

Válasz

Dr. Fogassy Elemér a MTA kémiai tudományok doktora opponensi véleményére

Köszönöm Opponensemnek az értekezés alapos áttanulmányozását, megjegyzéseit és kérdéseit. Örömmel tölt el pozitív értékelése a munkák megtervezését, kivitelezését illetően. Opponensem megjegyzéseire, kérdéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. Egyetértek Opponensem valamennyi elírásra tett észrevételével, kiegészítve azzal, hogy az 53. old. 19. táblázat 2. sorában szereplő 1,4-dioxán nem elírás, a félreérthetőség a táblázat megadásának elmulasztása miatt történt, ugyanis a $i\text{Pr}_2\text{O}$ -re utaló 2. sor az 52. old. 18. táblázatra vonatkozik.

2. Opponensem azon kérdésére, hogy mivel magyarázható, ha a királis C atomhoz arilalkil csoport kapcsolódik (61. old) más konfigurációjú aminosavészter hidrolizál mint akkor, ha az aromás vagy heteroaromás gyűrű közvetlenül kapcsolódik hozzá, válaszom, hogy az enzim, ez esetben *Burkholderia cepacia* PS-IM lipáz enantiopreferenciája minden esetben ugyanaz, a látszólagos, különböző abszolút konfigurációk sugallta ellentmondás a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek prioritási sorrendjének változásában rejlik. Hasonló megállapítást tettünk különböző *N*-hidroxi-metilezett β -laktámok PS lipáz-katalizált aszimmetrikus acilezésének enantioszelektivitási irányára vonatkoztatva (*Értekezés*, 33. old. 4.2.7. Diszkusszió).

3. A 64. old. 29. táblázatában szereplő additív vegyületek között szereplő víz vizsgálati eredményei az összehasonlítás kedvéért kerültek a táblázatba, ugyanis a modell aminoészter [(±)-97 (**m**)] hidrolízisére végzett, reakcióelegyhez adalékként adott víz vizsgálatával már a korábbiakban találkoztunk. Igazoltuk, hogy az enzim felületén lévő víz nukleofilként vesz részt a reakcióban (elégésesnek bizonyult a teljes reakció lefutásához). Ugyanakkor, az adalékként reakcióelegyhez adott víz mennyiségének 0-ról 5 ekvivalens mennyiségre történő növelésével a reakció sebessége csökkent (*Értekezés*, 63. old. 27. táblázat, 1-3. sorok). Az általunk is kipróbált Et_3N a PS lipáz-katalizált átalakításokkor, az enantioszelektivitás és a reakciósebesség növelése céljából a leggyakrabban használt adalék (C.J. Sih, G. Girdaukas, C.-S. Chen, J.C. Sih: *Enzymatic resolutions of alcohols, esters, and nitrogen-containing compounds*, in: A.M.P. Koskinen; A.M. Klibanov: *Enzymatic reactions*

in organic media, Chapman & Hall, Glasgow, 1996, pp. 118-121). A szintén kipróbálásra került másik szerves amin, a $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ jótékony hatást mutatott különböző ketoximok Pd/C és CAL-B katalizátorok együttes használatával, optikailag aktív aminok előállítására végzett, *un. combo* reakciók esetében (Y.K. Choi; M.J. Kim; Y. Ahn; M.-J. Kim, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4099-4101). A 2-oktanol reakcióelegyhez történő hozzáadásával vizsgáltuk a keletkező aminosav esetleges észteresítési lehetőségét (*pl.* a flurbiprofen 1-oktanollal történő szerves közegű észteresítése az irodalomból ismert; P. Spizzo; A. Basso; C. Ebert; L. Gardossi; V. Ferrario; D. Romano; F. Molinari; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11005-11010). A kapott eredmények (konverzió és aminosav enantiomerfeleslege), azonban nem utaltak észteresítési reakcióra.

