

Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu doktorske disertacije

Kandidat: Predrag Jovanović, diplomirani hemičar

Naziv teme: „Pirolidinski derivati u organokatalitičkim transformacijama“

Na sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 19. januara 2017. godine, izabrani smo u Komisiju za ocenu doktorske disertacije Predraga Jovanovića, diplomiranog hemičara, asistenta na Katedri za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, prijavljene pod naslovom:

„Pirolidinski derivati u organokatalitičkim transformacijama“

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

1. Osnovni podaci o kandidatu i disertaciji

Predrag Jovanović je rođen 1985. godine u Užicu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2004. godine. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.87, nakon čega je upisao doktorske akademske studije. Od 2010. do danas zaposlen je kao asistent na Katedri za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Doktorska disertacija **Predraga Jovanovića**, pod naslovom „**Pirolidinski derivati u organokatalitičkim transformacijama**“, napisana je na 202 strane i sadrži 53 sheme, 46 slike, 33 tabela i 201 literaturni navod. Teza sadrži sledeća poglavlja: 1. *Opšti deo*, 2. *Naši radovi*, 3. *Eksperimentalni deo*, 4. *Zaključak*, 5. *Literatura*, 6. *Biografija*. Pored navedenog, disertacija sadrži *Sadržaj*, *Listu skraćenica*, *Rezime*, *Rezime na engleskom jeziku* i *Zahvalnicu*.

2. Predmet i cilj disertacije

Cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj novih klasa organokatalizatora na bazi polisupstituisanih pirolidina i njihova primena u asimetričnim sintezama. Poznato je da prolinski derivati predstavljaju efikasne organokatalizatore, ali i da je uticaj dodatnih supstituenata na njihove osobine veoma malo proučavan. Sinteza polisupstituisanih pirolidina i studija njihovog organokatalitičkog potencijala doprinela bi detaljnijem razumevanju uloge supstituenata u funkcionisanju katalizatora. Ovo bi omogućilo optimizaciju strukture varijacijom supstituenata i prilagođavanje katalizatora tipu reakcije/reaktanata. Izučavanje uticaja supstituenata otvara mogućnosti racionalnog dizajna novih katalitičkih molekula, što ima konstantan značaj u oblasti asimetričnih transformacija.

3. Osnovne hipoteze

Derivati pirolidina a posebno prolina našli su široku primenu u organokatalitičkim reakcijama. Međutim, najveći broj ovih jedinjenja predstavlja strukture dobijene modifikacijom karboksilne grupe prolina, a broj radova koji se bave proučavanjem efekta dodatnih supstituenata na pirolidinskom skeletu je gotovo zanemarljiv. Istraživanje u sklopu ovog doktorskog rada krenulo je od pretpostavke da dodatni supstituenti mogu uticati na katalitički profil derivata. Njihov doprinos bi mogao da se manifestuje direktnim interakcijama sa reagujućim molekulima ili ukupnim efektom na stereohemijske karakteristike katalizatora. Strukturnom i pozicionom varijacijom supstituenata potencijalno bi se moglo manipulirati aktivnošću katalizatora, odnosno modifikovati ga i prilagoditi specifičnom tipu reakcija.

4. Kratak opis sadržaja disertacije.

U *Opštem delu*, na osnovu pregleda literature, opisane su glavne klase prolinskih katalizatora koje se koriste u organokatalizi, kao i najčešći mehanizmi aktivacije. Prikazani su i odabrani primeri organokatalitičkih transformacija koje su bile predmet proučavanja ove doktorske disertacije. Navedeni su i neki od mnogobrojnih primera primene organokatalize u sintezi prirodnih proizvoda.

