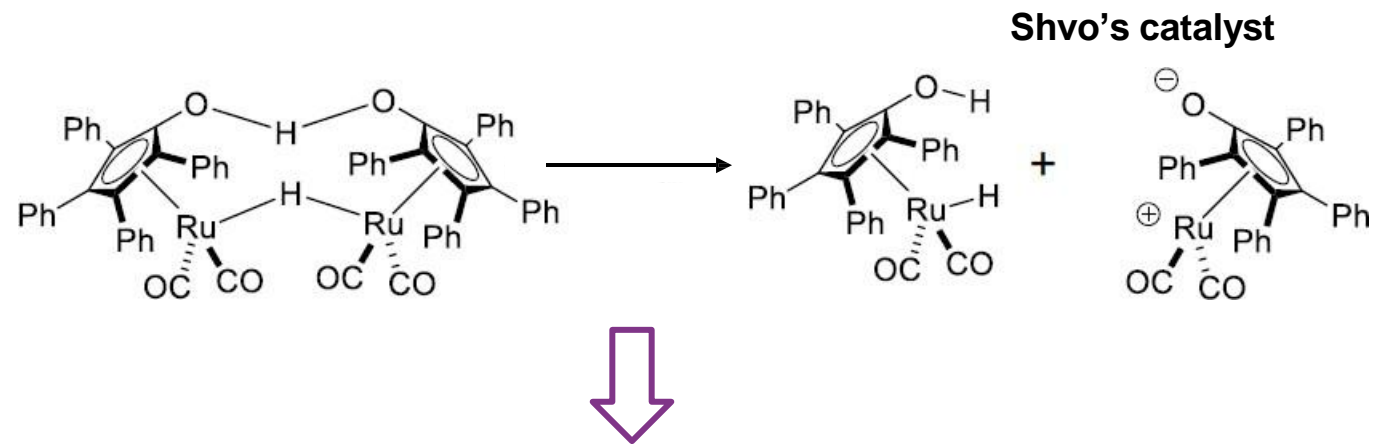
• RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE

- enzima-catalizzata
- base-catalizzata
- **acido-catalizzata**
- catalizzata da metalli di transizione

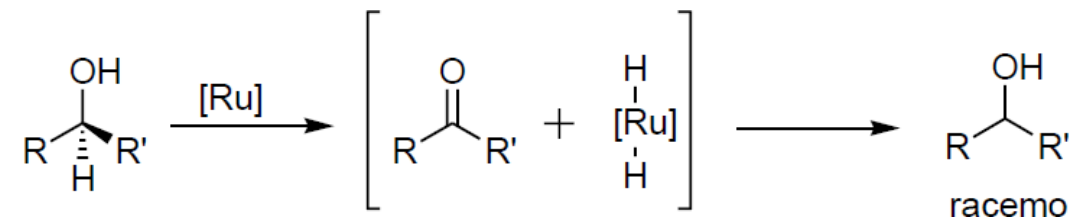


• RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE

- enzima-catalizzata
- base-catalizzata
- acido-catalizzata
- **catalizzata da metalli di transizione**



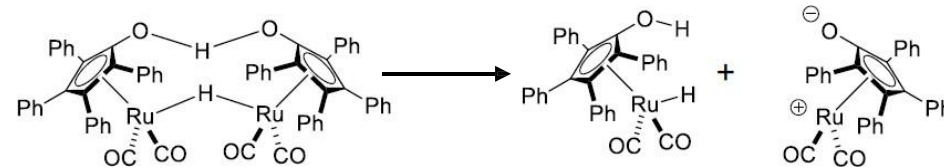
Meccanismo di racemizzazione



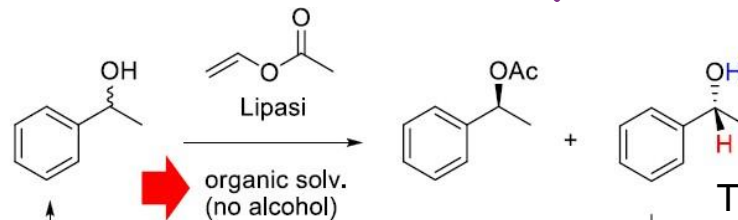
RISOLUZIONE CINETICA DINAMICA: RACEMIZZAZIONE

- enzima-catalizzata
- base-catalizzata
- acido-catalizzata
- catalizzata da metalli di transizione**

Shvo's catalyst



Ottimi risultati sono stati ottenuti con catalizzatori di rutenio e lipasi



② Trasferimento non stereospecifico dell'idruro dal Ru al chetone generato dal substrato, con conseguente formazione dell'alcol racemico

Trasferimento di un idruro dal substrato al Ru con formazione rispettivamente del chetone e della forma ridotta del catalizzatore ①