4. Opponensem azon kérdésére, hogy az alkalmazottaktól lényegesen nagyobb molekula méretű racém vegyületek enzimés rezolválására milyen lehetőséget látok, jöllehet, elegánsabb lenne azt válaszolnom, hogy *pl.* molekulamodellezés és molekula mechanikai számítások segítségével teljes pontossággal előrevetíthető az adott szubsztrát rezolválására megfelelő enzim, de én a megoldást a kísérleti munkával járó próbálkozásokban látom. Számos, reakciókban leggyakrabban használt enzim esetében a háromdimenziós szerkezetüket meghatározták, sokak esetében ez viszont még nem ismert. Az enzimek aktivitásának, szelektivitásának egyik feltétele a szubsztrát-enzim közötti szterikus kölcsönhatások létrejötte. Ennek azonban, elsősorban a szubsztrát mérete szab határt, azaz ha a szubsztrát dimenziói nem biztosítják az enzim aktív centrumához való hozzáférést, *ill.* a különböző méretű felismerő helyekre történő illeszkedést, akkor nem jöhet létre enzim-katalizált átalakulás. Munkánk során viszont tapasztaltuk, hogy az enzim aktív centrumának konformációja a hőmérséklet függvényében változhat (*Értekezés*, 38. old. 9. táblázat), így egy ismert, szobahőmérsékleten meghatározott háromdimenziós szerkezettel rendelkező enzim és adott szubsztrát esetében végzett modellezési számítások eredményezte “*nem jöhet létre reakció*” típusú predikció ellenére, nem tartom kizártnak a rezolválás lehetőségét (például, magasabb hőmérsékleten végezve az adott enzimés reakciót).

5. Opponensem kérdezi, hogy reaktív funkciós csoportot nem tartalmazó racém vegyületek enzimés rezolválására milyen megoldást látok. Kétségtelen, hogy az enzim-katalizált reakciók leggyakrabban reaktív funkciós csoportot tartalmazó vegyületek esetén sikeresek. Reaktív funkciós csoportot nem tartalmazó racém vegyületek enzimés rezolválására legkézenfekvőbbnek tartom, egy tervezett enzimés reakció (enzim-katalizált kinetikus vagy dinamikus kinetikus rezolválás) elvégzésére alkalmas funkciós csoport

kiépítését, mint ahogy ezt mi is tettük a β -laktámok enzimés rezolválása céljából (*N*-hidroximetilezett, ill. *N*-acetoxi-metilezett β -laktámokat állítottunk elő) (*Értekezés*, 22-28. oldalak, 4.2.1. – 4.2.3. fejezetek), amikor még a laktámgyűrű enzimés nyitását nem ismertük fel. Ugyan nem rezolválási technika, de egy prokirális molekula kialakítását, majd enzimkatalizált szelektív átalakítását (*pl.* aldehidek, ketonok redukciója, K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, 3rd Edition, Berlin, Germany, 1997, pp. 166-187; aldehidek, ketonok cianohidrinekké történő sztereoszelektív alakításuk, F. Effenberger, *Hydroxynitrile lyases in stereoselective synthesis*, in *Stereoselective biocatalysis*, (Ed. R.N. Patel) Marcel Dekker Inc., New York - Basel 2000, pp. 321-343; deszimmetrizálás, R. Chenevert; P. Morin; N. Peichat, *Transesterification and hydrolysis of carboxylic acid derivatives, alcohols, and epoxides*, in: V. Gotor; I. Alfonso; E. García-Urdiales: *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, pp. 133-137; hidroxilálási reakciók (H.L. Holland, *Stereoselective hydroxylation reactions*, in *Stereoselective biocatalysis*, (Ed. R.N. Patel) Marcel Dekker Inc., New York - Basel 2000, pp. 87-153) is elképzelhetőnek tartom. A gyűrűnyílásra hajlamos molekulákat (epoxid, lakton, laktám) reaktív funkciós csoportot tartalmazó racémátoknak tekintem.

Gyakran, minden bizonnyal célszerű a diasztereomer-sópároképzésen alapuló rezolválások alkalmazása.