U *Našim radovima* kandidat opisuje rezultate svojih istraživanja u nekoliko celina. U prvom delu prikazana je sinteza višesupstituisanih pirolidina, kao i njihova primena u reakcijama Michael-ove adicije aldehida i ketona na vinil-sulfon. Nakon toga je detaljno proučen uticaj supstituenata polisupstituisanih pirolidina na stereoselektivnost. U drugom delu ove teze proučavane su i biokatalitičke reakcije katalizovane enzimima koji sadrže prolin u aktivnom centru. Razvijen je efikasan biokatalizator za asimetričnu Michael-ovu adiciju acetaldehida na β -nitrostirene na bazi celih rekombinantnih ćelija *Escherichia coli* BL21(DE3) koja eksprimira 4-oksalokrotonat tautomerazu (4-OT). Dodatno, *E. coli* BL21(DE3) je upotrebljena kao biokatalizator za selektivnu biokatalitičku redukciju konjugovnih nitroalkena, što predstavlja novu primenu ovog soja, pri čemu je postignuta visoko hemoselektivna redukcija. U poslednjoj celini *Naših radova* prikazani su rezultati sa novim tioureidnim katalizatorima dizajniranim na osnovu mehanizma katalitičkog ciklusa. Najpre su sintetisani derivati tiouree sa višesupstituisanim pirolidinima, koji su korišćeni u reakciji Michael-ove adicije aldehida i vinil-sulfona. Rezultati su pokazali da stereoselektivnost zavisi od supstituenata u položajima 2 i 5 pirolidinskog prstena. Nakon višesupstituisanih sintetisani su i derivati tiouree sa monosupstituisanim pirolidinima, koji su se izdvojili kao najefikasniji katalizatori. Njihovom upotrebom u Michael-ovoj adiciji i aminaciji aldehida pomoću dietil-azodikarboksilata postignuta je visoka enantioselektivnost. Takođe su proučavane i strukturne karakteristike katalizatora, koje bi mogle doprineti preciznijem objašnjenju njegove uloge u pomenutim transformacijama.

U *Eksperimentnom delu* kandidat daje detaljan opis eksperimentalnih procedura kojima su sintetisana nova jedinjenja. Navedene su i fizičko hemijske osobine kao i strukturne karakteristike jedinjenja dobijene primenom savremenih instrumentalnih tehnika (NMR, IC,

MS). Enantiomerni višak optički aktivnih jedinjenja određivan je korišćenjem hiralne HPLC tehnike i poređenjem vrednosti izmerene optičke rotacije sa poznatim literaturnim vrednostima.

U *Zaključku* su sumirani rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije.

Literatura sadrži 201 literaturni citat i obuhvata radove koji su relevantni za problematiku istraživanja kandidata.

5. Ostvareni rezultati i naučni doprinos disertacije

Naučno istraživački rezultati kandidata doprineneli su daljem razumevanju organokatalitičkih procesa katalizovanih jedinjenjima na bazi polisupstituisanih pirolidina. Takođe, ova istraživanja dovela su do racionalnog dizajna novog efikasnog katalizatora zasnovanog na mehanizmu katalize pomoću tioureidnih jedinjenja. Doprinos je dat i u oblasti biokatalize gde je postignuta visoka stereoselektivnost (>99%) u reakciji Michael-ove adicije, kao i visoka hemo-selektivnost pri redukciji konjugovanih nitroalkena upotrebom celih ćelija *Escherichia coli* BL21(DE3).

Višesupstituisani pirolidini u organokatalizi

a) Razvijena je efikasna sinteza ovih jedinjenja, preko visoko stereoselektivne cikloadicione reakcije azometinskih ilida, koja je omogućila varijacije grupa u različitim položajima pirolidinskog prstena. Sintetisano je sedamnaest različitih katalizatora što je omogućilo detaljnije proučavanje efekata supstituenata na različite reakcione parametre, a posebno na stereoselektivnost.

b) Ovi derivati su testirani u organokatalitičkim transformacijama koje zahtevaju sekundarne amine kao što je Michael-ova reakcija aldehida i vinilsulfona. Optimizacijom reakcionih uslova ostvareni su odlični, a u nekim slučajevima gotovo kvantitativni prinosi.

c) Utvrđeno je da uvođenjem sterno većih supstituenata umesto fenil grupe u položaju (C5) dolazi do snižavanje stereoselektivnosti, isti efekat su imali i supstituenti koji imaju dodatnu mogućnost građenja vodoničnih veza. Uvođenjem alifatičnog supstituenta u (C5) dovelo je do

promene konfiguracije proizvoda iz *R* u *S*. Dalje je promenom grupe na C(2) prolina istražen uticaj ovog supstituenta na stereoselektivnost, pri čemu je zaključeno da se uvođenjem sterno zahtevnijih estara ili amida dobija bolja enantioselektivnost (do 52%).

d) Najaktivniji od tako sintetisanih katalizatora iskorišćen je za Michael-ove reakcije sa nizom različitih aldehida. Većina aldehida dala je proizvode u odličnim prinosima (do 99%), ali uz slabu enantioselektivnost (do 28%). Ista reakcija je urađena i sa nekoliko ketona uz niže prinose (do 56%) u odnosu na aldehide, ali uz neznatno bolju stereoselektivnost (do 44%) osim u slučaju cikloheksanona. Pored klasične Michael-ove reakcije aldehida i vinil-sulfona, kao elektrofil korišćen je i dietil azodikarboksilat. Proizvodi su dobijeni u odličnim prinosima (do 99%), i enantioselektivnošću (do 32%).

e) U cilju proširenja primene sintetisanih derivata pirolidina, ustanovljena je mogućnost njihove upotrebe u fotoredoks organokatalizi, u reakciji alkilovanja heptanala sa dietil-2-brommalonom, pri čemu je dobijen proizvod u prinosu od 84%, ali u obliku racemata. Ova studija pokazuje da supstituisani derivati prolina imaju potencijal da se koriste kao organokatalizatori, ali je potrebno dodatno istraživanje da bi se optimizovale njihove katalitičke osobine posebno u smislu enantioselektivnosti.

Prolin u biokatalizi

a) Proučavane su i biokatalitičke reakcije katalizovane enzimima koji sadrže prolin u aktivnom centru. Razvijen je efikasan postupak za biokatalitičku asimetričnu Michael-ovu adiciju acetaldehida na različite β -nitrostirene, na bazi celih ćelija *Escherichia coli* BL21(DE3) koja eksprimira 4-oksaloakrotonat tautomerazu (4-OT).

b) Nakon serije različitih eksperimenata pronađeni su optimalni uslovi reakcije. Pomoću ovog visokoaktivnog biokatalizatora postiže se odlična enantioselektivnost, što se može ilustrovati kroz podatak da je 4-nitro-3-fenil butanal dobijen u optički čistom obliku (e.e. >99%), uz prinos reakcije do 60%.

c) Da bi se ispitala upotreba razvijenog biokatalizatora na drugim supstratima, umesto nitrostirena korišćeni su njegovi halogenovani derivati, odnosno *p*-hlor- β -nitrostiren, *o*-hlor- β -nitrostiren, *p*-fluor- β -nitrostiren sa acetaldehidom. Prinosi ovih reakcija su slabiji u odnosu na

nitrostiren, s tim da *o*-hlor- β -nitrostiren daje bolji prinos (51%) od *para*-supstituisanih derivata (31% i 38%). Veoma visoka stereoselektivnost reakcije postignuta je u svim primerima, a od halogenovanih derivata najbolja selektivnost postignuta je sa *p*-fluor-nitrostirenom kao supstratom (e.e. 94%). *Orto* i *para* hlor derivati su dali nešto slabiju e.e. (88% i 84%). Ovi rezultati se mogu objasniti sternim faktorima, naime fluor je po veličini sličan vodoniku pa se lakše uklapa u enzimsko mesto što za posledicu ima približno istu enantioselektivnost. Hlor zbog svoje veličine verovatno dovodi do određenih deformacija veza u katalitičkom mestu što se odražava smanjenjem selektivnosti.

d) Pokazano je da ovaj bioproces može biti efikasna alternativa za danas poznate sinteze ovih jedinjenja, koja se mogu dalje transformisati u odgovarajuće aminoalkohole.

e) Glavni nedostatak biotransformacije je inhibitorski efekat većih početnih koncentracija nitrostirena na biokatalizator. Ovaj problem je prevaziđen primenom metode postupnog dodavanja supstrata. Ovom jednostavnom izmenom u eksperimentalnoj proceduri značajno je povećan obim biotransformacije (poboljšanje do 12 puta u odnosu na slobodan enzim koji je ranije korišćen).

f) U cilju proučavanja katalitičke aktivnosti 4-oksalokrotonat tautomeraze primenom principa mutagenese sintetisana su dva nova mutanta. Prvi koji ima dodatni N-terminalni prolin (4-OT_P), i drugi u kome su zamenjene dve aminokiseline sa prolinom, (4-OT_2P), a zatim je proverena njihova aktivnost. Iz urađenih eksperimenata je zaključeno da je efikasnost 4-OT_P mutanta slična kao kod 4-OT, dok se kod 4-OT_2P zapaža značajan gubitak aktivnosti, usled destabilizacije čitavog proteina.

g) *E. coli* BL21(DE3) soj koji se generalno koristi za rekombinantnu ekspresiju proteina, je upotrebljen kao biokatalizator za selektivnu biokatalitičku redukciju konjugovanih nitroalkena, što predstavlja novu primenu ovog soja. Postignuta je visoko hemoselektivna redukcija konjugovanih dienskih supstrata, pri čemu dolazi do redukcije samo jedne dvostruke veze i nastaje isključivo nekonjugovani proizvod. Redukovano je devet različitih supstrata u umereno dobrim prinosima (30-56%) ali uz nisku enantioselektivnost (3-29%). Utvrđeno je da elektronske osobine prstena koje utiču na polarnost dvostruke veze nemaju odlučujući uticaj na redukciju, ali je prisustvo nitro grupe od suštinskog značaja za ovu biotransformaciju.