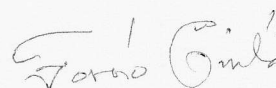
6. Opponensem az egynél több enzim együttes használatának lehetőségeiről kérdez, például észter hidrolízis, gyűrűnyitás vagy más reakciók esetében. Munkáink során, mi izolált, egy enzimmel végeztük a reakciókat. A több enzim együttes használatára azonban található példa az irodalomban. A két-enzimes rendszer (ide sorolom a teljes-sejtes, több enzimet tartalmazó rendszereket is) résztvevő enzimjei katalizálhatják *pl.* ugyanazon szubsztrátnak más-más termék enantiomert eredményező átalakítását (P. D'Arrigo; G. Pedrocchi-Fantoni; S. Servi, *Stereoselective synthesis of chiral compounds using whole-cell biocatalysts*, in *Stereoselective biocatalysis*, (Ed. R.N. Patel) Marcel Dekker Inc., New York - Basel 2000, pp. 365-396), ugyanakkor az is elképzelhető, hogy egyik enzim a másikhoz képest fordított szelektivitással ugyanazt az átalakulást katalizálja (időben fogy a kiindulási racémát mindkét enantiomerje és a reakció végén a termék racém lesz) (F. Ledl; E. Schleicher; *Angew. Chem.* **1990**, *29*, 565-594). Szekvenciális reakciókat is katalizálhatnak, *pl.* az egyik enzim (nitril hidratáz), az első reakciólépést (az amidot eredményező lépés) katalizálja, majd a másik enzim (*pl.* amidáz) az első reakciólépés eredményezte terméket alakítja tovább (képződik a karbonsav) (R. Chenevert; P. Morin; N. Peichat,

Transesterification and hydrolysis of carboxylic acid derivatives, alcohols, and epoxides, in: V. Gotor; I. Alfonso; E. García-Urdiales: *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. pp. 144-146), vagy például α,β -telítetlen észterek sütő-élesztő katalizált átalakításának első lépésében egy hidroláz enzim, második lépésében egy enoát reduktáz aktiválódik (P. Ferraboschi; P. Grisenti; R. Casati). Kaszkád reakciók esetében írták le multi-enzim (multienzyme cocktail) (akár hatnál több résztvevő enzim) rendszerek használatát (Y. Ichikawa; J.-L.C. Liu; G.J. Shen; C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4698-4700). Ilyen például a nyolc enzim-katalizált *un. precorrin* szintézise (A.I. Scott, *Synlett* **1994**, 871-883). Ezekben az esetekben minden enzim más-más reakciólépést katalizált.

Opponensem azon kérdésére, hogy az enzimek keverékei javíthatják-e az egyedi enzimekkel elérhető eredményeket, válaszom összetett. Van az irodalomban általános utalás arra, hogy mikrobiális teljes-sejt rendszer (több enzim) használata esetében, jöllehet a reakció kontrollja komplexebb, néha azonban az enantioszelektivitás jelentősen nagyobb az izolált enzimek használatával szemben (K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, 3rd Edition, Berlin, Germany, 1997, pp. 73). Ugyanakkor, enzimek ugyanazon szintetikus reakcióban történő felhasználásuk során, enzim enzimre történő szinergizáló hatásának megfogalmazásával az irodalomban ez idáig nem találkoztam. Ha egy két-enzim-katalizált szekvenciális kinetikus rezolválásra gondolok, amelynek jöllehet mindkét lépését katalizálja az "egyik" enzim (akárcsak. az általunk, Taxol kulcs-intermedier szintézisére leírt új szekvenciális rezolválás esetében (*Értekezés*, 68. old. 4.3.3. fejezet), elképzelhetőnek tartom, hogy a két reakció valamelyikét a "másik" enzim nagyobb enantioszelektivitással és/vagy reakciósebességgel katalizálja, így a folyamat egészét szemlélve, rövidebb reakció idő mellett nagyobb enantiomerfelesleggel keletkezhetnek a termékek.

Még egyszer köszönöm Opponensem alapos, sokoldalú bírálatát, dicsérő szavait.

Szeged, 2011. május 20.



(Forró Enikő)