Organokatalitička aktivnost derivata tiouree i višesupstituisanih pirolidina

a) Dizajniran je novi tip tioureidnog organokatalizatora koji sadrži 3,5-bis(trifluorometil)fenil grupu koja učestvuje u dodatnom građenju vodoničnih veza umesto tipične N-H veze tiouree, što ranije nije bilo poznato u literaturi. Strukturnom varijacijom heterocikličnog prstena pirolidina dobijeno je šesnaest različitih tioureidnih organokatalizatora, koji su dalje proučavani.

b) Inicijalno su sintetisani i proučavani derivati tiouree i višesupstituisanih pirolidina, koji su korišćeni u reakciji Michael-ove adicije aldehida i sulfona. Nakon optimizacije uslova, zaključeno je da se najbolji prinosi dobijaju u vlažnom metilen-hloridu, na sobnoj temperaturi, uz upotrebu benzoeve kiseline kao aditiva, pri čemu je pokazano da su voda i aditiv od suštinske važnosti za efikasnost reakcije.

c) Radi proučavanja uticaja supstituenata na stereoselektivnost Michael-ove reakcije, sintetisano je dvanaest različitih katalizatora sa kojima nije postignuta sintetski značajna enantioselektivnost (12-64%), uz prinose koji su bili u rasponu od 27-99%. Najbolja selektivnost je postignuta sa katalizatorima koji imaju sterno veću grupu u (C2) položaju pirolidinskog prstena. Rezultati su pokazali da stereoselektivnost veoma zavisi od supstitucije.

Organokatalitička aktivnost derivata tiouree i monosupstituisanih pirolidina

a) Nakon donetih zaključaka kako supstituenti utiču na stereoselektivnost pristupljeno je sintezi nova četiri derivata tiouree sa monosupstituisanim pirolidinima, od kojih se katalizator (*S*)-N-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-(difenil(trimetilsilil)oksi)metilpirolidin-1-karbotioamid izdvojio kao najefikasniji. U reakcijama Michael-ove adicije različitih aldehida na vinil-sulfon katalizovanih ovim derivatom tiouree dobijena je dobra enantioselektivnost u rasponu od 78-87%, uz odlične prinose koji su uglavnom bili od 92-99%.

b) Dalje istraživanje ovog katalizatora je nastavljeno njegovom primenom u reakciji aminacije aldehida pomoću dietil-azodikarboksilata (DEAD) kao izvora azota, pod identičnim uslovima koji su korišćeni u reakciji sa sulfonima. Svi proizvodi su dobijeni u dobrim ili odličnim prinosima (64-98%) nakon 18 h, dok je postignuta visoka enantioselektivnost od 84-99%.

c) Da bi se razjasnila uloga katalizatora u navedenim reakcijama u kojima je postignut visok nivo stereoselektivnosti, detaljno je proučena njegova struktura. Analizom ^1H , ^{13}C i 2D NMR spektara jedinjenja kao i računskim metodama utvrđeno je da se katalizator nalazi u obliku jednog od moguća četiri rotamera. Takođe, proučavan je i mehanizam ove reakcije, pomoću ^1H NMR-a. Ovi eksperimenti nisu pružili nove informacije koje bi pomogle u razjašnjenju mehanizma i rasvetljavanju niske stereoselektivnosti.

d) Kako u ^1H NMR spektrima nije zapažena nikakva interakcija, pretpostavljeno je da u reakciji učestvuje mala količina enolnog oblika aldehida čije je formiranje pospešeno prisustvom vode i benzojeve kiseline. Iako su neophodne dodatne studije za uspostavljanje punog potencijala katalizatora i njegove šire primene, prikazani rezultati ukazuju na alternativne pravce za dalje istraživanje tioureidnih organokatalizatora.

6. Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije

Članak u knjizi

- 1) Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 3, John Whittall, Peter W. Sutton, Wolfgang Kroutil **Wiley 2016**. Poglavlje 4.4. Strana 91-96. Michael-Type Addition of Aldehydes to β -Nitrostyrenes by Whole Cells of *Escherichia coli* Expressing 4-Oxalocrotonate Tautomerase (4-OT). T. Narančić, G. Minovska, **P. Jovanović**, J. Radivojević, J. Nikodinović-Runić.

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21)

- 1) T. Narančić, J. Radivojević, **P. Jovanović**, Dj. Francuski, M. Bigović, V. Maslak, V. Savić, B. Vasiljević, K. E. O'Connor, J. Nikodinović-Runić, Highly efficient Michael-type addition of acetaldehyde to β -nitrostyrenes by whole resting cells of *Escherichia coli* expressing 4-oxalocrotonate tautomerase, *Bioresource Technology* **2013**, 142, 462-468. *Biotechnology & Applied Microbiology* (19/165), **IF₂₀₁₃=5,600**
- 2) **P. Jovanović**, M. Petković, M. Simić, B. Ivković, V. Savić, A novel thiourea type organocatalyst possessing a single NH functionality, *Org. Biomol. Chem*, **2016**, 14, 6712. *Organic Chemistry* (14/59), **IF₂₀₁₅=3,559**

Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M22)

- 1) **P. Jovanović**, S. Jeremić, L. Djokić, V. Savić, J. Radivojević, V. Maslak, B. Ivković, B. Vasiljević, J. Nikodinović-Runić, Chemoselective biocatalytic reduction of conjugated nitroalkenes: New application for an *Escherichia coli* BL21(DE3) expression strain, *Enzyme and Microbial Technology* **2014**, 60, 16-23.
Biotechnology & Applied Microbiology (52/163), **IF₂₀₁₄=2,932**
- 2) **P. Jovanović**, M. Petković, B. Ivković, V. Savić, Pyrrolidine derived thioureas as organocatalysts in the Michael reaction of vinyl sulfone. Structure–stereoselectivity study, *Tetrahedron Asymmetry*, **2016**, 27, 990.
Organic Chemistry (30/59), **IF₂₀₁₅=2,108**

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M23)

- 1) **P. Jovanović**, J. Randjelović, B. Ivković, C. Suteu, Z. Tokić Vujošević, V. Savić, Substituted proline derivatives as organocatalysts in the Michael reaction, *J. Serb. Chem. Soc.* **2014**, 79, 767-778.
Multidisciplinary Chemistry (105/157), **IF₂₀₁₄=1,009**

Saopštenja

- 1) Polisupstituisani derivati pirolidina u organokatalizi, **P. Jovanović**, B. Ivković, V. Savić, C. Suteu, V. Tešević, Z. Tokić Vujošević, 50. *Savetovanje Srpskog hemijskog društva*, Beograd 14-15.6.2012. Zbornik radova, strana 167.

7. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije)

Na osnovu detaljnog pregleda doktorske teze **Predraga Jovanovića** pod naslovom „**Pirolidinski derivati u organokatalitičkim transformacijama**“, komisija je zaključila da je kandidat sistematičnim i detaljnim proučavanjem pirolidinskih derivata u katalitičkim reakcijama dao značajan doprinos daljem razvoju ove oblasti. Najvažniji rezultati ovog rada ogledaju se u razvoju nove klase organokatalizatora sa kojim je postignuta visoka stereoselektivnost, kao i u proučavanju analognih biokatalitičkih procesa. Disertacija je urađena prema odobroj prijavi, i predstavlja originalno i samostalno naučno delo.

U toku izrade doktorske teze kandidat je objavio dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima, jedan rad u međunarodnom časopisu i jedno saopštenje na skupu od nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem. Jedan od radova objavljen je kao članak u knjizi.

Na osnovu svega izloženog, komisija smatra da su ispunjeni svi uslovi da se rad **Predraga Jovanovića** pod naslovom „**Pirolidinski derivati u organokatalitičkim transformacijama**“, prihvati kao doktorska teza, čime se stiču uslovi za sticanje akademskog stepena i zvanja doktora hemijskih nauka. Na osnovu toga, predlažemo Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta da kandidatu **Predragu Jovanoviću** odobri odbranu doktorske teze pod navedenim naslovom.

U Beogradu,

06. 02. 2017. godine

Komisija:

Dr Veselin Maslak, vanredni profesor, predsednik
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

Dr Zorana Ferjančić, vanredni profesor, član
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu,

Dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik, član
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu