MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ÚJ ENZIMES STRATÉGIÁK LAKTÁM ÉS AMINOSAV ENANTIOMEREK SZINTÉZISÉRE

FORRÓ ENIKŐ

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM GYÓGYSZERKÉMIAI INTÉZET

SZEGED, 2010.

Tartalomjegyzék

1. Be	vezetés	és célkitűzések	1
2. Iro	odalmi e	előzmények, biokatalizátorok a szerves kémiában	4
	2.1.	Enantiomerek előállítása enzimekkel, kinetikus rezolválás, szekvenciális kinetikus rezolválás és dinamikus kinetikus rezolválás	5
	2.2. 2.3.	Lipáz-katalizált O-acilezés és észter hidrolízis; szerin hidroláz mechanizmus Lipázok szerves oldószerekben	6 9
3. An	yagok é	és módszerek	11
	3.1.	Racém kiindulási laktámok és aminoészterek szintézise	11
	3.2. 3.3.	Az enantiomerfelesleg, a konverzió és az enantioszelektivitás meghatározása Enzimek, reagensek, enzimes reakciók kivitelezése, optimalizálás, preparatív- mennyiségű rezolválások	12 14
	3.4.	Az enantiomerek jellemzése	16
4. Er	edmény	rek és diszkusszió	17
	4.1.	Előzmények: a β - és γ laktámok, valamint β - és γ aminosavak kémiai és farmakológiai jelentősége és enzimes előállítása	17
	4.2.	Indirekt enzimes módszerek	22
	4. 4.	2.1. N-Hidroxi-metilezett karbociklusos β -laktámok enantioszelektív acilezése 2.2. N-Hidroxi-metilezett 4-aril-szubsztituált β -laktámok enantioszelektív	22 26
	4.	2.3. N-Acetoxi-metilezett 4-aril-szubsztituált β -laktámok enantioszelektív hidrolízise	27
	4.	2.4. A <i>cisz</i> -3-acetoxi-4-fenilazetidin-2-on enantioszelektív hidrolízise	29
	4.	2.5. Gramm-mennyiségű rezolválások	30
	4. 4	2.6. Lovabbalakitasok 2.7. Diszkusszió	31
	43	Direkt enzimes módszerek	35
	1.5.	3.1. Laktámok enantioszelektív gyűrűnyjása	35
	4.	4.3.1.1. Nem aktivált β -laktámok enantioszelektiv gyűrűnyitása alkohol nukleofilekkel szerves közegben	35
		4.3.1.2. Nem aktivált karbociklusos β -laktámok gyűrűnyitása vízzel szerves közegben	40
		4.3.1.3. Nem aktivált karbociklusos β -laktámok gyűrűnyitása oldószer nélkül	45
		4.3.1.4. Nem aktivált karbociklusos <i>transz β</i> -laktámok gyűrűnyitása vízzel szerves közegben	48
		4.3.1.5. A 4-aril- és 4-arilalkil-szubsztituált β -laktámok gyűrűnyitása vízzel szerves közegben	49
		4.3.1.6. Nitrogénen védett és nem védett γlaktámok enantioszelektiv gyűrűnyitása	51
		4.3.1.7. A <i>cisz</i> -3-hidroxi-4-fenilazetidin-2-on enantioszelektív hidrolízise 4.3.1.8. Gramm-mennyiségű rezolválások	53 54
	4.	3.2. Aminoészterek enantioszelektív hidrolízise	56
		4.3.2.1. Karbociklusos <i>cisz</i> és <i>transz</i> β -aminoészterek hidrolízise szerves	56

közegben	
4.3.2.2. A β -aril-, β -arilalkil- és β -heteroaril-szubsztituált β -aminoészterek hidrolízise szerves közegben	60
4.3.2.3. Az etil-(3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionát) enantioszelektív hidrolízise	65
4.3.3. Egy új típusú, két-lépéses enzimes dominó reakció	68
4.3.4. Továbbalakítások4.3.5. Diszkusszió	71 72
4.4. Egy új analitikai módszer kidolgozása az enzimes reakciók követésére	74
5. Összefoglalás	79
6. Az eredmények gyakorlati hasznosítása	85
7.1. Irodalomjegyzék I (Ia: az értekezés alapját képező közleményeim, Ib: egyéb saját közleményeim)	86
7.2. Irodalomjegyzék II	89
Köszönetnyilvánítás	97

Rövidítések és jelölések

Ac	acetil
AK lipáz	Pseudomonas fluorescens
Ala	alanin
Asp	aszparaginsav
AY lipáz	Candida rugosa
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl, <i>t</i> -BuOC(O)-
CAL-A (Chirazyme L-5)	Candida antarctica A lipáz
CAL-B (Novozym 435,	Candida antarctica B lipáz
Chirazyme L-2, Lipolase)	
CAN	cerium (IV) ammonium nitrát
C(O)Ph	benzoil
DMAP	4-dimetil-amino-piridin
DD	dupla derivatizálás
DKR	dinamikus kinetikus rezolválás
С	koncentráció
Ε	enantioszelektivitás
Ee	enanatiomerfelesleg
ENZA 1	Rhodococcus equi NCIMB 40213
ENZA 20	Psedomonas solanacearum NCIMB 40249
GC	gázkromatográf
Glu	glutaminsav
His	hisztidin
IA	izopropenil-acetát
Konv.	konverzió
KR	kinetikus rezolválás
Lys	lizin
L-Val	CP-Chirasil L-Val királis oszlop (25 m)
М	mólos
PLE	sertés máj észteráz
PPL	sertés hasnyálmirigyből izolált lipáz
Pr	propil
PS lipáz	Pseudomonas cepacia, 1995-től Burkholderia cepacia
PS-IM lipáz	immobilizált Burkholderia cepacia
PS-SD lipáz	immobilizált Burkholderia cepacia
(R)	rectus, abszolút konfigurációt jelöl (CIP konvenció)
(S)	sinister, abszolút konfigurációt jelöl (CIP konvenció)
Ser	szerin
Т	hőmérséklet
term.	termelés
THF	tetrahidrofurán

TI^1 , TI^2	tetrahedrális intermedier
VA	vinil-acetát
VB	vinil-butirát
Vpiv	vinil-pivalát
Vpr	vinil-propionát
Vs	versus (szemben valamivel)
β-CD	CP-Chirasil-DEX CB oszlop (25 m)
γDEX	GAMMA DEX TM 120 királis oszlop (30 m)

1. Bevezetés és célkitűzések

A királis gyógyszermolekulák esetében a biológiai hatás gyakran egyik sztereoizomerben (enantiomerben) van jelen hangsúlyozottabban (pl. a β -blokkolók köréből a propranolol, atenolol, metoprolol, timolol)⁷⁵, ugyanakkor valamelyik enantiomer nem kívánt hatás hordozója is lehet (pl. a talidomid, etambutol, penicillamin)⁷⁶⁻⁷⁹, ezért a gyógyszerkutatás kezdeti fázisában igen nagy jelentősége van a kívánt hatással rendelkező vegyület (racemát) lehetséges sztereoizomerjeinek (enantiomerjeinek) szintézisére és külön-külön történő vizsgálatára. Enantiomerek egyidejű előállítására kiválóan alkalmazható módszer az utóbbi időben egyre dinamikusabban fejlődő enzim-katalizált kinetikus rezolválás, ugyanakkor egyetlen enantiomer célirányos előállítása (pl. enzim-katalizált kinetikus dinamikus rezolválással) is megvalósítható.

1996 nyarán, CIMO ösztöndíjas doktoranduszként végeztem az első enzimes reakciót a Turkui Egyetem Szerves Kémia Intézetében, ahol tíz hónapon keresztül dolgoztam Liisa T. Kanerva professzor asszony irányiásával, 2-szubsztituált cikloalkanolok lipáz-katalizált aszimmetrikus acilezési területén. Amikor az enzimes munka világának morzsáival, 10 hónapos tanulmányutamról hazatértem ott várt kibontatlanul a ma már öreg készülékként emlegetett, de még működő első gázkromatográfunk és egy enzimes reakciók végzéséhez elengedhetetlenül szükséges rázógép. És ami a legfontosabb, ott vártak Fülöp Ferenc professzor úr előrevetített tervei és megelőlegezett bizalma, a már benne akkor körvonalazódó későbbi munka tervezete. Így kezdődtek el az első enzimes próbálkozások, akkoriban a szerves közegű acilezési reakciók területén. Szerencsémre, némi preparatív kémiai tapasztalattal rendelkeztem, pályakezdőként 1,2,3-oxatiazino- és 1,3,2-oxazafoszforino-tetrahidroizokinolinok szintézisével foglalkoztam 2 éven keresztül, így az egyszerűbb laboratóriumi műveletek nem okoztak különösebb problémát.

Négy éven keresztül vizsgáltam különböző 2-szubsztituált cikloalkanolok lipáz-katalizált rezolválási körülményeit szerves oldószerben. Eredményeinket PhD doktori értekezésemben foglaltam össze és 2000-ben sikeresen védtem meg, "*suma cum laude*" minősítéssel. 2001-ben Magyar Állami Eötvös Ösztöndíjasként hat hónapon keresztül dolgoztam a McGill Egyetem Szerves Kémia Intézetében, Romas J. Kazlauskas professzor enzimes csapatának tagjaként. Ott tartózkodásom egyik jelentős mozzanatának tartom a nem aktivált β -laktámok lipáz-katalizált enantioszelektív gyűrűnyitására tett első próbálkozásainkat és a CAL-B (Novozym 435), laktámok gyűrűnyitása során tanúsított aktivításának és enantioszelektivitásának megmagyarázása céljából végzett számítógépes modellezést.

1

Az enantiomertiszta természetes anyagok szintézisére irányuló törekvéseknek, valamint a korszerű gyógyszerkutatási és gyógyszerbevezetési elveknek (enantiomertiszta farmakonok előállítása) megfelelően, a továbbiakban egyszerű és hatékony új enzim-katalizált kinetikus rezolválási módszerek kifejlesztését terveztük az intézeti fő-profilba is jól illeszkedő enantiomertiszta laktámok és aminosavak szintézisére.

Az egyes munkákon belül jól elkülöníthető lépések követik egymást (1. ábra): a racém szubsztrátok szintézise; az enzimes reakciók követésére alkalmas analitikai módszer kidolgozása; az optimalizálási, fél-mikroméretű enzimes reakciók megtervezése és kivitelezése (enzim, acildonor vagy nukleofil, oldószer, adalék, hőmérséklet, *stb*. enantioszelektivitásra és reakció sebességére gyakorolt hatásának vizsgálata); a preparatív-mennyiségű enzimes rezolválások; a termékek izolálása és jellemzése. Az enzimes előkísérletek során hangsúlyt kívántunk fektetni természetbarát körülmények kidolgozására, pl. a környezetre kevésbé káros "zöld" oldószerek^{80,81} használatával.



1. ábra

Az új enzimes stratégiák segítségével biológiailag aktív vegyületek és gyógyszerek kulcsintermedierjeinek (pl. Anatoxin-*a*, Amipurimycin, Abacavir, Sitagliptin, Taxol) szintézisét terveztük megvalósítani.

Értekezésemben a hagyományos felépítést igyekszem követni. Az *Irodalmi előzményekben* a biokatalizátorokról, szerves kémiai felhasználásukról, enantiomerek lipáz katalízissel történő előállításáról írok. Itt kerül bemutatásra a lipáz-katalizált O-acilezés és észter hidrolízis, valamint a szerin hidroláz mechanizmus. A lipáz aktivitását és enantioszelektivitását befolyásoló szerves közeg használatának előnyeiről szintén szó esik. Az *Anyagok és módszerekben* a racém kiindulási vegyületek szintézise mellett, bemutatásra kerülnek a fél-mikroméretű és gramm-mennyiségű enzimes reakciók követésére alkalmazott analitikai lehetőségek. Az enzimes reakciók és enantiomer termékek legfontosabb jellemzőinek (enantioszelektivitás, enantiomerfelesleg,

konverzió, abszolút konfiguráció, optikai forgatóképesség) meghatározása, ill. számítása szintén bemutatásra kerül. Az Eredmények és diszkusszió fejezetben szelektáltan kerülnek bemutatásra az általunk kifejlesztett hatékony és egyszerű új enzimes stratégiák (direkt és indirekt módszerek), amelyek elsősorban a célmolekulák (enantiomertiszta β - és γ -aminosav származékok és β - és γ laktámok) előállítására fókuszálnak. Jó néhány munka nem került be ebbe a válogatásba, pl. az értékes α -aminosav enantiomerek szintézisére kifejlesztett új, kinetikus dinamikus rezolválási technikáink. Ugyancsak kimaradtak az értekezésemből az enzimes alapanyagokat felhasználó munkák, jóllehet, a gramm-mennyiségű enantiomerek előállítására minden esetben újabb, a méretnöveléshez kapcsolódó optimalizálást végeztünk, különös hangsúllyal az enzim újrafelhasználhatóságára. A β - és γ -laktám, valamint β - és γ -aminosav enantiomerek jelentőségének és kiemelt irodalmi enzimes szintéziseinek bemutatására, ezen fejezet Előzmények alfejezetében kerül sor. A munkák bemutatásánál nem törekedtem az egyes kísérletek részletekbe menő tárgyalására, inkább a fő témák közül, reprezentatív példákat emeltem ki. Két, rövid diszkusszió [4.2.7. és 4.3.5. pontok alatt)] zárja a direkt és indirekt enzimes módszerek bemutatását, a legfontosabb tapasztalatok gyűjteményeként. Az értekezést felépítő eredményeinket tartalmazó közlemények felsorolása az Irodalomjegyzék Ia-ban, szögletes zárójelben, arab számokkal [1-24] történik, a közlemények másolatait Függelékként csatolom. Az egyéb saját enzimes munkáim felsorolása, felső index-el ellátva, 25-33-ig (25-33) az Irodalomjegyzék Ib-ben található, a másolatok szintén megtalálhatók a Függelék részeként. Az enzimes alapanyagokat használó szintetikus közleményeim, 34-51-ig (³⁴⁻⁵³), valamint az egyéb saját munkáim, 52-74-ig (⁵²⁻⁷⁴) felsorolása az Irodalomjegyzék Ib-ben, míg a nem saját munkákat jelölő, felső indexel, 75-252-ig számozott (⁷⁵⁻²⁵²) hivatkozások felsorolása az Irodalomjegyzék II-ben található.

2. Irodalmi előzmények, biokatalizátorok a szerves kémiában

A kiralitás felismerése a kémia területén a Pasteur által ismertetett első diasztereomer sóképzésen alapuló rezolválással⁸² kezdődött. A szőlősav (racém borkősav) kristályos sóinak a szétválogatásával, majd később a borkősav fermentációval történő rezolválásával kapcsolatosan felismerte az enzim-katalizált kinetikus rezolválás és a diasztereomerek elválasztásán alapuló enantiomerek elkülönítésének lehetőségeit. A mai értelemben vett biotechnológia kezdetét a XIX. század második felében Pasteur azon felfedezése jelentette, hogy a szeszes erjedést mikroorganizmusok okozzák. A felfedezést követően ipari méreteket öltött az etanol, a butanol, az aceton, a glicerin, a citromsav és egyéb fermentáción alapuló sör- és szeszgyártás, valamint az ecet- és tejsavgyártás. A második világháború után az antibiotikumok, aminosavak, enzimek, stb. ipari méretekben történő gyártása a biotechnológiai eljárások területén robbanásszerű fejlődéshez vezetett. Az utóbbi húsz évben a biokatalizátorokkal kapcsolatos fenntartások többségét a felhasználásukkal végzett kémiai reakciók sokasága nagymértékben megválaszolta.

A különböző reakciótípusokat katalizáló enzimeket a IUPAC Enzim Bizottság, 1961-ben hat fő csoportba (oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, ligázok és izomerázok)⁸³ sorolta. Az így csoportosított, jelenleg mintegy 3000 enzim közül a szerves kémiában leggyakrabban használt enzimek⁸⁴⁻⁸⁶ a hidrolázok (EC 3.-.-., a biokatalizátorokként felhasznált enzimek 55%-a, valamilyen kötés hasítását katalizálják vízzel) csoportjába tartoznak. A hidrolázok csoportjába tartozó lipázok (EC 3.1.1.3., ~30%)^{87,88} felhasználása a szerves kémiában igen jelentős, ez köszönhető annak, hogy a természetes szubsztrátjaik, a trigliceridek mellett, igen széleskörű, nem természetes és struktúrálisan diverz szubsztrátok átalakításait is katalizálhatják. A viszonylag enyhe körülmények között (20–40 °C, semleges pH), vizben vagy szerves oldószerben, vagy ezek egy- vagy két-fázisú rendszerében, vagy az egyre gyakrabban használt ionos folyadékban⁸⁹⁻⁹¹ vagy szuperkritikus közegben^{32,92,93} működő lipázok akár 10¹⁰–10¹² nagyságrenddel is felgyorsíthatják a katalizálhatják az átalakulást. Ugyancsak fontos, hogy a lipázok jelentős része kereskedelemből beszerezhető, többségük a szerves oldószerekben nagy stabilitást mutató, immobilizált formában is⁹⁴⁻⁹⁶.

2.1. Enantiomerek előállítása enzimekkel

Az enzimeket, a használatuk legnagyobb előnyeként nyilvántartott enantioszelektivitási tulajdonságuknak köszönhetően egyre gyakrabban használják értékes, különösen gyógyszerintermedierek enantiomertiszta formában való előállításánál, így nem meglepő, hogy az enantiomer célvegyületek előállítására fókuszáló munkáinkhoz, az utóbbi időben egyre dinamikusabban fejlődő környezetbarát enzimes eljárások közül a kinetikus rezolválás (KR) [1-24] és ^{25,26,28,30,31-33,97} (*max.* 50%-os termelés) és dinamikus kinetikus rezolválás (DKR)^{27,29,98-101} (*max.* 100%-os termelés) mellett döntöttünk.

Kinetikus rezolválás

Az enzim, enantiodiszkriminatív tulajdonságának következtében képes különböző reakciósebességekkel katalizálni egy racém szubsztrát (**R**+**S**) enantiomereinek átalakításait (2. ábra). Ideális esetben (irreverzibilis reakció) a reakciósebességek aránya: $k_R/k_S \rightarrow \infty$, azaz a "jó" enantiomer gyorsan termékké alakul (**P**), míg az antipód társa el nem reagált enantiomerként (**S**) lesz jelen a reakcióelegyben 50%-os konverzió esetén. A gyakorlatban a reakciósebességek aránya általában nem tart a végtelenhez, számszerű értékkel kifejezhető [enantioszelektivitás (*E*), dimenzió nélküli érték, 3.2. pont alatt]. Ez azt jelenti, hogy 50%-os konverziónál, a **P** és **S** termék enantiomerek mellett jelen vannak az antipód szennyezések is (**R** és **Q**). Következésképpen, szükségszerűvé válik az enantiomerfeleslegek (*ee*) számítása (3.2. pont alatt).



2. ábra

Szekvenciális kinetikus rezolválás

Biokatalizátorok által iniciált dominó vagy más néven szekvenciális rezolválások ismertek az irodalomban, azonban a legtöbb esetben a biotranszformáció kémiai reakcióval társul a szekvenciális átalakulás létrejöttéhez¹⁰²⁻¹⁰⁵. Ha egy szubsztrát enzimes rezolválása során két, egymást követő enzimes reakció játszódik le, ahol az első lépés eredményezte intermedierek egy második enzimes reakcióban is résztvesznek, akkor az átalakulást szekvenciális kinetikus rezolválásnak nevezik (3. ábra). A két, enzimes reakció között általában külső beavatkozás (pl. az első lépés után a reakcióelegy feldolgozása) történik¹⁰⁶. Ha a $k_1 > k_3$ és $k_4 >> k_2$, akkor az

intermedier termék **P** és "**termék enantiomer**" jó enantiomerfeleslegekkel izolálható. Lipázkatalizált reakciók esetében ez csak két, hasonló reaktivitású funkciós csoportot tartalmazó szubsztrátok, pl. diészterek, diolok, diaminok, N,O-diacilezett vegyületek, *stb*. esetében ismert¹⁰⁷⁻¹¹⁰.



3. ábra

Dinamikus kinetikus rezolválás

Célirányos, egyetlen enantiomer előállítására kiválóan alkalmazható módszer a DKR (4. ábra). Előnye a KR módszerével szemben, hogy 100%-os elméleti termelés érhető el. Feltétele a lassan reagáló enantiomer (**S**) gyors racemizációja (lehetőleg a reakcióelegyben történjen), így ideális esetben ($k_3 >> k_1$ és $k_1 > k_2$), kiváló termelés mellett *egyetlen sztereoizomer* (**P**) képződik.



4. ábra

2.2. Lipáz-katalizált O-acilezés és észter hidrolízis, szerin hidroláz mechanizmus

Primer és szekunder OH csoportot tartalmazó vegyületek aszimmetrikus acilezésére, valamint az O-acilezett racém származékaiknak enantioszelektív hidrolízisére leggyakrabban használt lipáz a PS lipáz (a korábbiakban *Pseudomonas cepacia*, jelenleg *Burkholderia cepacia*)^{25,26,111-119}. A 33 kD molekulatömegű, 320 aminosavból álló, bakteriális eredetű triacil-glicerol hidroláz (EC 3.1.1.3) PS lipáz¹²⁰ három-dimenziós térszerkezetét meghatározták a kötőhellyel, a katalitikus triádot alkotó aminosavakkal (Asp²⁶⁴, Ser⁸⁷, His²⁸⁶) együtt^{88,121-123}. Szintén rendelkezésünkre áll számos, az aktív centrumába bekötött primer és szekunder alkohol konformációs analízisének eredménye¹²⁴⁻¹²⁷, így a tetrahedrális intermedier stabilizálását segítő H kötések létrehozására alkalmas aminosav részletek is bizonyosságot nyertek. Az aktív centrum egy "alagút" mélyén

helyezkedik el, a kötőhely flexibilitását két hidrofób (nagy és közepes méretű) és egy részben hidrofil zseb biztosítja^{124,126,128,129}.

A PS lipáz esetében a kedvezményezett (reaktívabb) enantiomer sztereokémiájának prediktálására legelfogadottabb a szubsztituensek relativ méretén alapuló empirikus, *Kazlauskas szabály*^{117,130,131}, amely kimondja, hogy szekunder OH aszimmetrikus acilezése nagy valószínűséggel *R*-szelektivitással megy végbe ha a Cahn-Ingold-Prelog szabály szerinti körüljárásban R_{nagy} -nak prioritása van az R_{kicsi} -vel szemben és a H a sík mögött helyezkedik el (5. ábra).



5. ábra

Ez alól kivételt azok a szubsztrátok képezhetnek, melyekben a királis centrumhoz nagy térkitöltésű szubsztituens kötődik, vagy oxigénen keresztül kapcsolódik valamelyik szubsztituens. Ugyanakkor, Íaz enantioszelektivitás nagy-mértékben függhet nemcsak a szubsztrát sztérikus, de elektronikus tulajdonságaitól is¹³¹.

Primer OH csoporttal rendelkező szubsztrátok (nem kapcsolódik O az aszimmetria centrumhoz) aszimmetrikus acilezése esetén az enantioszelektivitás irányáról és mértékéről biztonságosan nyilatkozni kockázatos, (igen szubsztrát függőek), minden szubsztrátot külön-külön kell vizsgálni. Általában mégis helytálló, hogy az R_{nagy} szubsztituens, a szekunder OH esetével ellentétben, a kötőhely egy "másik" hidrofób zsebébe illeszkedik¹³², így ellentétes, *S*-enantiopreferencia tapasztalható.

Alkoholok, főleg szekunder alkoholok aszimmetrikus acilezésénél, a PS lipáz mellett leggyakrabban használt másik lipáz a CAL-B (*Candida antarctica* B lipáz)^{112-115,118}. A 33 kD molekulatömegű, 317 aminosavból álló, bakteriális eredetű triacil-glicerol hidroláz (EC 3.1.1.3) CAL-B három-dimenziós térszerkezetét szintén felderítették^{133,134}, a katalitikus triádot az Asp¹⁸⁷, a His²²⁴ és a Ser¹⁰⁵ alkotják, a tetrahedrális intermedier stabilizálását pedig H kötéseken keresztül az oxianion rész újabb aminosavai segítik (pl. a Gln¹⁰⁶ és két Thr⁴⁰)¹³⁴. Szekunder alkoholok

CAL-B-katalizált acilezésének enantioszelektivitására szintén dolgoztak ki prediktív módszereket^{135,136}.

Fontosnak tartom Iley és *mtsai*¹³⁷, különböző N-acetoxi-metilezett β -laktámok lipáz-katalizált hidrolízisének vizsgálati eredményeként bemutatni, hogy minden esetben az észter C-O kötés hasadását tapasztalták, egyetlen esetben sem észlelték a gyűrű felnyilásával járó C1-N2 kötés hasadását (6. ábra).





Szubsztrát enantiomerek aktív centrumba történő dokkolását követő igen komplex számítások eredményeként a nagy kihívást az enantioszelektivitás biztonsággal történő prediktálása jelentené. Ezt azonban, jóllehet az ez irányú intenzív kutatások¹³⁸⁻¹⁴¹ egyre közelebb visznek a célhoz, egyelőre még nem tekinthetjük megoldottnak.

Az eddig felderített három-dimenziós szerkezetek alapján, meglepő szerkezeti és működési hasonlóságokat találtak a különféle lipázok esetében. Az acilezési és hidrolitikus folyamatokat a szerin hidroláz mechanizmusának^{142,143} megfelelően katalizálják. Első lépésben, a katalitikus triád szerinje nukleofil támadást indít az észter (acilezésnél az acildonor, hidrolízisnél a szubsztrát) karbonil csoportjának C-atomjára és létrejön az un. első átmeneti állapot vagy "tetrahedrális" intermedier, amely az R¹OH távozásával az "acil-enzim" kialakulásához vezet. Következik második lépésben a nukleofil (alkohol vagy víz) támadása és keletkezik a második tetrahedrális intermedier, amely az enzim regenerálásával egyidőben a terméket eredményezi (7. ábra). A szaggatott kötés szabad végén, a tetrahedrális intermedier képződését stabilizáló aminosav részek kapcsolódnak.



7. ábra

Tervezett irányítottságú enantioszelektív átalakításhoz empirikus levezetések alapján kiválasztani a megfelelő enzimet, jóllehet az irodalomban erre vannak iránytmutató munkák¹⁴⁴, teljes biztonsággal nem lehetséges. A biokatalizátorok gyakran emlegetett hiányosságát, miszerint nem létezik a tükörkép enzim párjuk, így nem lehetséges egy termék enantiomer abszolút konfigurációjának befolyásolása az enzim, ill. "tükörkép enzim"megválasztásával, Faber és Kazlauskas¹⁴⁵ ellensúlyozták: részben, a természetben lévő enantiokomplementer enzimek (pl. lipáz és szubtilizin, nincs tükörképi viszony közöttük, azonban az aktív centrumok működésük tekintetében tükörképi viszonyt mutatnak) csoportosításával, részben pedig az aktív kötőhely megváltoztatásának¹⁴⁶ lehetőségével.

2.3. Lipázok szerves oldószerekben

A Klibanov-féle radikális szemléletváltást^{147,148} követően, egyre gyakrabban végeznek enzimes átalakításokat a megszokott vizes közeg helyett szerves oldószerben^{84,149-151}, azon jelentős felfedezésnek köszönhetően, hogy az enzim felületén jelenlevő víz képes biztosítani a lipáz katalitikus aktívitását szerves oldószerben is^{149,150,152}. Ezen jelentős felfedezés óta, a szerves oldószerekben végzett kémiai átalakítások az enzimológia egyik legizgalmasabb területe^{86,153,154}.

A szerves közeg használatának számos előnye van, nem beszélve arról, hogy lehetőséget nyújt víz-érzékeny szubsztrátok vagy víz-érzékeny terméket eredményező szubsztrátok enzimes rezolválására. Ugyanakkor, gazdaságosság szempontjából is fontos, hogy az enzim egyszerű szűréssel kinyerhető a reakcióelegyből. Az enzim aktivitására és stabilitására kifejtett hatása mellett, az oldószerek sztereoszelektivitásra gyakorolt hatását már a 90-es években megfigyelték¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ és az óta, az enantioszelektivitás növelésére irányuló enzimes előkísérletek fontos lehetőségeként vizsgálják^{158,159}.

Mivel az oldószer szerepének megmagyarázására nincsenek általános szabályok, ezért helyes megválasztása komoly kihívást jelent. Bizonyos tájékoztató jellegű támpontok azonban léteznek, így a hidrofil (Me₂CO, DMSO, egyéb) vagy hidrofób (hexán, éterek, egyéb) oldószer a rezolválandó szubsztrát poláris vagy nem-poláris jellege alapján történő kiválasztására. Ugyanakkor, a lipázok katalitikus aktívitása általában nő az oldószer hidrofób természetének [log P (DMF: -1,01; MeCN: -0,33; 1,4-dioxán: -0,27; Me₂CO: -0,24; Et₂O: 0,89; THF: 0,49; *t*-BuOMe: 1,35; *i*Pr₂O: 1,52; toluol: 2,73; hexán: 3,5)¹⁶⁰] növekedésével. Megjegyzem, hogy a legalkalmasabb, log P >2,5 oldószerekként kiemelt közeg használatával szemben, több esetben, mind a PS lipáz, mind pedig a CAL-B használatakor optimális aktivitást és enantioszelektivitást éter típusú oldószerekben (*i*Pr₂O, *t*-BuOMe) tapasztaltunk.

A szerves közeg optimális megválasztása mind az enantioszelektivitás, mind pedig a reakciósebesség szempontjából kulcsfontosságú, ugyanis bizonyított, hogy az oldószer függvényében változhat az "alagút" konformációja (zárt-, nyitott- vagy átmeneti-konformáció)¹⁶¹⁻¹⁶³. Például a *Burkholderia cepacia* ezen szerkezeti részének nyitott és zárt konformációjának oldószer függvényében történő dinamikáját vizsgálták Pleiss és *mtsai*¹⁶³ és az eredmények alapján tényszerűsítették a konformáció oldószertől való függését.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Racém laktámok és aminoészterek szintézise

A kiindulási racemátok szintézisét irodalmi úton végeztük, a körülmények pontos betartásával, ill. néhány esetben a részleges módosításával (részletes leírások a megfelelő közleményekben találhatók, az odatartozó irodalmakkal együtt).

Mind a karbociklusos [(±)-10–12, (±)-15, (±)-31–39, (±)-47, (±)-52 és (±)-54], mind pedig az aciklusos [(±)-25, (±)-26, (±)-56–60, (±)-66 és (±)-67] β -laktámokat a klór-szulfonil-izocianát (CSI) megfelelő alkénre, ill. alkadiénre történő 1,2-dipoláros cikloaddiciójával állítottuk elő. A reakciók, a ciklododecénre történő addició kivételével [*cisz*-(±)-52:*transz*-(±)-54 keverék ~ 1:1], minden esetben régió- és sztereoszelektíven zajlódtak, még nyomokban sem volt kimutatható más régió- vagy sztereoizomer jelenléte a reakcióelegyben. A racém β -laktámokból paraformaldehiddel és vizzel, tetrahidrofuránban, pár órás, ultrahangos készülékben történő rázatással kaptuk a kívánt N-hidroxi-metilezett laktámokat [(±)-1–3, (±)-13, (±)-18 és (±)-19], amelyekből (*n*-PrCO)₂O-el Et₃N jelenlétében állítottuk elő a megfelelő O-butirilezett-származékokat [(±)-20 és (±)-21].

A (±)-70 γ -laktámot a kereskedelemben kapható 2-aza-biciklo[2.2.1]hept-5-én-3-on (Vince laktám)¹⁶⁴ [(±)-71] katalitikus transzfer hidrogénezésével, míg a nitrogénen védett (±)-72 γ laktámot a [(±)-71] a di-*t*-butil dikarbonáttal végzett reakciójával állítottuk elő.

A β -laktámok sósavas etanolban történő forralásával jutottunk a megfelelő β -aminoészter hidrokloridokhoz, melyekből a kívánt bázis β -aminoészterek [(±)-77–80, (±)-97 (m) és (±)-99 (o)] felszabadítását NaOH oldattal, hidegen és a hidrolízis elkerülésére gyorsan végeztük. A *transz* β aminoésztereket [(±)-81 és (±)-82] a megfelelő *cisz* sztereoizomerekből [(±)-78 és (±)-79] nátriumetiláttal történő átizomerizálással kaptuk. A legtöbb aciklusos β -aminoészter racemát szintézisét módosított Rodionov reakcióval végeztük. Az aldehidek malonsavval és NH₄OAc-tal eredményezte aminosavakat SOCl₂ jelenlétében, EtOH-ban, etilészter hidrokloridokká alakítottuk, melyekből K₂CO₃-tal szabadítottuk fel a megfelelő aminoészter bázisokat [(±)-85–89 (a-e), (±)-91 (g) és (±)-93–96 (i-l)]. A (±)-90 (f) és (±)-92 (h) szintézisénél aromás nitrilekből indultunk ki, előállítottuk a megfelelő enaminokat, melyek redukciójával nyertük a kívánt racemátokat.

A benzaldehid és *p*-anizidin eredményezte Schiff bázis és acetoxi-acetil-klorid, Et₃N jelenlétében végzett Staudinger reakciójával állítottuk elő a racém *cisz*-3-acetoxi-1-[4-(metoxi-fenil)]-2-azetidinont, amelyet CAN-al, majd ezt követő semlegesítéssel alakítottuk a kívánt *cisz*-3-acetoxi-4-fenil-azetidin-2-on $[(3R^*,4S^*)-(\pm)-22]$ racemáttá. Ez utóbbinak a vizes MeOH-ban, NaHCO₃ és Na₂CO₃ jelenlétében végzett hidrolízise eredményezte a *cisz*-3-hidroxi-4-fenilazetidin-2-on $[(3R^*,4S^*)-(\pm)-23]$, ill. a sósavas etanollal végzett gyűrűnyitása a megfelelő aminoészter $[(2R^*,3S^*)-(\pm)-113]$ racemátokat.

3.2. Az enantiomerfelesleg, a konverzió és az enantioszelektivitás meghatározása

Az enzimes reakciók előrehaladásának követésére, valamint a termékek enantiomerfeleslegének és az enzimes reakciókra jellemző enantioszelektivitási érték meghatározására folyadék [Jasco HPLC (quaternary gradient pump PU-2089plus, multiwavelength detector MD-2010plus)]- vagy gázkromatográfiás (Varian 3900 GC) technikát használtunk. Az Innova 4080 rázógépben végzett fél-mikroméretű, majd az optimalizálás utáni gramm-mennyiségű enzimes reakciók követése céljából, a reakcióelegyből, időközönként vett mintát direkt vagy előzetes derivatizálás (származékképzés) után injektáltuk a GC (Chromopack Chiralsil-Dex CB, Chir-L-Val, Supelco Gamma-DexTM 225), ill. HPLC (Chiralpak IA, Chirobiotic TAG, APEX Octadecyl 5 μ) királis oszlopára. Az (1*R*,2*S*)- ill. (1*S*,2*R*)-**7–9** enantiomerfeleslegeinek meghatározását, előzetes királis derivatizálást követően (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozol-izotiocianáttal, TAGIT)¹⁶⁵, APEX-ODS nem királis oszloppal felszerelt HPLC segítségével végeztük.

Az analitikai módszer kidolgozása mind a racém szubsztrát [(a) kromatogramm], mind a várható termék racemát [(b) kromatogramm] enantiomereinek alapvonalra történő szétválasztását jelenti (8. ábra). Két utóbbi sematikus ábrán [(c) és (d)] egy és ugyanazon enzimes reakcióból, különböző időközönként [(c), *konv.* < 50% és (d), *konv.* ~ 50%] vett minták kromatogrammjai figyelhetők meg. A (d) kromatogrammon mindkét termékre vonatkozóan megtalálhatók a nem kívánt antipód szennyezések, amelyek indokolttá teszik az enantiomerfeleslegek (*ee:* az enantiomerek relativ koncentrációinak a különbsége) számítását.





(1)
$$ee_{P} = \frac{A_{3} \cdot A_{4}}{A_{3} + A_{4}}$$

(3) $konv. = \frac{ee_{S}}{ee_{S} + ee_{P}}$
(4) $E = \frac{\ln \frac{(1 - ee_{S})}{(1 + ee_{S}/ee_{P})}}{\ln \frac{(1 + ee_{S})}{(1 + ee_{S}/ee_{P})}}$

Mivel aminosavak gázkromatográfiás enantioszeparálására (illékonysági problémák miatt) az irodalomban, a korábbiakban nem volt példa és munkáink során szinte minden esetben aminosav volt az enzimes reakció egyik terméke, mi pedig csak a szubsztrát enantiomereinek alapvonalra történő szétválasztásával rendelkezünk, ezért belső standard (*n*-hexadekán vagy *n*-heptadekán) használata volt szükséges (9. ábra). Az előbbi számítási képletek módosultak: a konverziót a (9)es, az ee_{termék} értékét pedig a (10)-es összefüggésekkel számítottuk. Mivel a standard használata nehézkesnek és sok esetben megbízhatatlannak bizonyult, ezért az aminosavak enantiomerfeleslegének pontos meghatározására új, gázkromatográfiás analítikai módszert (észterezés és ezt követő N-acilezés) dolgoztunk ki, melyet dupla derivatizálás (DD) elnevezéssel ismertettünk (4.4. pont alatt).



3.3. Enzimek, reagensek, enzimes reakciók kivitelezése, optimalizálás, preparatívmennyiségű rezolválások

A munkáinkhoz kizárólag kereskedelemben kapható enzimeket (lipáz, észteráz és proteáz) használtunk, így a bakteriális eredetű PS, PS-IM és PS-SD (*Pseudomonas cepacia*, majd 1995 után *Burkholderia cepacia*) és AK (*Pseudomonas fluorescens*), valamint a gomba eredetű AY

(*Candida rugosa*) lipázok az Amano Pharmaceuticals termékei. A gomba eredetű Novozym 435 (immobilizált *Candida antarctica* B lipáz) és Chyrasime L-5 (*Candida antarctica* A lipáz) enzimeket a Novo Nordisk, a szintén gomba eredetű Chyrasime L-2 (immobilizált *Candida antarctica* B lipáz) enzimet pedig a Roche Diagnostics Corporation forgalmazza. A gomba eredetű Lipolase (immobilizált *Candida antarctica* B lipáz) és a sertés hasnyálmirigyből izolált PPL (type II) enzimek a Sigma-Aldrich termékei. A CAL-B (Chirazyme L-2, Novozym 435 és Lipolase), valamint a PS-IM lipázokat gyárilag immobilizált formában használtuk. Mivel az enzim immobolizálásával a stabilitás és aktívitás növelése mellett¹⁶⁸, szelektivitásbeli pozitív változások is elérhetők¹⁶⁹, valamint az immobilizált enzim hatékonyan visszanyerhető a reakcióelegyből, ezért a gyárilag nem immobilizált PS, AK, AY és Chyrasime L-5 lipázokat egyszerű és kevéssé költséges adszorbciós módszerrel immobolizáltuk. A nyers enzimet (5 g) Tris-HCl pufferben (0,02 M; pH 7,8) cukor jelenlétében (3 g) szuszpendáltuk, majd Celitre (17 g) adszorbeáltuk. Az így nyert készítmények 20% (m/m) lipázt tartalmaztak.

Az enzimes reakciókhoz használt nagy analitikai tisztaságú reagensek és oldószerek a HPLC tisztaságú MeOH kivételével, amelyet a Scharlau forgalmaz, Fluka, Sigma-Aldrich és Acros termékek voltak.

A kis-mennyiségű (fél-mikroméretű) szubsztrát enzimes rezolválása céljából a kiindulási racemátot (0,025 vagy 0,05 M), a vizsgált oldószerben (1 ml), vagy oldószer nélkül hozzáadtuk a kiválasztott enzimhez (10–100 mg ml⁻¹), majd hozzáadtuk a reagens acildonort vagy nukleofilt (0,1–100 ekv). Az enzimes reakcióelegyek állandó rázatását (210 rpm), valamint az izoterm körülményeket (25–80 °C) Innova 4080 Incubator Shaker-ben biztosítottuk. Az enzimes reakciók előrehaladását (acilezés vagy hidrolízis) az elegyből vett minták, előbbiekben megadottak szerint GC ill. HPLC analizisével követtük.

Enzimes reakció optimalizálási fázisának részlépéseit és a munka egészébe történő illeszkedését mutatom be a 10. ábrán. Az enzimes előkísérletek (~5–10 mg szubsztrát) keretében vizsgáltuk az enzim típusának és mennyiségének, acilezés esetén az acildonor típusának és mennyiségének, ill. hidrolízis esetén a nukleofil típusának és mennyiségének, az oldószer típusának, a hozzáadott adalék típusának és mennyiségének, valamint a hőmérsékletnek a reakció enantioszelektivitására és sebességére kifejtett hatását. Az előkísérletek során hangsúlyt fektettünk arra is, hogy a környezetre kevésbé káros "zöld" oldószereket használjunk, és nem egy esetben az enzim újrafelhasználhatóságát szintén vizsgáltuk. Az előkísérletek eredményinek összesítése után, a

preparatív-mennyiségű enzimes rezolválásokat (~1–10 g szubsztrát) az optimalizált körülmények között végeztük.





3.4. Az enantiomerek jellemzése

Az enzimek adott reakcióban tanúsított szelektivitását, azaz az enantiomerek abszolút konfigurációját minden esetben meghatároztuk, vagy az előállított enantiomertiszta vegyület irodalomból ismert optikai forgatás értékével való összehasonlítása alapján, vagy pedig oly módon, hogy a kérdéses enantiomert az irodalomból ismert abszolút konfigurációjú vegyületté alakítottuk, és akkor hasonlítottuk össze a forgatási értékeket. Az általunk meghatározott, és néhány esetben analóg viselkedésen alapuló, feltételezett abszolút konfigurációk egy része más technikával is igazolást nyert, így a VCD spektroszkópia kvantumkémiai számításokkal kombinálva tíz enantiomertiszta β -laktám abszolút konfigurációjának meghatározását tette lehetővé⁵⁹.

Együttműködés keretében, a racém, ill. enantiomerdús β -laktámok^{55-58,69,70,73} β aminosavak^{53,57,59,60,67} és γ aminosavak⁷² különböző HPLC technikákkal történő enantioszeparálásásának lehetőségeit is vizsgáltuk. A munkák során számos királis oszlop került kipróbálásra és értékes összefüggések születtek a királis állófázis és a sztereoizomerek elválasztásának minősége tekintetében.

Az enantiomertiszta termékeket szerkezetigazolással (¹H- és ¹³C-NMR, Bruker DRX 500), elemi analízis adatokkal (EA, Perkin-Elmer CHNS-2400 Ser II elemi analizátor) és olvadáspontméréssel (Kofler készülék) jellemeztük. Minden esetben meghatároztuk az optikai forgatóképességet (α , Perkin-Elmer 341 polariméter), és megadtuk az enantiomerfelesleg értékeket (*ee*, királis oszloppal felszerelt GC, ill. HPLC).

4. Eredmények és diszkusszió

4.1. Előzmények: a β - és γ laktámok, valamint β - és γ aminosavak kémiai és farmakológiai jelentősége és jelentősebb enzimes előállítása

A címvegyület enantiomertiszta laktámok és aminosavak mind farmakológiai, mind pedig kémiai szempontból igen jelentős vegyületek. Ezt igazolja a β -laktámok és β -aminosavak^{31,170-181}, valamint γ -laktámok és γ -aminosavak^{173,182-186} sztereoszelektív (enzimes) szintézisével foglalkozó, utóbbi időben megjelent nagy-számú közlemény, ill. összefoglaló közlemény, valamint könyv.

Az aza-heterociklusok fontos csoportját képező β -laktámok biológiai aktivitása, így vérnyomáscsőkkentő, gyulladáscsökkentő, antiaritmiás, antidepresszáns hatása, valamint monoamin oxidáz inhibitor aktivitása az irodalomból ismert¹⁸⁷. Jelentőségük hansúlyozására említem, hogy a gyógyszerkincs β -laktám antibiotikumok antibakteriális hatásáért felelős laktám-gyűrű, a hozzá kapcsolódó oldalláncokkal együtt határozza meg az antibiotikum antibakteriális spektrumát, farmakokinetikáját és a vegyület stabilitását a baktériumok által termelt béta-laktamázokkal szemben^{188,189}. A β -laktámok szerves kémikusok kezében értékes β -aminosav és γ -aminoalkohol forrást jelenthetnek, ugyanakkor szintetikus célokra, hasznos intermedierekként történő széleskörű felhasználásuk igen jelentős^{175,177,178,190}.

A nikotinos acetilkolin receptorra sztereospecifikus agonista, igen erős idegméreg ["Very Fast Death Factor", LD50 200 µg kg⁻¹, 4-7 perc (egerek, intraperitoriálisan)] Anatoxin- a^{191} (Anabaena flos aqua édesvizi kék algából izolálták) mind racém^{192,193}, mind pedig enantiomertiszta¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ formában történő totál-szintézisét több kutatócsoport is leírta. A Parsons és *mtsai*¹⁹² által közölt, β -laktám intermedieren keresztül végzett totál-szintézist, a későbbi munkánk szempontjából gondolatébresztő mivoltának köszönhetően mutatom be, jóllehet a jelen szerzők a több-lépéses szintézis eredményeként az Anatoxin-*a* racém formáját kapták. Ciklooktadiénből CSI addícióval (*a*) állították elő az intermedier β -laktámot, melyet benzileztek (*b*), majd epoxidáltak (*c*). Következett a kulcsfontosságú epoxidnyiás és intramolekuláris ciklizáció (*d*), melyet katalitikus debenzilezés, majd Boc védőcsoport bevitele és az OH csoport jódra tőrténő cseréje követett (*e*). A jód tributil-ónhidrides eltávolítását követően (*f*) egy oxidációs lépés, majd a Boc eltávolítása (*g*) eredményezte a kívánt vegyületet.



A karbociklusos β -aminosavak ömagukban is farmakológiai hatás hordozói lehetnek, így az általunk is több típusú enzimes eljárással előállított (1*R*,2*S*)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav (ciszpentacin)^{170,171} jelentős *Candida albicans* gomba-ellenes aktivitással bír, akárcsak a 4metilén származéka, az Icofungipen (PLD-118)^{197,198}, mellyel klinikai Fázis III vizsgálatok folynak. A természetes eredetű ciszpentacint 1989-ben egymástól függetlenül, két japán kutatócsoport izolálta a *Streptomyces setonii* (*Streptomyces griseus* tud. név)^{199,200} és a *Bacillus cereus*^{201,202} baktériumokból. Számos biológiailag aktív vegyület létezik, melyek szerkezeti elemként karbociklusos β -aminosav enantiomert tartalmaznak, például az antibiotikum Amipurimycin (a *Streptomyces novoguineensis* gombából izolálták) szerkezetében az (1*R*,2*S*)-2amino-1-ciklopentánkarbonsav vagy az antibakteriális Oryzoxymycin^{203,204} szerkezetében az (1*R**,2*R**,3*R**)-2-amino-3-hidroxi-ciklohex-3-én-karbonsav lelhető fel.

A ciszpentacin, a többi karbociklusos β -aminosavval együtt kémiai szempontból is jelentős vegyület. Potenciális farmakológiai hatást-hordozó intermedierek kiindulási anyagai^{36-42,44-51,205}, felhasználást nyernek a heterociklusos^{43,45,206,207} és kombinatórikus^{39,208,209} kémia területein, a peptid kémiában^{,34,61,210,211} pedig beépítésükkel módosítható, azaz növelhető a peptidek biológiai aktívitása, ill. jól meghatározott három-dimenziós szerkezetek (foldamerek) hozhatók létre²¹²⁻²¹⁵.

Két, indirekt lipáz-katalizált módszert kívánok kiemelni, amelyeknek a kidolgozása intézeti részvétellel történt, és amelyeket sikeresen alkalmaztak különféle karbociklusos β -aminosav enantiomerek (köztük a ciszpentacin) szintézisére (11. ábra). Az egyik enzimes út a megfelelő β -aminoészterek enantioszelektív N-acilezésén keresztül (A)²¹⁶, a másik pedig a megfelelő N-hidroxi-metilezett β -laktámok enantioszelektív O-acilezésén keresztül (B)²¹⁷ történik.





Egy korai, már a 60-as években használt enzimes eljárás β -aminosavak szintézisre a β -aminosav származékok (aminoészterek) egy proteolitikus enzim, az α -chymotrypsin [EC 3.4.21.1.] -katalizált rezolválásán alapult^{218,219}. A jó enantioszelektivitással zajlódó hidrolitikus reakciókat vizes közegben, a pH szinten tartásával (7,2–8 között) végezték. A módszert később Steel és *mtsai* az antibakteriális (-)-Oryzoxymycin szintézise során alkalmazták, azaz leírták az etil-(3endo-*tert*-butoxikarbonil-amino-7-oxa-biciklo[2.2.1]hept-5-én-2-exo-karboxilát) PLE (sertés máj észteráz)-katalizissel végzett hidrolízisét. A vizes közegű (pH 8) enantioszelektív hidrolízis (12. ábra)²⁰⁴ eredményezte termékek szétválasztását preparatív királis HPLC technikával (Chiralpak AD, *n*-heptán/EtOH 95:5) valósították meg.



12. ábra

Evans és *mtsai*²²⁰ indirekt enzimes eljárást dolgoztak ki a ciszpentacin előállítására, a racém 6aza-biciklo[3.2.0]hept-3-én-7-on ENZA-1 laktamáz (*Rhodococcus equi* NCIMB 40213)katalizált enantiospecifikus hidrolízisén keresztül (13. ábra). A β -laktamáz [EC 3.5.2.6] D osztályába sorolt, bakteriális eredetű, teljes sejtes enzimet vizes közegben használták (pH 7) és a reakciókat 20 °C-on végezték. A laktámgyűrű C1-N2 kötésének enantioszelektív hasításával kapott termékekből a gyűrűnyilt aminosavat nem izolálták, a kloroformos extrakcióból nyert (1*R*,5*S*)- β -laktámot telítették, majd vizes sósavval a kívánt ciszpentacin hidrokloriddá nyították. Az eljárás egyik hiányossága, hogy nem kereskedelemben kapható laktamáz enzimet használtak, az aminosavat pedig veszni hagyták. Ugyanakkor, a ciszpentacint a több lépés miatt alacsony termeléssel kapták. Jobb termelés céljából, a telített β -laktámból kiidulva, direkt enzimes út megvalósításával is próbálkoztak, azonban az adott körülmények között az enzim gyakorlatilag nem mutatott aktivitást a C1-N2 hasítására.



13.	ábra

A ciklusos *cisz* γ -aminosavak farmakológiai szempontból igen jelentős vegyületek. Például a 4aminociklopent-2-én-1-karbonsav, a 3-aminociklopentán-1-karbonsav és ezek enantiomerei GABA analógként ismert vegyületek, GABA receptor agonisták, részleges agonista és antagonista hatással²²¹. Alkalmasak meghatározott, nem-természetes, szekunder szerkezetű peptidek előállítására, továbbá önrendeződésre képes peptid nanocsövek tervezésére és előállítására²²². Az (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsav például jelentős antivirális hatású purin- és pirimidin-karbonukleozidok (pl.: Abacavir²²³⁻²²⁶, Carbovir²²⁷⁻²³¹) szintézisének kulcsintermedierje.

Az Abacavir kutatásánál, az intermedier γ -laktám, ill. ciklusos γ -aminosav aszimmetria centrumainak megfelelő, a hatásért felelős abszolút konfigurációval történő kialakítására több enzimes módszert is kidolgoztak¹⁸²⁻¹⁸⁶. Így Csuk *és mtsai*¹⁸² az (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsav szintézisére irányúló több-lépéses eljárásukban a racém metil-[*cisz*-4-(acil-amino)ciklopent-2-én-1-karboxilát] hidrolízisét PLE-katalízissel végezték és a reakciót 50%-os konverzió fölé futtatva (~65%), kapták kiváló enantiomerfelesleggel (*ee* > 99%) az el nem reagált (1*R*,4*S*)-aminoésztert, melyből hidrolízissel nyerték a kívánt abszolút konfigurációjú célvegyületet.

Evans és *mtsai*¹⁸³ pedig, az ENZA-1 (*Rhodococcus equi* NCIMB 40213) és ENZA-20 (*Psedomonas solanacearum* NCIMB 40249) törzsek laktamáz aktivitása felhasználásával, vizes közegű eljárást dolgoztak ki a 2-aza-biciklo[2.2.1]hept-5-én-3-on rezolválására. A rezolválások során előállították mind a (+), mind pedig a (-) 2-aza-biciklo[2.2.1]hept-5-én-3-on enantiomereket, valamint a laktámgyűrű felnyílása következtében keletkező (-) és (+) *cisz*-4-amino-ciklopent-2-én-1-karbonsav enantiomereket. A későbbiekben, Taylor és *mtsai*¹⁸⁴, majd Littlechild és *mtsai*¹⁸⁵ továbbfejlesztették a módszert a 2-aza-biciklo[2.2.1]hept-5-én-3-on rezolválására, szelektívebb és stabilabb laktamáz aktivitású törzseket írták le (pl. ENZA-22, ENZA-25).

Az utóbbi években, az aciklusos β -aminosavak iránt is fokozódott a figyelem. Ez köszönhető annak, hogy önmagukban is farmakológiai hatás hordozói lehetnek, ill. számos biológiailag aktív vegyület szerkezeti elemeként enantiomer β -aril-, β -heteroaril- vagy β -arilalkil- β -aminosavat (*R*)-3-amino-3-(3,5-diklór)propionsav és az (S)-3-amino-3-(3tartalmaz. Például az piridil)propionsav származékai integrin $\alpha_v\beta_3$ -receptor antagonista hatást mutatnak²³² (ez a receptor fontos célpont olyan betegségek kezelésében, mint a csontritkulás, daganatok kifejlődése és áttétek képződése). Az antitrombotikus hatással rendelkező fibrinogén-receptor antagonisták közül, pl. az elarofiban (RWJ-53308), az (S)-3-amino-3-(3-piridil)propionsav származéka sikeresen túljutott a humán klinikai vizsgálatok II. fázisán²³³⁻²³⁵ vagy az (R)-3-amino-3-(3piridil)propionsav, valamint az (R)-3-amino-3-fenilpropionsav a hepatitis C vírus inhibítorok alkotóelemei^{236,237}.

A 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek vércukorszintjének csökkentésére alkalmazott JanuviaTM (szitagliptin-foszfát)²³⁸ az elsőként bevezetett dipeptidil-peptidáz IV inhibítor^{239,240}, szerkezetében egy β -arilalkil-szubsztituált β -aminosav enantiomer, az (*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorfenil)butánsav lelhető fel. Szintézisére számos aszimmetrikus szintézisutat kidolgoztak²⁴¹⁻²⁴⁴, az (*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorfenil)butánsav enzimes előállítására azonban nem találtunk leírást az irodalomban.

A gyógyszertervezés és gyógyszerszintézis területén egy másik kulcsfontosságú intermedier, a (2R,3S)-3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionsav, melyet két, a rák kemoterápiában leghatékonyabb gyógyszerek között nyilvántartott Taxol®. (paclitaxel) és analógja a Taxotère® (docetaxel) szemi-szintézisében használnak²⁴⁵. Ezek a módszerek részben a kulcs-intermedier 3-fenilizoszerin származék szintézisét, részben pedig a megfelelő abszolút konfigurációval rendelkező intermedier és különböző Taxus fajok tűleveléből (pl. *Taxus baccata*), nagy mennyiségben izolálható baccatin III származék C13-O-en keresztüli kapcsolási lehetőségeit vizsgálták.

A Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének szintézisére kidolgozott nagyszámú szintézisút²⁴⁶ egyikét, a Sih és *mtsai*²⁴⁷ által, optikailag aktív 3-hidroxi-4-fenil β -laktám származékok előállítására végzett munkájuk eredményeit kívánom vázolni, ugyanis az általunk használt egyik racém szubsztrát megegyezik az említett munka egyik szubsztrátjával. Másfelől pedig, a jelen munka egyike az irodalomban mindösszesen fellelhető két, lipáz-katalizált β -laktámok gyűrűnyitására talált példáknak. Amikor a N-védett [C(O)Ph] racém *cisz*-(3*R**,4*S**)-3-acetoxi-4-fenil-azetidin-2-on C3 észter funkciójának P-30 lipáz (*Pseudomonas* lipáz)-katalizált metanolízisét (MeOH) végezték *t*-BuOMe-ben azt találták, hogy az OAc hidrolízis mellett

részben gyűrűnyílás is lejátszódott. Ugyanakkor megemlítették, hogy két penicillináz (*Escherichia coli* 205 és *Enterobacter cloacae*) alacsony enantioszelektivitással ($E \le 16$), de katalizálták a gyűrűnyitási reakciót.





Nem meglepő tehát, hogy az utóbbi években, ezen egyre nagyobb érdeklődéssel övezett területen kívántunk új enzimes stratégiákat fejleszteni a farmakológiai szempontból értékes intermedierek előállítására, ill. új, potenciális biológiai hatáshordozókat előállítani.

4.2. Indirekt enzimes módszerek

A β -laktámok hidroxi-metilezésén, majd azt követő enzimes acilezésén keresztül jó hozammal és jó enantiomerfelesleggel nyerhető mind az észter, mind pedig az el nem reagált alkohol. Ezzel a lehetőséggel élve, új, enantiomertiszta β -laktámok és β -aminosavak vagy származékaik indirekt enzimes módszerrel való előállítását valósítottuk meg, az igen egyszerűen elkészíthető N-hidroximetilezett β -laktámok aszimmetrikus acilezésén, vagy a megfelelő N-acetoxi-metilezett származékaiknak enantioszelektív hidrolízisén keresztül (15. ábra).



15. ábra

4.2.1. N-Hidroxi-metilezett karbociklusos β -laktámok enantioszelektív acilezése [1,2]

A ciszpentacin előállítására kidolgozott intézeti indirekt enzimes módszer²¹⁷ továbbfejlesztéseként, szerves közegű enzimes eljárást dolgoztunk ki a 7-aza-biciklo[4.2.0]oktán-8-on, a 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-4-én-8-on és a 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-3-én-8-on enzimes rezolválására a

N-hidroxi-metilezett-származékaik [(±)-**1**–(±)-**3**] aszimmetrikus O-acilezésén keresztül (16. ábra) [1].



A Parsons és *mtsai*¹⁹², racém Anatoxin-*a* totál-szintézisére megadott reakciósorának (4.1. pont alatt) az áttanulmányozása kapcsán született meg az Anatoxin-*a* enantiomertiszta formában való szintézisének a gondolata. Az előzőekben vázolt módszer alapjaira építkezve, enzimes módszert dolgoztunk ki az intermedier (1*R*,8*S*)- és (1*S*,8*R*)-9-aza-biciklo[6.2.0]dek-4-én-10-on [(+) és (-) **15**] enantiomerek szintézisére (17. ábra), azaz egy olyan új, formális totál-szintézist adtunk meg mely mindkét Anatoxin-*a* enantiomer előállítását lehetővé teszi [2].



17. ábra

Előkísérletek (enzim-, acildonor-, oldószer-, additív- és hőmérséklet-vizsgálat)

Az előkísérleteket a (\pm) -**1**-es modellvegyület esetében végeztük, azaz vizsgáltuk különböző enzimek, acildonorok és oldószerek reakció enantioszelektivitására és sebességre gyakorolt hatását (1. táblázat). Kipróbálásra kerültek, a távoli kiralitáscentrumot tartalmazó alkoholok

rezolválására leggyakrabban használt PS és AK lipázok^{248,249}, valamint vizsgáltuk a CAL-B (Novozym 435) lipázt is. Szem előtt tartva az enzim-katalizált kinetikus rezolválás alapkövetelményét, hogy a reakció legyen irreverzibilis, a korábbi tapasztalatainkat is felhasználva^{113,114}, vinil-észtereket választottunk acildonornak, így a rövidebb szénláncú vinilacetát (VA) és vinil-butirát (VB) kerültek kipróbálásra. A szobahőmérsékleten végzett acilezési reakciókat több típusú oldószerben is elvégeztük, pl. acetonban (Me₂CO), tetrahidrofuránban (THF), acetonitrilben (MeCN), dietil-éterben (Et₂O) és diizopropil-éterben (*i*Pr₂O). Mivel a (\pm)-**1** PS lipáz-katalizált acilezésére (VB) az optimális enantioszelektivitást (*E* > 200) acetonban kaptuk, ezért a későbbiekben, a (\pm)-**1**–(\pm)-**3** preparatív-mennyiségű rezolválásait acetonban végeztük.

 táblázat. Enzim (25 mg ml⁻¹ PS lipáz és 50 mg ml⁻¹ AK lipáz), acildonor (0,2 M), oldószer, enantioszelektivitásra és reakciósebessége gyakorolt hatása a (±)-1 szobahőmérsékleten végzett acilezése során

Sor	Enzim	Acildonor	Oldószer	Reakció-	Konv.	ee_s	ee_p	Ε
				idő (h)	(%)	(%)	(%)	
1	AK lipáz ^a	VA	Me ₂ CO	2	48	82	92	48
2	AK lipáz ^a	VB	Me ₂ CO	2	47	86	96	136
3	PS lipáz ^a	VB	Me ₂ CO	2	48	89	98	>200
4	PS lipáz ^a	VB	THF	3	46	81	94	81
5	AK lipáz ^a	VB	THF	3	46	79	93	66
6	PS lipáz	VB	THF	4	44	70	90	39
7	Novozym 435	VB	THF	0,75	43	32	40	3
8	PS lipáz ^a	VB	MeCN	4	39	61	97	122
9	PS lipáz ^a	VB	Et_2O	0,5	40	63	95	74
10	PS lipáz ^a	VB	<i>i</i> Pr ₂ O	1	47	75	83	24

^a20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében.

Mivel a (±)-13, a korábbiakban bemutatott, (±)-1 estében optimalizált körülmények között (PS lipáz; VB, Me₂CO, szobahőmérséklet) kis enantioszelektivitást (E = 26) mutatott (2. táblázat, 1. sor), ezért további optimalizálásra volt szükség. Enzim-vizsgálat keretében, a (±)-13 VB-al végzett acilezési reakcióját PS lipáz mellett, AK lipáz, CAL-A, PPL és CAL-B (Lipolase és Novozym 435) katalízissel is elvégeztük (1. és 16–24. sorok). Mivel az acetonban, 25 °C-on végzett reakciók közül a legnagyobb enantioszelektivitást PS lipázzal tapasztaltuk, vagyis nem sikerült szelektívebb enzimet találnunk, ezért a PS lipáz-katalizált acilezést VB helyett VA-tal, vinil-propionáttal (Vpr), vinil-pivaláttal (Vpiv), valamint izopropenil-acetáttal (IA) is kipróbáltuk (7. és 13–15. sorok).

Sor	Enzim	Acildonor	Oldószer	Reakció- idő	ee_s	ee_p	Konv.	Ε
1	PS lipáz	VB	Me ₂ CO ^b	7 h	81	83	49	26
2		-	<i>i</i> Pr ₂ O ^b	45 min	88	71	55	16
3		-	$(i Pr_2 O + Et_3 N)^b$	15 min	78	94	45	76
		_	χ <u>-</u> υ γ	45 min	93	83	53	36
4	_		MeCN ^b	72 h	8	80	9	10
5	_		CHCl ₃ ^b	72 h	nen	ı tapaszta	alható reak	kció
6		_	toluol ^b	1 h	92	91	50	69
				3 h	88	43	67	7
7		VA	Me_2CO^b	2,7 h	73	77	49	16
8			<i>i</i> Pr ₂ O ^b	15 min 45 min	74 89	91 74	45 55	47 19
9		-	$(i\Pr_2O + Et_3N)^b$	45 min	92	86	52	43
10		-	с	1 h	89	91	49	63
			<i>i</i> Pr ₂ O	1,5 h	91	84	52	36
11			d	1 h	88	94	48	94
	<u>.</u>	-	b	2.5 h	95	93	51	102
12			THF	$30 \min$	36 62	61 58	37 52	6 7
12		Vpr	iPr O ^b	1 II 15 min	72	00		40
15		v pi	<i>l</i> F1 ₂ O	45 min	89	90 69	44 56	40 15
14		Vpiv	<i>i</i> Pr ₂ O ^b	53 h	71	82	46	21
		1	2	96 h	94	62	60	14
15		IA	<i>i</i> Pr ₂ O ^b	2,25 h	64	88	42	30
				4 h	82	55	60	8
16	Novozym	VB	Me_2CO^b	15 min	30	33	48	3
17	435		<i>i</i> Pr ₂ O ^b	15 min	50	32	61	3
18	AK lipáz	VB	Me_2CO^b	2,5 h	36	84	30	16
19			<i>i</i> Pr ₂ O ^b	15 min	66	84	44	22
			· · · · · ·	45 min	87	50	64	8
20	CAL-A ^a	VB	Me_2CO^b	48 h	nen	ı tapaszte	alható reak	kció
21			<i>i</i> Pr ₂ O ^b	1,7 h	37	38	49	3
22	PPL	VB	<i>i</i> Pr ₂ O ^b	1,5 h	23	61	28	5
23	Lipolase ^a	VB	$Me_2\overline{CO^b}$	48 h	nen	ı tapaszte	alható reak	<i>xció</i>
24		-	<i>i</i> Pr ₂ O ^b	15 min	41	61	40	6
				45 min	60	41	59	4

2. táblázat. Enzim (30 mg ml⁻¹), acildonor (0,1 M), oldószer, additív és hőmérséklet enantioszelektivitásra és reakció sebességére gyakorolt hatása a (±)-13 acilezése során

^a20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében. ^b25 °C. ^c0 °C. ^d-15 °C.

Az acilezésekről általánosságban elmondható, hogy nem álltak le 50%-os konverziónál, az észter és az el nem reagált alkohol termékek enantiomerfeleslegei hirtelen kezdtek csökkeni (18. ábra).

Bebizonyítottuk, hogy az *ee*-ek drasztikus csökkenéséért az enzim felületén lévő víz volt a felelős, amely mint nukleofil vett részt a termék észter hidrolízisében.





A további vizsgálatokhoz, a VB-tal közel azonos eredményeket mutató VA-ot választottuk acildonornak. Ismerve, hogy az oldószerek jelentősen befolyásolhatják mind az enantioszelektivitást, mind pedig a reakciósebességet, a (±)-**13** PS lipáz-katalizált acilezését (VA és VB) különböző szerves oldószerekben végeztük, így *i*Pr₂O-ben, MeCN-ben, CHCl₃-ban, toluolban és THF-ban. A látszólagos *E* és reakciósebesség optimális kombinációját a *i*Pr₂O biztosította (2. és 8. sorok). A különböző adalékanyagok reakcióelegyhez való hozzáadása szintén növelheti az enantioszelektivitást²⁵⁰, így a további optimalizálás céljából Et₃N-t adtunk a *i*Pr₂O-ben végzett reakcióelegyhez (3. és 9. sorok). A katalitikus mennyiségű Et₃N hozzáadásával kétszeres enantioszelektivitást értünk el (*E* ~ 40 *konv*. ~ 50%). Ugyancsak vizsgáltuk a hőmérsékletnek az enantioszelektivitásra és a reakciósebességre gyakorolt hatását, azaz a (±)-**13** PS lipáz-katalizált acilezését VA-tal, *i*Pr₂O-ben 0 és -15 °C-on is elvégeztük (10. és 11. sorok). A -15 °C-on végzett reakció esetében (11. sor), várakozásunkat felülmulva, igen jó enantioszelektivitást (*E*_{látszólagos} = 102, *konv.* = 51%) tapasztaltunk, így a (±)-**13** gramm-mennyiségű rezolválását PS lipáz katalízissel, VA-tal, *i*Pr₂O-ben -15 °C-on végzetük.

4.2.2. N-Hidroxi-metilezett 4-aril-szubsztituált β-laktámok enantioszelektív acilezése [3]

β-Aril-szubsztituált β-aminosavak szintézise céljából, a korábbi, karbociklusos β-laktámok enzimes rezolválására kidolgozott enzimes módszer alkalmazhatósági határának szélesítéseként vizsgáltuk a fenil- $[(\pm)$ -**18**] és *p*-tolil- $[(\pm)$ -**19**] szubsztituált β-laktámok enzimes rezolválását (19 ábra).





Előkísérletek (enzim-, oldószer-vizsgálat)

A (±)-18 VB-tal (2 ekv.), *i*Pr₂O-ben, 25 °C-on végzett acilezését a PS vagy AK lipázok (30 mg mL⁻¹) kiváló enantioszelektivitással (E > 200) katalizálták. A szintén kipróbálásra került CAL-A igen csekély (E = 4), míg a PPL közepesnek mondható (E = 76) enantioszelektivitással katalizálták az ugyancsak *R*-szelektivitással zajlódó acilezést. Az oldószer-vizsgálat eredményeként megállapítottuk, hogy az E a *i*Pr₂O:CHCl₃ 1:1 arányú elegyében és a THF-ban végzett reakciók esetében csökkent (3. táblázat, 3. és 4. sorok), míg Me₂CO-ban, *i*Pr₂O-ben és toluolban (3. táblázat, 1., 2. és 5. sorok) jóllehet, különböző reakciósebességeket, de kiváló enantio-szelektivitást ($E \ge 193$) tapasztaltunk. A reakciósebességeket is szem előtt tartva, a toluolt választottuk oldószernek a későbbi, preparatív-mennyiségű rezolváláshoz. Amikor a (±)-18 vegyületre optimalizált körülmények (PS lipáz, VB, toluol, 25 °C) között elvégeztük a (±)-19 acilezését, jóval alacsonyabb enantioszelektivitást tapasztaltunk (E = 57).

3. táblázat. A (±)-**18** (0,1 M) PS lipáz^a (30 mg ml⁻¹)-katalizált acilezése VB-tal (0,2 ekv.), különböző oldószerekben, 25 °C-on

Sor	Oldószer	Reakció- idő (h)	Konv. (%)	ee _s (%)	ee_p (%)	Ε
1	Me ₂ CO	7,5	49	94	98	> 200
2	<i>i</i> Pr ₂ O	2	50	96	96	193
3	<i>i</i> Pr ₂ O:CHCl ₃ (1:1)	17	52	97	91	89
4	THF	24	50	90	91	65
5	toluol	1,5	49	94	97	> 200

^a20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálv a, cukor jelenlétében.

4.2.3. N-Acetoxi-metilezett 4-aril-szubsztituált β-laktámok enantioszelektív hidrolízise [3]

Mivel a (\pm) -19 optimalizált körülmények közötti acilezése nem igazolta a várt enantioszelektivitást, ezért előállítottuk a megfelelő racém észtereket [(\pm) -20 és (\pm) -21] és ezek

enantioszelektív hidrolízisén keresztül (20. ábra) próbáltunk eljutni a tervezett enantiomertiszta aminosavakhoz.



Előkísérletek (enzim-, hőmérséklet-vizsgálat)

A munka megtervezésében segített a korábbiakban, 1,3-amino alkoholok diacetil-származékainak enzimes O-deacetilezése területén szerzett tapasztalatunk is²⁵. Így az első próbálkozást, a (±)-**20** debutirilezésére CAL-B (Novozym 435) enzimmel, EtOH:*i*Pr₂O (1:10) elegyében, 60 °C-on végeztük. A gyors reakció (*konv.* = 95 % 1 óra után) gyakorlatilag nem mutatott szelektivitást (4. táblázat, 1. sor). Amikor a reakciót PS lipáz katalízissel, 50 °C-on végeztük, nagy, *R*szelektivitással (E = 196) lejátszódó hidrolízist tapasztaltunk (4. táblázat, 2. sor). További optimalizálás céljából, a hőmérsékletet csökkentettük (4. táblázat, 3. és 4. sorok), és az optimális *E* és reakciósebesség kombinációját a 40 °C-on végzett reakció esetében tapasztaltuk. Az ugyancsak 40 °C-on kipróbált AK lipáz jó aktívitást mutatott, de viszonylag szerénynek mondható, *R*-szelektivitással katalizálta a reakciót (4. táblázat, 5. sor).

4. táblázat. A (±)-20 (0,1 M) lipáz (30 mg ml⁻¹)-katalizált debutirilezése EtOH-lal *i*Pr₂O-ben (1:10), különböző hőmérsékleten
 Sor Enzim T Reakció- Konv. ee_s ee_p E

Sor	Enzim	Т (°С)	Reakció- idő (h)	Konv. (%)	ees (%)	ee_p (%)	Ε
1	Novozym 435	60	1	95	69	4	1,7
2	PS lipáz ^a	50	4,5	50	96	96	194
3	PS lipáz ^a	40	6	49	94	98	> 200
4	PS lipáz ^a	25	22	49	88	91	62
5	AK lipáz ^a	40	6	49	89	93	83

^a20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében.

A (±)-21, optimalizált körülmények [PS lipáz, EtOH:*i*Pr₂O (1:10), 40 °C] között végzett debutirilezése azonban nem a várt, 200 feletti enantioszelektívitással játszódott le (E = 89).

4.2.4. A cisz-3-acetoxi-4-fenilazetidin-2-on enantioszelektív hidrolízise [4]

A kezdetben, kizárólag *Taxus brevifolia* mamut-fenyőből izolált daganatellenes Taxol mennyiségi problémájának megoldására, a kutatók számos fél-szintetikus utat dolgoztak ki. Amint az *Előzményekben* (4.1. pont alatt) említettem, Sih és *mtsai*²⁴⁷ optikailag aktív 3-hidroxi-4-fenil β -laktám származékokat állítottak elő, a racém *cisz*-3-acetoxi-4-fenil-azetidin-2-on [($3R^*,4S^*$)-(\pm)-**22**] C3 észter funkciójának enantioszelektív hidrolízisén keresztül. Azt találták, hogy a *Pseudomonas* lipázok jó enantioszelektivitással (E > 100) katalizálták a ($3R^*,4S^*$)-(\pm)-**22** vizes közegű (pH = 6,8) hidrolízisét. Megfigyelték, hogy amikor a N-védett [C(O)Ph] β -laktám P-30 lipáz-katalizált metanolízisét (MeOH) végezték *t*-BuOMe-ben, akkor az OAc hidrolízis mellett részben gyűrűnyílás is lejátszódott.

Elsődlegesen, a Taxol kulcs-intermedierjének enzimes szintézise területén a $(3R^*, 4S^*)$ - (\pm) -22 szerves közegű enzimatikus hidrolízisét (21. ábra) dolgoztuk ki.



21. ábra

Előkísérletek (enzim-, oldószer-, additív-, hőmérséklet-, enzimmennyiség-vizsgálat)

A $(3R^*,4S^*)$ - (\pm) -**22** (0,05 M) szerves közegű szelektív OAc hidrolízisét víz hozzáadásával (0,5 ekv.), *i*Pr₂O-ben, 45 vagy 60 °C-on, különböző enzimekkel (30 mg mL⁻¹) végeztük. A kipróbált lipázok többsége, így a PS-SD, a CAL-A és a PPL gyakorlatilag nem katalizáltak átalakítást (*konv.* < 2% 4 nap után), azonban az AK és PS lipázok jelentős reakciósebességbeli különbséggel, de bíztató enantioszelektivitással katalizálták az észter funkció hidrolízisét (AK lipáz esetében: *konv.* = 9% 4 nap után, *E* = 10 és PS-IM lipáz esetében *konv.* = 29% 20 óra után, *E* = 34). A CAL-B (Lipolase)-katlizált reakció esetében felfedeztünk egy új reakcióutat, ennek bemutatására a 4.3.3. pont alatt kerül sor.

Különböző oldószereknek, így az Me₂CO, az 1,4-dioxán, a *t*-BuOMe, a *n*-hexán és a toluol a PS-IM lipáz-katalizált reakciók enantioszelektivitására gyakorolt hatásának vizsgálatára is sor került

(5. táblázat), azonban az *E* és reakciósebesség optimális kombinációját továbbra is a iPr_2O -ben végzett reakció (5. táblázat, 3. sor) mutatta.

Sor	Oldószer	Konv. (%)	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Ε
1	Me ₂ CO	24	21	67	6,2
2	1,4-dioxán	22	23	82	12
3	<i>i</i> Pr ₂ O	48	81	89	42
4	t-BuOMe	44	68	88	31
5	<i>n</i> -hexán	49	77	79	19
6	toluol	30	26	60	5,1

5. táblázat. A $(3R^*, 4S^*)$ - (\pm) -**22^a** hidrolízise különböző oldószerekben

^a0,05 M szubsztrát, lipáz PS-IM (30 mg ml⁻¹), H₂O (0,5 ekv.), 50 °C, 23 h után.

A hőmérséklet 50 °C-ról 25, ill. 3 °C-ra történő csökkentésével a PS-IM lipáz (30 mg mL⁻¹)katalízissel, *i*Pr₂O-ben végzett hidrolízis (0.5 ekv. víz) enantioszelektivitása drasztikusan lecsökkent (23 óra után: 50 °C-on *konv.* = 48%, E = 42; 25 °C-on *konv.* = 32%, E = 5,9 és 3 °Con *konv.* = 7%, E = 5,5).

A PS-IM lipáz mennyiségének növelésével 30 mg mL⁻¹-ről 50, majd 70 mg mL⁻¹-re, a (±)-**22** hidrolízisének (0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on) sebessége jelentősen nőtt, az enantio-szelektivitás pedig látszólag nem változott (6 óra után, $E \sim 40$: 30 mg mL⁻¹ enzimmel *konv*. = 17%; 50 mg mL⁻¹ enzimmel *konv*. = 51% és 70 mg mL⁻¹ enzimmel *konv*. = 53%).

Szeretném kihangsúlyozni, hogy a CAL-B kivételével, egyik enzim esetében sem sikerült, még nyomokban sem kimutatni a $(3R^*,4S^*)$ - (\pm) -**22** laktámgyűrű felnyílásának eredményeként keletkező β -aminosavat. Összegezve az előkísérleteket, a $(3R^*,4S^*)$ - (\pm) -**22** preparatívmennyiségű hidrolízisét, gazdaságossági szempontokat is figyelembe véve, 50 mg mL⁻¹ PS-IM lipáz katalízissel, 0,5 ekv. víz hozzáadásával, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on végeztük, a reakció 50%-os konverzió fölé történő futtatásával.

4.2.5. Gramm-mennyiségű rezolválások

Az optimális körülmények között (1–5. táblázatok) elvégeztük a racém β -laktámok [(±)-1–(±)-3, (±)-13, (±)-29, (±)-18–(±)-22] gramm-mennyiségű rezolválásait, a jellemző adatokat a 22. ábrán és a 6. táblázatban foglaltam össze.



 (\pm) -1– (\pm) -3

Pseudomonas cepacia S-szelektivitás VB, Me₂CO, RT E > 200 [1]



Pseudomonas cepacia S-szelektivitás VB, iPr_2O , Et₃N, -15 °C E = 94 [2]



(\pm)-20, K = 11 (\pm)-21, R = Me *Pseudomonas cepacia R*-szelektivitás EtOH: *i*Pr₂O (1:10), 40 °C E > 200 a (\pm)-20 esetében E = 89 a (\pm)-21 esetében [3] Ac0 Ph (3*R**,4*S**)-(±)-**22**

Burkholderia cepacia S-szelektivitás H_2O , *i*Pr₂O, 50 °C E = 24 [4] OH

 (\pm) -18, R = H (\pm) -19, R = Me

R-szelektivitás

VB, toluol, 25 °C

Pseudomonas cepacia

 $E > 200 \text{ a } (\pm)$ -18 esetében $E = 57 \text{ a } (\pm)$ -19 esetében [3]

22. ábra

6. táblázat. Gramm-mennyiségű enzimes rezolválás	sok
--	-----

	Termék									
	Reakcióidő (h)	Konv. (%)	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$
(±)-1	5	50	1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> - 4	40	98 ^c	-15,5 ^a	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 1	36	97 ^c	-31,7 ^a
(±)- 2	4	49	1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> - 5	33	99 ^c	-6,3 ^a	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 2	25	97 ^c	-46,1 ^a
(±)- 3	6	49	1 <i>R</i> ,6 <i>S</i> - 6	34	99 ^c	-43,3 ^b	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 3	32	94 ^c	-9,1 ^c
(±)- 13	4	51	1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> - 14	43	92	$-29,5^{a}$	1 <i>S</i> ,8 <i>R</i> - 13	31	96	-27 ^a
(±)- 18	1,5	50	<i>R</i> - 20	40	97 ^c	+61,4 ^d	S-18	39	98 ^c	-166,7 ^d
(±)- 19	1,5	52	<i>R</i> -21	44	88	+43,5 ^d	S-19	28	95°	-168 ^e
(±)- 20	7	50	<i>R</i> - 18	46	96 ^c	$+161^{\mathrm{f}}$	S- 20	47	97 ^c	-62,5 ^g
(±)- 21	6	52	<i>R-</i> 19	45	91	+155,8 ^h	S-21	40	97	-62^{d}
$(3R^*, 4S^*)$ -((±)- 22 31	56	3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> - 23	48	74	-131 ⁱ	3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> - 22	33	95	-49 ^j

^ac = 1; MeOH. ^bc = 0,5; CHCl₃. ^cc = 1,88; MeOH. ^dc = 1; EtOH. ^ec = 0,5; EtOH. ^fc = 0,35; EtOH. ^gc = 0,65; EtOH. ^hc = 0,3; EtOH. ⁱc = 0,35; CHCl₃. ^jc = 0,45; CHCl₃.

4.2.6. Továbbalakítások

A nitrogénen-szubsztituált karbociklusos β -laktám enantiomerek [(1*S*,6*R*)-**1**–**3**, (1*R*,6*S*)-**4**–**6**, (1*S*,8*R*)-**13** és (1*R*,8*S*)-**14**] β -aminosav, ill. β -aminoészter enantiomerekké történő gyűrűnyitását
18% HCl, ill. 22% HCl/EtOH jelenlétében pár órás reflux mellett végeztük. A keletkezett (1*R*,2*S*)- és (1*S*,2*R*)-**7–9** β-aminosav és (1*R*,2*S*)- és (1*S*,2*R*)-**16** és **17** β-aminoészter hidrokloridsókat ion-cserélő kromatográfiával vagy átkristályosítással tisztítottuk. A telítetlen βaminosav származékok némelyikének [(1*R*,2*S*)- és (1*S*,2*R*)-**16**] redukcióját hidrogén-transzfer reakcióval jó termelések mellett végeztük. A N-szubsztituált β-laktám enantiomerek β-laktám enantiomerekké [(1*S*,6*R*)-**10–12**, (1*R*,8*S*)- és (1*S*,8*R*)-**15**; *ee* ≥ 93%) történő metanolízisét NH₄OH/MeOH-os melegítéssel végeztük (13. és 14. ábrák). A N-acetoxi-metilezett β-laktám enantiomert [(1*R*,8*S*)-**14**] MeOH-ban, K₂CO₃ jelenlétében történő kevertetéssel alakítottuk a kívánt N-hidroxi-metil származékká [(1*R*,8*S*)-**13**, *ee* = 90%) (14. ábra). A N-szubsztituált aciklusos β-laktám enantiomerekből előállítottuk a kívánt enantiomertiszta aciklusos β-laktám és β-aminosav származékokat (23. ábra).



23. ábra

Enantiomer	Absz.	Ee	$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{25}$	Enantiomer	Absz.	<i>ee</i>	$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{25}$
	Konng.	(%)			Konng.	(%)	
7	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	98 ^c	-19,6 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)	16	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	81	-1,5 (c 1; EtOH)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	97	+20 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)		1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	98 ^c	+1,8 (<i>c</i> 1; EtOH)
8	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99 ^c	-36,2 (<i>c</i> 0,5; H ₂ O)	17	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	86	+6,3 (c 0,5; EtOH)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	97 ^c	+34 (<i>c</i> 0,27; H ₂ O)		1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	97	-7,0 (c 0,5; EtOH)
9	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99 ^c	+120 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)	25	R	97 ^c	+132,4 (c 0,5; EtOH)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	-122 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)		S	99	-136,3 (c 0,5; EtOH)
10	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i>	98	-3,8 (<i>c</i> 0,27; CHCl ₃)	26	R	96 ^c	+122 (c 0,5; EtOH)
11	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i>	98	-26,3 (<i>c</i> 0,5; CHCl ₃)		S	99	-125,5 (c 0,5; EtOH)
12	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i>	94	+164 (<i>c</i> 0,13; CHCl ₃)	27	R	95°	-11,4 (c 0,35; EtOH)
13	1 <i>R</i> ,8 <i>S</i>	90	+24,7 (<i>c</i> 1; MeOH)		S	96	+11,8 (<i>c</i> 0,5; EtOH)
15	1 <i>R</i> ,8 <i>S</i>	93	+19,8 (c 0,35; MeOH)	28	R	92 ^c	-11,8 (c 0,5; EtOH)
	1 <i>S</i> ,8 <i>R</i>	99 ^c	-20,2 (c 0,35; MeOH)		S	97	+12,9 (<i>c</i> 1,9; EtOH)

5. táblázat. A továbbalakítások eredményezte enantiomerek fizikai jellemzői

Fontos megjegyezni, hogy az átalakítások során nem tapasztaltuk az enantiomerfeleslegek csökkenését. Az előállított enantiomerek fizikai jellemzőit a 7. táblázatban tüntettem fel. A táblázat jól példázza, hogy antipód enantiomerek ellentétes előjellel ellátott optikai forgatásai abszolút értékben jó egyezést mutatnak.

4.2.7. Diszkusszió

A β -laktámok N-hidroxi-metilezett és N-acetoxi-metilezett származékainak elkészítése, valamint a későbbiekben a hidroxi-, illetve acetoxi-metil csoportnak az eltávolítása egyszerű, következésképpen az enantiomertiszta β -laktámok és β -aminosavak, vagy származékaik előállítására kiválóan alkalmazható indirekt enzimes módszereket fejlesztettünk ki, részben a Nhidroxi-metilezett-származékaik aszimmetrikus O-acilezésén, részben pedig a megfelelő észter enantioszelektív hidrolízisén keresztül. A módszert több esetben méretnöveltük, több-grammos (3–3 g) tételben állítottuk elő, pl. az Anatoxin-*a* intermediereit. Ugyanakkor, a β -laktám enantiomerekből értékes enantiomertiszta β -aminosavakat (ciszpentacin) és észtereket szintetizáltunk. Az indirekt enzimes módszer kevésbé hatékony és hosszabb út mind a β -laktám, mind pedig a β -aminosav enantiomerek előállítására, mint a későbbiekben bemutatásra kerülő direkt enzimes eljárások, ugyanakkor lehetőséget nyújt a β -laktám mindkét enantiomerjének párhuzamos előállítására. A módszer egy másik hátránya, hogy az enzimes reakciókban keletkezett termék alkohol és észter β -laktám enantiomerek szétválasztása oszlopkromatográfiásan történik.

A N-hidroxi-metilezett β -laktámok aszimmetrikus acilezésére, valamint O-acilezett származékaik hidrolízisére használt PS lipáz, jóllehet a királis centrum 3-atomnyi távolságra van az aktív OH csoporttól, jó \rightarrow kiváló enantioszelektivitással (az *E* általában > 100) katalizálta mind az egyszerűbb, mind pedig a térigényesebb karbociklusos, valamint aciklusos N-hidroxi-metilezett β -laktámok rezolválását. A rezolválások során keletkezett enantiomerek abszolút konfigurációját minden esetben meghatároztuk és megállapítottuk, hogy a PS lipáz *S*-szelektivitással katalizálta a karbociklusos és *R* szelektivitással az aciklusos β -laktámok primer OH-jának acilezését, a Kazlauskas féle empirikus levezetéssel egyezést mutatva. Ellentmondásosnak tűnhet, hogy a korábbiakban végzett intézeti kutatás eredményeként megállapították, hogy a 3,4-benzo-6-(hidroxi-metil)-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on VB-tal történő acilezését a PS lipáz *R*szelektivitással katalizálta²⁵¹, azonban ez a látszólagos ellentmondás ellenére a PS lipáz enantiopreferenciája minden esetben ugyanaz, a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek

prioritási sorrendje változik. Ezt támasztja alá a gyorsan reagáló hidroxi-metilezett β -laktám enantiomerek {(1*R*,5*S*)-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on²¹⁷, (1*R*,6*S*)-5, (1*R*,8*S*)-14, (1*R*,5*R*)-3,4-benzo-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on²⁵¹, (1*R*,12*S*)-13-aza-biciklo[10.2.0]tetradekán-14-on²⁵² és (*R*)-20} térszerkezeteinek (CS Chem 3D 6.0) a PS lipáz sematikus aktív centrumába történő lehetséges illeszkedése (24. ábrán).



24. ábra

A szerin hidrolázok ismert ping-pong bi-bi mechanizmusnak megfelelően, az általunk vizsgált karbociklusos N-hidroxi-metilezett β -laktámok PS-lipáz-katalizált *S*-szelektív acilezésének mechanizmusát a (±)-**2** esetében, a 25. ábrán mutatom be. Első lépésben (**A**) a szerin hidroxil nukleofil-támadása zajlik az acildonorként használt VA vagy VB karbonil C atomjára és keletkezik az első tetrahedrális intermedier (TI¹), amely a **B** úton, a vinil-alkohol képződése (acetaldehiddé tautomerizál, így mintegy gátat emel a nem kívánt észterezési reakcióknak) mellett, az acil-enzim intermedier (kovalens bekötés) képződéséhez vezet. Következik a *"jól illeszkedő"*, gyorsan reagáló szubsztrát enantiomer [(1*R*,6*S*)-**2**] hidroxiljának nukleofil-támadása (**C**) és létrejön egy újabb tetrahedrális intermedier (TI²), amely az enzim szabaddá válásával egyidőben a termék enantiomert [(1*R*,6*S*)-**5**] eredményezi (**D**).



4.3. Direkt enzimes módszerek

4.3.1. Laktámok enantioszelektív gyűrűnyitása

Új, igen hatékony lipáz-katalizált módszert dolgoztunk ki, amellyel a nem aktivált, mind aliciklussal kondenzált, mind pedig aciklusos β -laktámok N1-C2 kötésének nukleofilekkel, szerves közegben történő enantioszelektív hasítását megvalósíthattuk, azaz olyan módszert, amely a kívánt β -aminosav és β -laktám enantiomerek hatékony, egy lépésben történő előállítását biztosította (26. ábra).



26. ábra

4.3.1.1. Nem aktivált β-laktámok enantioszelektiv gyűrűnyitása nukleofilekkel szerves közegben [5]

Az első próbálkozásokhoz választott modell-vegyületeink a már korábban, N-hidroxi-metilezett származékaikon keresztül rezolvált, két karbociklusos $[(\pm)-11, (\pm)-12]$ [1] és két aril-szubsztituált $[(\pm)-25, (\pm)-26] \beta$ -laktámok [3] voltak (27. ábra).

A munka tervezésében és kivitelezésében nem támaszkodhattunk irodalmi tapasztalatokra, jóllehet laktamázokkal a laktámok N1-C2 kötésének vizes közegű hasítását leírták²²⁰, lipázokkal ezidáig nem kísérleteztek. Mégis, amint azt az *Előzményekben* (4.1. pont alatt) jeleztem, található példa az irodalomban laktámgyűrű lipáz vagy észteráz jelenlétében történő felnyilására²⁴⁷.



27. ábra

Előkísérletek (enzim-, nukleofil-, oldószer-, additív-, hőmérséklet-vizsgálat)

A (\pm)-**12** gyűrűnyitására tett első kísérleteinket vízben, 60 °C-on, mintegy 15, a kereskedelemben kapható lipáz, észteráz és proteáz (20 mg mL⁻¹) kipróbálásával végeztük. Az enzimek nagytöbbsége katalizálta a hidrolízist de nem mutatott enantioszelektivitást. Az egyetlen kivétel ez alól a CAL-B lipáz volt, amelyik csekély enantioszelektivitást mutatott (8. táblázat, 1. sor).

Az enantioszelektivitás növelése céljából, áttértünk a hidrolízisről az alkoholízisre, azaz a vizes közeget toluolra cseréltük és nukleofilként víz helyett etanolt használtunk. Az enantioszelektivitás értéke jelentősen javult, azonban a reakció sebessége drasztikusan lecsökkent (2. sor). Amikor hosszabb C-láncú, valamint halogén tartalmú primer alkoholokkal végeztük a reakciókat, a reakciók sebessége megnőtt (7–15-szörösére), az *E* csökkenése nélkül (3–5. sorok). Szekunder és tercier alkoholok is kipróbálásra kerültek (6–12. sorok) és nem kis meglepetésünkre, a 2-oktanol bizonyult mind az *E*, mind pedig a reakciósebesség szempontjából optimálisnak (8. sor).

dc_6_10

Sor	CAL-B (mg mL ⁻ 1)	Oldószer:R'OH (15:1, v/v)	Reakció- idő (h)	ee _s (%)	ee _p (%)	Konv. (%)	Ε
1	20	H ₂ O	72	32	57	36 ^b	5
2	20	toluol:CH ₃ CH ₂ OH	44	2	>95	2	>40
3	20	toluol:CH ₃ (CH ₂) ₆ OH	44	16	>95	14	>46
4	20	toluol:CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OH	44	43	>95	31	>60
5	20	toluol:Cl ₃ CCH ₂ OH	44	18	>95	16	>47
6	20	toluol:(CH ₃) ₃ COH	46	16	>95	14	>45
7	20	toluol:(CH ₃) ₂ CHOH	48	3	>95	3	>40
8	20	toluol: CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	44	48	>95	34	>63
9	20	toluol:C ₆ H ₅ CH(CH ₃)OH	46	24	>95	20	>49
10	20	toluol:(ClCH ₂) ₂ CHOH	44	1	19	5	~1
11	20	toluol:(BrCH ₂)(CH ₃ CH ₂)CHOH	44	racém	racém	36	1
12	20	toluol:C ₆ H ₅ OH	44	ne	m tapasztal	ható reak	ció
13	20	<i>i</i> Pr ₂ O:CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	44	53	>95	36	>66
14	30	iPr ₂ O:CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH + Et ₃ N	43	71	>95	39	>73
15	10	<i>i</i> Pr ₂ O:CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	43	17	>95	15	>46
16	10	<i>i</i> Pr ₂ O:CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	$40^{\rm c}$	36	>95	28	>56
17	10	<i>i</i> Pr ₂ O:(+)-CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	$40^{\rm c}$	37	>95	28	>56
18	10	<i>i</i> Pr ₂ O:(-)-CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(CH ₃)OH	$40^{\rm c}$	37	>95	28	>56
^a 0,05	M szubsztrá	t, 60 °C. ^b 1H-NMR. ^c 70 °C.					

8. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a (±)-12 CAL-B-katalizált gyűrűnyitása során^a

Amikor a reakciót a korábbi körülmények közt, toluol helyett MeCN-ben, THF-ban vagy CH₂Cl₂-ban végeztük, a reakció rendkívül lassúnak (*konv*. = 1–2% 24 óra után), míg *i*Pr₂O-ben enyhén gyorsabbnak (13. sor vs 8. sor) bizonyult. A katalitikus mennyiségű Et₃N reakcióelegyhez történő hozzáadása nem hozott szignifikáns reakciósebességbeli különbséget, a hiányában végzett reakció sebességével összehasonlítva (14. sor vs 13. sor). A racém, valamint enantiomertiszta 2-oktanollal végzett reakciók szintén azonos eredményeket mutattak (16–18. sorok).

A további optimalizálás céljából következett a hőmérséklet enantioszelektivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata (9. táblázat). Amikor a (\pm)-**12** CAL-B-katalizált, racém 2-oktanollal, *i*Pr₂O-ben végzett alkoholízisét 7–8 °C-on végeztük (1. sor), gyakorlatilag nem tapasztaltunk reakciót, míg a 35–50 °C között végzett reakciók (1–4. sorok) esetében tapasztalt enantioszelektivitás és reakciósebesség jóval alacsonyabbnak bizonyult, mint az 55–75 °C-on (5–8. sorok) végzett reakciók esetében. Mivel a 80 °C-on végzett reakció újra gyenge enantioszelektivitást mutatott (9. sor), a gramm-mennyiségű rezolválásokat CAL-B katalízissel, racém 2-oktanollal, *i*Pr₂O-ben, 60

°C-on végeztük A (±)-11, (±)-25 és (±)-26 laktámok gyűrűnyitását is elvégeztük 60 °C-on (10–12. sorok), minden esetben kiváló enantioszelektivitás ($E \ge 100$) jellemezte a reakciókat.

Sor	Racemát	T (°C)	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Konv. (%)	Ε
1	(±)- 12	7–8	nem te	apasztalhat	ó reakció	
2	(±)- 12	35	5	~48	9	~3
3	(±)- 12	40	7	~55	11	~4
4	(±)- 12	50	18	~72	20	~7
5	(±)- 12	55	20	>99	17	>200
6	(±)- 12	60	40	>99	29	>200
7	(±)- 12	70	67	>99	40	>200
8	(±)- 12	75	72	>99	42	>200
9	(±)- 12	80	88	~70	56	~16
10	(±)- 11	60	82	>95	46	>100
11	(±)- 25	60	96	>95	50	>154
12	(±)- 26	60	83	>95	47	>102

9. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a hőmérséklet függvényében

Molekula-modellezés

A CAL-B laktámok gyűrűnyitása során tanúsított aktívitásának és enantioszelektivitásának, valamint a 2-oktanol kritikus szerepének megmagyarázása céljából, számítógépes modellezést végeztünk a 4-fenil-2-azetidinon gyűrűnyitására [(±)-**25**]. Feltételeztük, hogy a β -laktámok alkoholokkal történő átésztereződési reakciói két lépésben mennek végbe, első lépésben az általunk enantiodiszkriminatívnak vélt β -laktám gyűrűnyitása (i), majd második lépésben (ii) az acil-enzim intermedier, aminoészter terméket eredményező deacilezése (28. ábra).



28. ábra

Következésképpen, a molekula-modellezést az első lépésre szűkítettük. Először, meghatároztuk a gyorsan reagáló *R*-**25** aktív centrumba való illeszkedésének megfelelő konformációt, majd a modellezést foszfonáttal, mint a Ser laktám karboniljára történő támadásának eredményeként létrejövő tetrahedrális intermedier analóggal végeztük. A tetrahedrális intermedier két lehetséges

konformációt (**a** és **b**) mutatott (külömbség csak a laktámgyűrű relativ torzulásában van), azonban egyik konformáció sem teljesítette az "összes" H-kötés létrejöttének feltételét (29. ábra). Az **a** esetben (konformáció 1) a laktám amidja a His²²⁴ fele mutat, a foszfonil O-je (a tetrahedrális intermedier oxianionja) és Gln¹⁰⁶ N-H közötti "*c*" H-kötés létrejöttének feltétele nem teljesül (kötés távolsága 3,37 Å szemben a max. ~ 3,2 Å, H-kötés létrejöttének követelményével). Mi több, a fenil-szubsztituens sztérikusan "ütközik" az Ile²⁸⁵-el. A **b** esetben (konformáció 2), jóllehet sztérikusan jól illeszkedne az enantiomer az aktív centrumba, a "*b*" H-kötés létrejöttének feltétele itt sem teljesül (His²²⁴ N_ɛ-H és laktám N-je közötti kötéstávolság 3,37 Å). A "*b*" H-kötés hiánya, a kémiai szempontból nem kívánatos, erősen bázikus RNH⁻ távozó csoportot eredményezné. Végül, katalitikusan kedvezményezett konformációként azt találtuk, hogy a reakció egy szokatlan átmeneti állapoton keresztül zajlik, amelyben szervesen részt vesz a 2-oktanol (vagy víz), azaz bekötődik a katalitikus His²²⁴ N_ɛ-H és a gyorsan reagáló (*R*)-laktám N-je közé, mintegy hídként helyettesítve a hiányzó, kulcsfontosságú hidrogénkötést (**c**).





Az A és B ábrázolásban a gyorsan (R-25) és a lassan (S-25) reagáló laktám enantiomerek javasolt tetrahedrális intermedier analógjai láthatók. Az R-25 aktív centrumba történő bekötődésére javasolt

konformáció (*A*) a 2-oktanol aktív részvételével ábrázolt **c** konformációnak felel meg. A felfele, olvasó irányába mutató fenil-gyűrű hidrofób kölcsönhatásban van a Ile^{189} , Ala^{141} és Thr^{138} aminosavakkal. A lassan reagáló *S*-**25** esetében nem tudtunk katalitikusan megfelelő szerkezetet megállapítani, így a *B* illusztráció nem egy energia-minimalizált struktúrát mutat be, azaz megfelel a konformáció 1-nek (**a**). Ugyanis, az energia-minimalizálás a fenil-gyűrű, nem reális, torzult geometriáját eredményezte, a sztérikusan vele "ütköző" Val¹⁹⁰ és Ile^{189} aminosavaknak köszönhetően.

Gramm-mennyiségű rezolválások

Az optimális körülmények között (8. és 9. táblázatok) elvégeztük a racém β -laktámok [(±)-**11**, (±)-**12**, (±)-**25** és (±)-**26**] gramm-mennyiségű rezolválásait, a jellemző adatokat a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat. A (±)-11, (±)-12, (±)-25 és (±)-26 gramm-mennyiségű gyűrűnyitása^a

	Termék β -aminosav							Szubsztrát β -laktám				
	Reakció- idő (h)	Konv. (%)	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_{\rm D}^{25}$ (H ₂ O)	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$		
(±)-11	44	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 8	11	97	+120 ^b	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 11	39	99 ^c	+161 ^c		
(±)-12	47	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 9	9	99	-39 ^d	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 12	42	99 ^c	-29 ^e		
(±)- 25	20	50	R- 29	11	96	$+6,8^{f}$	S-25	46	99 ^c	-139 ^g		
(±)- 26	48	50	<i>R-</i> 30	7	98	-8 ^h	S- 26	40	96	-121,9 ⁱ		
^a 0,5 g	szubsztrát	4 g C	AL-B, 80	mL 2-oktar	nol: <i>i</i> Pr	O (1:15,	v/v), 60 °C	, ${}^{b}c = 0,27.$	$c^{c} c = 0,$	29; CHCl ₃ .		

 ${}^{d}c = 0,5. {}^{e}c = 0,26$; CHCl₃. ${}^{f}c = 0,45. {}^{g}c = 0,19$; EtOH. ${}^{h}c = 0,1. {}^{i}c = 0,5$; EtOH.

A reakcióelegyből a gyűrűnyilt észtert nem tudtuk izolálni, feltételeztük, hogy részben polimerizálódott, részben pedig az enzim és oldószer víz tartalma miatt aminosavvá hidrolizált. Ez utóbbit támasztotta alá a kis mennyiségben izolált aminosav. A reakciókat 50%-os konverzió mellett igen nagy E jellemezte. A módszer hiányossága, hogy az izolált aminosavak habár 96% feletti *ee*-vel rendelkeztek, igen kis mennyiségben voltak izolálhatók.

4.3.1.2. Nem aktivált karbociklusos β-laktámok gyűrűnyitása vízzel szerves közegben [6–9]

Az előzőekben bemutatott direkt módszer a gyűrűnyilt termék alacsony termelése ($\leq 11\%$) miatt nem bizonyult alkalmasnak β -aminosav enantiomerek szintézisére (feltételeztük, hogy a termék észter polimerizált vagy a reakcióelegyben jelenlevő kis mennyiségű vizzel elhidrolizált), így

újraterveztük munkánkat, a hangsúlyt a szerves közegű enzimes hidrolízis kidolgozására fektettük. Modell vegyületeink, az értékes aminosvakat [köztük pl. a ciszpentacin, benzociszpentacin) eredményező karbociklusos (±)-10–(±)-12, (±)-15 és (±)-31–(±)-39 β -laktámok (30. ábra) voltak.



A telített modell vegyületeink a nem aktivált 5,6,7 és 8-tagú aliciklussal kondenzált (±)-**10** és (±)-**31**–(±)-**33** β -laktámok voltak. Az optimalizált lipáz-katalizált módszert (31. ábra, [6]) többek között a ciszpentacin [1*R*,2*S*-**40**·HCl] előállítására méretnöveltük.



Mivel érdeklődésünk középpontjában állt a ciszpentacin, ezért a korábbiakban laktámok gyűrűnyitására kidolgozott direkt enzimes stratégia mintájára, módszert optimalizáltunk az új, 1,4-etil [(1S,2R,3S,4R)-**43**] és 1,4-etilén [(1R,2R,3S,4S)-**44**]-áthidalt ciszpentacin származékok enantiomertiszta formában történő előállítására (32. ábra, [7]).





Hatékony és egyszerű, direkt enzimes utat dolgoztunk ki a telítetlen karbociklusos β -aminosavak [(1*R*,2*S*)-**8**,**9**,**45**,**46**] és el nem reagált β -laktám enantiomerek szintézisére is, a megfelelő telítetlen β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül (33. ábra, [8]).



Az előzőekben vázolt, mono- és biciklusos β -laktámok lipáz-katalizált enantioszelektív gyűrűnyitási módszerének további alkalmazhatóságának kiszélesítéseként, triciklusos β -laktámok gyűrűnyitási lehetőségeit vizsgáltuk és igen hatékony módszert optimalizűltunk az 1-aminoindán-2-karbonsav [(1*R*,2*R*)-**47**·HCl, benzociszpentacin], és 6- ill. 7-tagú új homológjainak enantiomertiszta formában történő előállításán (34. ábra, [9]).



34. ábra

A termék aminosav és elreagálatlan laktám enantiomerek szétválasztását, az indirekt módszereink eredényezte termékek szétválasztására alkalmazott oszlopkromatografálás helyett, minden esetben rendkívűl egyszerűen, szerves-vizes extrakcióval vagy szűréssel végeztük.

Előkísérletek (enzim-, vízmennyiség-, oldószer-, hőmérséklet-, enzimmennyiségvizsgálat)

Előkísérleteket minden szubsztrát csoport esetében végeztük, az aktuális munkát megelőző laktám gyűrűnyitásával kapcsolatos tapasztalataink felhasználásával. Valamennyi vizsgált β -laktám gyűrűnyitása kiváló enantioszelektivitást mutatott, amikor a hidrolízist 1 ekv. vízzel, CAL-B lipáz (30 vagy 50 mg mL⁻¹ Chirazyme L-2, Novozym 435 vagy Lipolase) jelenlétében, *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végeztük (11. táblázat, 1., 3., 5. 9., 13. és 15. sorok).

11. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a modell β -laktámok gyűrűnyitására használt legígéretesebb enzimek függvényében^a

Enzim	Racemát	T (°C)	Reakció- idő (h)	ee _s (%)	ee_p (%)	Konv. (%)	Ε	Sor
	(\pm) -32 ^b	60	20	67	>95	41	>78	1
CAL-B	(\pm) -38°	50	15	10	>99	9	>200	2
(Chirazyme L-2)	(±)- 38 ^c	60	15	32	>99	24	>200	3
	(\pm) -38°	70	15	37	>99	27	>200	4
CAL-B (Novozym 435)	(±)- 32 ^b	60	20	63	>95	40	>74	5
	$(\pm)-32^{d}$	60	23	69	>95	42	>80	6
	$(\pm)-32^{c}$	60	23	75	>95	44	>88	7
	$(\pm)-32^{e}$	60	23	80	>95	46	>96	8
	$(\pm)-32^{b}$	60	23	93	>95	48	>133	9
	(\pm) -32 ^f	60	20	94	>95	50	>139	10
	$(\pm)-12^{b}$	25	16	11	>99	10	>200	11
CAL-B (Lipolase)	$(\pm)-12^{b}$	40	16	42	>99	30	>200	12
(Lipoluse)	$(\pm)-12^{b}$	60	16	95	>99	49	>200	13
	$(\pm)-12^{b}$	70	5	99	>99	50	>200	14
	(±)- 35 ^b	60	96	27	>95	22	>50	15
	$(\pm)-35^{b}$	65	96	33	>95	26	>53	16
	(±)- 35 ^b	70	96	41	>95	30	>58	17
	(±)- 38 ^c	60	15	29	>99	23	>200	18
	(±)- 32 ^b	60	20	18	>95	14	>47	19
	(±)- 38 °	60	15	nem	tapasz	talható r	eakció	20

^a0,05 M szubsztrát, 1 ekv H₂O, *i*Pr₂O. ^b50 mg mL⁻¹ enzim. ^c30 mg mL⁻¹ enzim. ^d20 mg mL⁻¹ enzim. ^e40 mg mL⁻¹ enzim. ^f75 mg mL⁻¹ enzim.

A (±)-**32** gyűrűnyitását a CAL-A is enantioszelektíven katalizálta (19. sor), azonban a reakció sebessége jelentősen elmaradt a Lipolase-katalizált, hasonló körülmények között végzett reakcióéhoz képest (9. sor). Valamennyi vizsgált szubsztrát esetében megállapítottuk, hogy a hőmérséklet emelésével nőtt a reakciók sebessége, az *E* értékek pedig nem csökkentek (2–4., 11–14. és 15–17. sorok). Ugyanakkor megjegyzem (nincs adat feltüntetve), hogy a Celitre, általunk immobilizált PS, AK és AY, valamint PPL egyik szubsztrát esetében sem katalizálták a gyűrűnyitást.

A reakcióelegyhez hozzáadott víz mennyisége jelentős mértékben befolyásolta az enzim aktívitását (12. táblázat). A víz ennyiségének növelésével a reakciók sebessége csökkent, feltételeztük, hogy az enzim aggregációjának következtében egyre kevesebb aktív centrum vált a szubsztrát által elérhetővé. A (\pm)-**32** Chirazyme L-2-katalizált gyűrűnyitásának enantio-szelektivitása csak látszólag csökkent (1–6. sorok), a valóságban minden esetben 200 feletti volt. Az *E* értékek látszólagos csökkenése a kezdetben standard használattal számított termék aminosav enatiomerfeleslegek szórásából adódott, a későbbiekben azonban a termékek, dupla derivatizálással (4.4. pont alatt) meghatározott *ee* > 99%-os értékei visszaigazolást nyertek.

Racemát	Enzim	H ₂ O (ekv)	Reakció- idő (h)	ee _s (%)	ee_p (%)	Konv. (%)	Ε	Sor
		-	23	90	>95	49	>120	1
		1	20	89	>95	48	>117	2
(1) 27	CAL-B	2	23	82	>95	46	>99	3
(±)- 3 2	(CIIIIaZyIlle L-2) (50 mg mL ⁻¹)	3	23	73	>95	43	>85	4
	(00 mg m)	4	23	40	>95	30	>57	5
		10	23	14	>95	13	>44	6
		-	15	32	>99	24	>200	7
	CAL-B	1	15	32	>99	24	>200	8
	(Chirazyme L-2) (30 mg mL ⁻¹)	2	15	23	>99	19	>200	9
(±)- 38		4	15	12	>99	11	>200	10
	CAL-B	-	15	31	>99	24	>200	11
	(Lipolase)	1	15	29	>99	23	>200	12
	(30 mg mL^{-1})	2	15	20	>99	17	>200	13

12. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a modell β-laktámok lipáz-katalizált, 60 °C-on végzett gyűrűnyitásához használt víz mennyiségének függvényében^a

^a0,05 M szubsztrát, Lipolase, *i*Pr₂O, 60 °C. ^b50 mg mL⁻¹ enzim. ^c30 mg mL⁻¹ enzim.

Észrevettük, hogy a nukleofil szerepét betöltő víz hozzáadása nélkül (1., 7. és 11. sorok) is lejátszódtak a hidrolitikus reakciók, sőt ugyanolyan gyorsan, mint az 1 ekv. víz hozzáadásával, az

enzim felületén (<5%) és a *i*Pr₂O-ben (< 0,1%) jelenlevő víz kulcsfontosságú szerepének köszönhetően. Ez az észrevétel azt is megválaszolta, hogy miért izoláltunk aminosavat a β -laktámok alkoholokkal történő alkoholízise (4.3.1.1. pont alatt) esetében. A gramm-mennyiségű rezolválásokat 1 ekv. víz hozzáadásával végeztük.

Az oldószernek az enantioszelektivitásra és reakciósebességre gyakorolt hatásának vizsgálata során, az éter-típusú oldószerek mellett egyaránt kipróbálásra kerültek hidrofil és hidrofób oldószerek (13. táblázat), azonban a legnagyobb *E* értékeket és reakciósebességeket továbbra is a iPr_2O biztosította.

Racemát	Oldószer	Reakció- idő (h)	ee _s (%)	ee_p (%)	Konv. (%)	Ε	Sor
	Me ₂ CO	42	<5	>95	< 5%	>40	1
	THF	42	<5	>95	< 5%	>40	2
(±)- 32	<i>i</i> Pr ₂ O	20	88	>95	48	>114	3
	<i>n</i> -hexán	22	84	>95	47	>104	5
	toluol	41	56	>95	37	68	6
	Me ₂ CO	72	nen	n tapaszt	alható re	akció	7
	THF	72	nen	n tapaszt	alható re	akció	8
	Et_2O	72	49	> 99	33	>200	9
(±)- 38	t-amil-alkohol	72	nen	n tapaszt	alható re	akció	10
	<i>i</i> Pr ₂ O	72	75	> 99	44	>200	11
	toluol	72	44	> 99	31	>200	12
	<i>n</i> -hexán	72	nen	n tapaszt	alható re	akció	113

13. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a modell β-laktámok Lipolase-katalizált, 60 °C-on, 1 ekv vízzel, különböző oldószerekben végzett gyűrűnyitása esetében^a

^a0,05 M szubsztrát, Lipolase, *i*Pr₂O, 60 °C. ^b50 mg mL⁻¹ enzim. ^c30 mg mL⁻¹ enzim.

méretnöveltük.

4.3.1.3. Nem aktivált karbociklusos β-laktámok gyűrűnyitása oldószer nélkül [10]

A "zöld kémia" jegyében, azaz az enantiomertiszta termékek környezetbarát úton történő előállítására való törekvéseknek megfelelően, oldószer nélküli enzimes rezolválásokat dolgoztunk ki. Modell vegyületeknek, a többségükben már korábban vizsgált β -laktámokat [(±)-10, (±)-12, (±)-31 és (±)-34–(±)-38] választottuk és a CAL-B-katalizált egyszerű és hatékony, de főleg környezetbarát, enantioszelektív hidrolízisüket, oldószer nélküli rendszerre optimalizáltuk. A módszert, három szubsztrát [(±)-35, (±)-36 és (±)-47] esetében (35. ábra), sikeresen



35. ábra

Előkísérletek (rázógép vagy ultrahang fürdő, hőmérséklet-, enzimmmennyiség-, enzim újra felhasználás-vizsgálat)

Mivel a telítetlen (±)-**36** szerves közegű, enantioszelektív gyűrűnyitása (CAL-B, 1 ekv. víz, *i*Pr₂O, 60 °C) sokkal gyorsabbnak (*konv.* = 50% 5 óra után) bizonyult, mint a telített analóg (±)-**10** esetében (*konv.* = 50% ~10 nap után), ezért az oldószer nélküli előkísérletekhez a (±)-**36** laktámot választottuk. A (±)-**36** CAL-B-katalizissel, oldószer nélkül, 60 °C-on végzett hidrolízise (0,5 ekv. vízzel) kiváló enantioszelektivitással és hasonló sebességgel (14. táblázat, 2. sor) ment végbe, mint a hasonló körülmények közt, de *i*Pr₂O-ben végzett reakció (*konv.* = 51% 5 óra után, *E* > 200, [8]).

Sor	T (°C)	Reakció- idő (h)	ee_{s} (%)	$ee_{p}(\%)$	Konv. (%)	Ε
1	50	3	44	>99	31	>200
2	60	3	66	>99	40	>200
3	70	3	88	>99	47	>200
4	70 ^b	2,5	83	>99	45	>200
5	80	3	94	>99	49	>200

14. táblázat. A hőmérséklet (±)-36 gyűrűnyitására gyakorolt hatása^a

^a0,1 mmol szubsztrát, Lipolase (50 mg), H₂O (0,5 ekv.). ^bultrahang készülék (35 kHz).

Magasabb hőmérsékleten végezve a reakciót (70, ill. 80 °C), jelentős reakciósebességbeli növekedést tapasztaltunk (3. és 5. sorok). A 70 °C-on működő rázógép (210 rpm) használatával egyidőben, végeztünk egy-egy reakciót mágneses keverőn és ultrahangos vízfürdőben (35 kHz). A mágneses kevertetés során a mágnes a granulált CAL-B enzimet összetörte, jelentősen csökkentve az enzim aktivitását (nincs adat feltüntetve), azonban mind a rázógépben, mind pedig az ultrahangos kádban végzett hidrolízis során kiváló *E* mellett, hasonlóan jó reakciósebességeket (3. és 4. sorok) kaptunk.

Mivel az enzim:szubsztrát kevéssé gazdaságos 4:1 tömegarányának 2:1-re történő optimalizálása jelentős reakciósebességbeli csökkenést eredményezett a 60 °C-on végzett próbálkozások esetében (3 óra után a konverzió = 25% vs 14. táblázat, 2. sor), ezért az enzim mennyiségének csökkentése helyett az újrafelhasználhatóságára fektettük a hangsúlyt (15. táblázat). Az enzim katalitikus aktívitása az enzim többszöri újrafelhasználásával fokozatosan csökkent, azonban a termék enantiomerfeleslege nem változott.

15. táblázat. A konverzió és E alakulása a (±)-36 újrafelhasznált CAL-B-katalizált gyűrűnyitása során^a

Sor	Lipolase (50 mg)	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Konv. (%)	Ε
1	egyszer használt	78	>99	44	>200
2	kétszer használt	63	>99	39	>200
3	háromszor használt	53	>99	35	>200
4	négyszer használt	40	>99	29	>200

^a0,1 mmol szubsztrát, H₂O (0,5 ekv.), 70 °C, 3 h után.

A (±)-**36** oldószer nélküli gyűrűnyitására optimalizált körülmények közötti módszert a többi szubsztrát gyűrűnyitására is kipróbáltuk (16. táblázat)

Sor	Szubsztrát	Reakcióidő	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Konv. (%)	E
1	(±)-10	19 h (5 nap)	33 (98)	>99 (>99)	25 (50)	>200 (>200)
2	(±)- 12	5 h	95	>99	49	>200
3	(±)- 31	19 h (5 nap)	27 (98)	>99 (>99)	21 (50)	>200 (>200)
4	(±)- 34	5 nap	65	>99	40	>200
5	(±)- 35	4 nap	>99	>99	50	>200
6	(±)- 37	5 nap	83	>99	46	>200
7	(±)- 38	4 nap	94	>99	49	>200
8	(±)- 47	19 h	72	>99	42	>200

16. táblázat. A konverzió és *E* alakulása a (±)-**10**, (±)-**12**, (±)-**31**, (±)-**34**, (±)-**35**, (±)-**37**, (±)-**38** és (±)-**47** oldószer nélküli, CAL-B-katalizált gyűrűnyitása során^a

^a0,1 mmol szubsztrát, Lipolase (50 mg), H₂O (0,5 ekv.), 70 °C.

Valamennyi esetben kiváló enantioszelektivitást tapasztaltunk, igen különböző reakciósebességek mellett (valószínű a karbociklusok különböző konformációinak köszönhetően). Meglepő volt, hogy a 4-es pozícícóban, jelentősen lipofil és nagy térkitöltésű *t*-butil csoportot tartalmazó, korábbiakban nem vizsgált (\pm)-**47** esetében is kiváló enantioszelektivitást (*E* > 200) kaptunk.

4.3.1.4. Nem aktivált karbociklusos *transz β*-laktámok gyűrűnyitása vízzel szerves közegben [11]

Elsőként tettük fel és válaszoltuk meg azt a kérdést, hogy vajon a lipázok katalizálják-e a *transz* β -laktámok gyűrűnyitását. Hatékony és egyszerű enzimes eljárást adtunk meg nagy gyűrűtagszámú (12-es) racém *cisz*- [(±)-**52**] és racém *transz*-13-aza-biciklo[10.2.0]tetradekán-14on [(±)-**54**] szerves közegű enantioszelektív gyűrűnyitására (36. ábra).





Előkísérletek (vízmennyiség-, hőmérséklet-vizsgálat)

Előkísérleteinket a korábbi, valamennyi racém *cisz* β -laktám enantioszelektív gyűrűnyitását kiváló enantioszelektivitással (E > 200) katalizáló CAL-B enzimmel (50 mg mL⁻¹), *i*Pr₂O-ben végeztük. A nukleofil mennyiségének változtatása (0; 0,5 és 1 ekv. hozzáadott víz) sem a reakciók enantioszelektivitásban (E > 200), sem pedig a sebességekben (*konv.* ~45% 8 óra után a (±)-**52** esetében; *konv.* ~49% 137 óra után a (±)-**54** esetében) nem eredményezett szignifikáns különbségeket. Amikor a reakcióidők csökkentése céljából a gyűrűnyitásokat 60 helyett 70 °C-on hajtottuk végre, a reakciósebesség a (±)-**54** esetében megnőtt (91 óra alatt érte el az 50%-os konverziót a korábbi 137 óra helyett), míg a (±)-**52** esetében nem idézett elő változást (*konv.* = 50% 18 óra után). Megjegyzem, hogy az enantioszelektivitás a hőmérséklet emelésével nem csökkent (E > 200).

4.3.1.5. A 4-aril- és 4-arilalkil-szubsztituált β-laktámok gyűrűnyitása vízzel, szerves közegben [12,13]

Direkt enzimes módszert dolgoztunk ki β -arilalkil-szubsztituált β -aminosavak előállítására a megfelelő 4-aril- [(±)-**54**–(±)-**60**)], ill. 4-arilalkil- [(±)-**68** és (±)-**69**)] szubsztituált β -laktámok lipáz-katalizált, 60 °C-on végzett enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül (37. ábra). A 4-benzilés 4-fenil-etil-2-azetidinonok [(±)-**66** és (±)-**67**] kivételével valamennyi, CAL-B-katalizált *R*szelektív rezolválást kiváló enantioszelektivitás (E > 200) jellemezte. A (±)-**66** és (±)-**67** CAL-Bkatalizált *S*-szelektív gyűrűnyitását, az optimalizálások ellenére is alacsony *E* értékeknek (~ 12) köszönhetően, két lépésben, 45 °C-on végeztük és kaptuk jóllehet alacsonyabb termelésekkel (≥ 27), de jónak mondható enantiomerfeleslegekkel (*ee* ≥ 89) a kívánt termékeket.





Előkísérletek (enzim-, vízmennyiség-, oldószer-, additív-, enzimmennyiség-vizsgálat)

A korábbiakban, karbociklusos β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására kidolgozott enzimes módszer optimális körülményei (CAL-B, 0–1 ekv víz, *i*Pr₂O, \geq 60 °C) mellett, az aciklusos (±)-**25** rezolválását a rendelkezésünkre álló, valamennyi lipázzal kipróbáltuk. Míg gyakorlatilag nem tapasztaltunk reakciót a PS, AK, AY és CAL-A lipázok jelenlétében, 45 °C-on (24 óra után nem volt termék kimutatható), addig a CAL-B különböző immobilizált formái (Lipolase, Chirazyme L-2 és Novozym 435) csekély reakciósebességbeli különbségekkel (*konv.* = 24–28% 1 óra után), de kiváló enantioszelektivitással (*E* > 200) katalizálták a 60 °-on, 1 ekv vízzel, *i*Pr₂O-en végzett gyűrűnyitási reakciókat.

Amikor a iPr_2O -t (CH₃)₂CO-al, MeCN-el, 1,4-dioxánnal, *t*-amil-alkohollal, THF-al vagy CHCl₃al helyettesítettük, a továbbra is enantioszelektív reakciók (E > 200) rendkívül lelassultak (*konv*.

= 1-2% 24 óra után). A toluolban végzett reakció viszont, kiváló enantioszelektivitás (E > 200) mellett, szintén ígéretes reakciósebességgel zajlódott (*konv.* = 22% 2 óra után, E > 200).

A reakció sebességének növelése céljából különböző adalékanyagok (1 ekv. 2-oktanol vagy Et_3N , vagy *i* Pr_2EtN) reakcióelegyhez történő hozzáadásával próbálkoztunk, azonban az 1 óra utáni konverzió értékek közel azonosak voltak (24–26%), sőt megegyeztek a víz hozzáadása nélkül vagy 1 ekv. víz hozzáadásával végzett reakciók konverziójával.

Az enzim mennyiségének növelésével (10-75 mg mL⁻¹) ötszörös reakciósebesség növekedést értünk el (17. táblázat). A legjobb eredmény (6. sor) ellenére, a további előkísérleteket és grammmennyiségű rezolválásokat, gazdaságossági okokból 75 mg mL⁻¹ helyett 30 mg mL⁻¹ mennyiségű enzimmel végeztük.

17. táblázat. A CAL-B (Lipolase) mennyiségének reakciósebességre gyakorolt hatása a (±)-**25** gyűrűnyitása során^a

Sor	Lipolase (mg mL ⁻¹)	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	<i>Konv.</i> (%)	E
1	10	9	>99	8 (49, 41 h után)	>200
2	20	16	>99	14	>200
3	30	20	>99	17	>200
4	40	28	>99	22	>200
5	50	31	>99	24	>200
6	75	47	>99	32	>200

Elvégeztük a (±)-**26** és (±)-**56**–(±)-**60** gyűrűnyitási reakcióit a (±)-**26** vegyületre optimalizált körülmények között [Lipolase (30 mg mL⁻¹), víz (1 ekv), *i*Pr₂O, 60 °C] és szintén kiváló enantioszelektivitást kaptunk (> 200). A 4-benzil- [(±)-**66**] és 4-feniletil- [(±)-**67**)] szubsztituált β -laktámok, optimalizált körülmények között végzett gyűrűnyitását azonban alacsony enantioszelektivitási értékek ($E \sim 12$) jellemezték. Így a (±)-**67** esetében további előkísérleteket végeztünk. Sajnos sem az enzim (PS, AK, AY, Lecitase, PPL, CAL-A), sem az oldószer [(CH₃)₂CO, THF, CHCl₃), sem a hőmérséklet (30, 40, 45, 50, 60 °C) változtatása, sem pedig az adalékanyagok (2-oktanol, Et₃N, *i*Pr₂EtN) reakcióelegyhez történő hozzáadása nem eredményezett enantioszelektivitásbeli pozitív változást ($E \sim 10$). Mivel különböző N-Boc-védett karbociklusos β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitását leírták az irodalomban²⁵³, így előállítottuk a N-Boc-(±)-**67** szubsztrátot, majd indítottunk egy Lipolase (50 mg mL⁻¹)-katalizált

reakciót (*i*Pr₂O-ben, 45 °C-on). Jóllehet gyors, de igen csekély enantioszelektivitást mutató átalakulást (*konv.* = 94% 24 óra után, E = 3) tapasztaltunk.

4.3.1.6. Nitrogénen védett és nem védett *p*laktámok enantioszelektiv gyűrűnyitása [14,15]

Eljárást dolgoztunk ki karbociklusos, a nitrogénen védett, mind pedig a nem védett *cisz* γ aminosavak [pl. a blockbuster Abacavir és Carbovir egyik szintézisének kulcs-intermedierje, (1*S*,4*R*)-**74**] és származékaik enantiomereinek és ezek sóinak előállítására a megfelelő γ -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül (38. ábra). A módszerünk egyik előnye, hogy a nehezen hozzáférhető laktamáz enzimek helyett a kereskedelemben könnyen beszerezhető stabil, nagy sztereoszelektivitású és ipari méretű gyártásra alkalmazható lipáz enzimeket használ. Ugyancsak kiemelendő, hogy a szubsztrátot a nitrogénen nem szükségszerű védeni és hogy a nitrogénen nem védett termék γ aminosav és γ -laktám szétválasztása oszlopkromatografálás helyett egyszerűen, szűréssel történik.



Előkísérletek (enzim-, vízmennyiség-, oldószer-, hőmérséklet-, enzimmennyiség-, enzim újrafelhasználás-vizsgálat)

Amikor a (±)-**71**, β -laktámokhoz hasonló, de kevésbé feszült gyűrűjének nyitását a β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására leggyakrabban alkalmazott körülmények (Lipolase, víz, *i*Pr₂O, 60 °C) között végeztük, nem kis meglepetésünkre gyors és enantioszelektív reakciót tapasztaltunk (18. táblázat, 1. sor). Sőt, a β -laktámok gyűrűnyitását nem, vagy csak csekély mértékben katalizáló CAL-A, PPL, PS és AK lipázok is kiváló enantioszelektivitással és viszonylag jó reakciósebességgel (13–16. sorok) katalizálták a modell γ -laktám gyűrűnyitását.

A reakcióelegyhez hozzáadott víz mennyisége, a korábbi tapasztalatainkkal jó egyezést mutatva, jelentősen befolyásolták a Lipolase enzim aktívitását; az optimális reakciósebességet 0,5 ekv. vízzel tapasztaltuk (18. táblázat, 2. sor). Ahogy növeltük a reakcióelegyhez adott víz

mennyiségét, csökkent a reakciók sebessége (4–6. sorok). A víz hozzáadása nélkül is lejátszódó reakció (3. sor), ahogy a korábbiakban is tapasztaltuk, az enzim felületén jelenlevő víznek volt köszönhető.

A hőmérséklet jelentősen befolyásolta, a kiváló enantioszelektivitással (E > 200) zajlódó (±)-**71** Lipolase-katalizált, *i*Pr₂O-ben végzett hidrolízisének (0,5 ekv. víz) sebességét (18. táblázat, 2. és 7–10. sorok). A reakció 60 °C-on bizonyult a leggyorsabbnak, így a további előkísérleteket és preparatív-mennyiségű rezolválásokat ezen a hőmérsékleten végeztük.

Sor	Reakció- idő	Enzim (30 mg mL ⁻¹)	Т (°С)	H ₂ O (ekv.)	<i>ee</i> s (%)	ee_p (%)	Konv. (%)	E
1	140 min	Lipolase	60	1	72	> 99	42	> 200
2	140 min	Lipolase	60	0,5	> 99	> 99	50	> 200
	(50 min)				(34)	(>99)	(26)	(>200)
3	140 min	Lipolase	60	-	> 99	> 99	50	> 200
4	140 min	Lipolase	60	2	55	> 99	36	> 200
5	140 min	Lipolase	60	5	32	> 99	24	> 200
6	140 min	Lipolase	60	10	12	> 99	11	> 200
7	17 h	Lipolase	30	0.5	74	> 99	43	> 200
8	50 min	Lipolase	45	0.5	12	> 99	11	> 200
9	50 min	Lipolase	70	0.5	40	> 99	29	> 200
10	50 min	Lipolase	80	0.5	86	> 99	48	> 200
11	140 min	Chirazyme L-2	60	1	68	> 99	41	> 200
12	140 min	Novozym 435	60	1	65	> 99	40	> 200
13	64 h	Chirazyme L-5 ^b	60	1	17	> 99	15	> 200
14	64 h	PPL	45	1	25	> 99	20	> 200
15	64 h	PS lipáz ^b	45	1	11	> 99	10	> 200
16	64 h	AK lipáz ^b	45	1	16	> 99	14	> 200

18. táblázat. A konverzió és E alakulása a (±)-**71** gyűrűnyitása során^a

^a0,05 M szubsztrát, *i*Pr₂O, 60 °C. ^b20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében.

Az oldószer változtatásával jelentősen változott az enzim aktivitása, azaz változtak a reakciósebességek, az enantioszelektivitás azonban minden esetben 200 felett maradt. Jóllehet, a reakció mind *t*-BuOMe-ben, mind toluolban, mind pedig *n*-hexánban (19. táblázat, 5–7. sorok) gyorsabbnak bizonyult, mint *i*Pr₂O-ben (2. sor), mégis, a szubsztrát oldékonyságának függvényében a gramm-mennyiségű rezolválásokat *i*Pr₂O-ben végeztük.

Sor	Reakcióidő	Oldószer	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Konv. (%)	Ε
1	36 h	Me ₂ CO		nem tapaszta	lható reakció	
2	36 h	1,4-dioxán	28	>99	22	>200
3	36 h	THF	7	>99	7	>200
4	50 min	Et ₂ O	21	>99	18	>200
5	50 min	t-BuOMe	54	>99	35	>200
6	36 h	toluol	49	>99	33	>200
7	50 min	<i>n</i> -hexán	51	>99	34	>200
8	36 h	CH_2Cl_2	24	>99	20	>200

19. táblázat. Az oldószerek reakciósebességre gyakorolt hatása a (±)-**71** CAL-B (Lipolase)-katalizált gyűrűnyitása során^a

Ugyancsak végeztünk kísérleteket az optimális enzimmennyiség és enzim újrafelhasználhatóság meghatározására. A (±)-**71** 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben végzett gyűrűnyitását egyre nagyobb Lipolase mennyiségekkel (10, 20, 30, 40, 50 és 75 mg mL⁻¹) végezve kicsi, de egyértelmű reakciósebességbeli növekedést tapasztaltunk (50 min után: 10 mg mL⁻¹ enzimmel *konv*. = 15%; 75 mg mL⁻¹ enzimmel pedig *konv*. = 39%). Amikor a már egyszer, majd kétszer felhasznált enzimmel (30 mg mL⁻¹) új sarzs szubsztrát [(±)-**71**] rezolválását, ugyanazon körülmények (0,5 ekv. víz, *i*Pr₂O, 60 °C) között végeztük, a reakciók *E* értéke 200 feletti maradt, az enzim aktivtása azonban lépésről-lépésre csökkent (50 min után: *konv*. = 28%-ról, 25 ill. 23%-ra változott).

4.3.1.7. A cisz-3-hidroxi-4-fenilazetidin-2-on enantioszelektív hidrolízise [4]

A Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének szintézisére kidolgozott szerves közegű indirekt enzimes módszerünk (4.2.4. pont alatt) továbbfejlesztéseként, direkt enzimes módszert dolgoztunk ki a biológiai hatásért felelős (2*R*,3*S*)-3-fenilizoszerin [(2*R*,3*S*)-76] szintézisére, a megfelelő β -laktám [(3*R**,4*S**)-(±)-23] enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül (39. ábra).



Előkísérletek (oldószer-vizsgálat)

A β -laktámok lipáz-katalizált gyűrűnyitása területén elért eredményeink alapján, a (±)-23 gyűrűnyitását CAL-B katalízissel, 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végeztük. Mivel kiváló

enantioszelektivitást kaptunk (E > 200), így az előkísérleteket az oldószer vizsgálatra szűkítettük. A *i*Pr₂O-t (20. táblázat, 4. sor) más oldószerekre cserélve (1–3. és 5–7. sorok), az *E* nem változott, azonban jelentős reakciósebességbeli különbségeket tapasztaltunk. A leggyorsabb reakciót *t*-BuOMe-ben (5. sor) kaptuk, következésképpen a preparatív-mennyiségű rezolválást a későbbiekben, a környezetkímélő *t*-BuOMe-ben végeztük.

Sor	Oldószer	ee_{s} (%)	ee_{p} (%)	Konv. (%)	Ε
1	Me ₂ CO	5	5	> 98	> 200
2	1,4-dioxán	28	38	> 98	> 200
3	THF	7	8	> 98	> 200
4	<i>i</i> Pr ₂ O	44	77	> 98	> 200
5	t-BuOMe	49	95	> 98	> 200
6	toluol	48	91	> 98	> 200
7	CH_2Cl_2	29	41	> 98	> 200

20. táblázat. Az oldószerek reakciósebességre gyakorolt hatása a (±)-**23** CAL-B (Lipolase)-katalizált gyűrűnyitása során^a

^a0,05 M szubsztrát, H₂O (0,5 ekv.), 60 °C, 19 h után.

4.3.1.8. Gramm-mennyiségű rezolválások

A bemutatott előkísérletek (8–20. táblázatok) eredményeiként meghatározott, optimalizált körülmények között elvégeztük a racém β -laktámok [(±)-10–(±)-12, (±)-15, (±)-23, (±)-25, (±)-26, (±)-31–(±)-39, (±)-47, (±)-52, (±)-54, (±)-56–(±)-60, (±)-66 és (±)-67] és racém γ -laktámok [(±)-70–(±)-72] CAL-B-katalizált gramm-mennyiségű gyűrűnyitásait. A jellemző adatokat a 21. táblázatban tüntettem fel. A 4-benzil- és 4-fenil-etil-2-azetidinonok [(±)-66 és (±)-67] kivételével, valamennyi β - és γ -laktám preparatív-mennyiségű rezolválását kiváló enantioszelektivitás (E > 200) jellemezte. A kivételt képező két szubsztrát rezolválását, az összes többi preparatív-mennyiségű rezolválástól eltérően, két lépésben végeztük, így viszonylag alacsony termelésekkel (27–36%), de jónak mondható enantiomerfeleslegekkel (\geq 87%) kaptuk a kívánt termékeket. A reakcióelegyet a (±)-66 esetében a 24%-os, míg a (±)-67 esetében a 28%-os konverzió elérése után dolgoztuk fel. Az aminosav termékek vizes extrakcióval történő izolálása után, az enantiomerdűs laktámokkal, második lépésben továbbfolytattuk a rezolválásokat mindaddig, amíg a szubsztrát enantiomerfeleslegeket jónak nem ítéltük meg (ee > 99%). Ezután következett az enantiomertiszta laktámok izolálása.

21. táblázat. CAL-B katalizált gran	nm-mennyiségű enzimes g	gyűrűnyitások
--	-------------------------	---------------

			Te	ermék amir	nosav		S	zubsztrát l	laktám	
	Reakció- idő (h)	Konv. (%)	Izomer	Termelés (%)	Ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$
(±)- 10 ^a	141	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 7	45	98	-19,4 ^b	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 10	36	97	-3,6 ^c
(±)- 11 ^d	4,5	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 8	45	99	-38,8 ^b	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 11	48	99	-29,1 ^e
$(\pm)-12^{d}$	5	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 9	46	98	+121,1 ^b	1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 12	48	99	+161,1 ^e
(±)- 15 ^d	7	51	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 46	46	95	+23,9 ^b	1 <i>S</i> ,8 <i>R</i> - 15	47	99	-24,9 ^f
(±)-23 ^g	58	50	2R,3S- 78	43	98	-6,9 ^h	3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> - 23	49	>99	-169 ⁱ
$(\pm)-25^{j}$	24	50	<i>R</i> - 29	47	>99	$+7^k$	S- 25	46	> 99	-137 ¹
(±)- 26 ^j	30	49	<i>R</i> - 30	42	99	$+8^{m}$	S- 26	45	95	-113 ⁿ
(±)- 31 ^a	249	48	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 40	44	99	-9,1 ^b	1 <i>S</i> ,5 <i>R</i> - 31	42	93	+35,9 ^c
(\pm) - 32 ^a	31	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 41	47	98	-7,2 ^b	1 <i>S</i> ,7 <i>R</i> - 32	41	99	-5,1 ^c
(±)- 33 ^a	170	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 42	43	95	+17,8°	1 <i>S</i> ,8 <i>R</i> - 33	36	99	-18 ^c
(±)- 34 ^d	11	50	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> - 43	46	99	+9,1 ^b	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> - 3	4 40	99 ^c	+64,1 ^c
(±)- 35 ^d	8	50	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> - 4 4	46	98	-12,2°	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> - 3	5 47	99 ^c	+123,7 ^c
(±)- 36 ^d	5	51	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 45	45	96	+96,7 ^p	1 <i>S</i> ,5 <i>R</i> - 36	48	99	-34,8 ^e
(\pm) - 37 ^a	6	50	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> - 47	40	96	-6 ¹	1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> - 37	44	99	$+224^{s}$
(±)- 38 ^a	54	50	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> - 48	45	99	+25,1 ^p	1 <i>S</i> ,6 <i>S</i> - 38	45	99	+313 ^{sz}
(±)- 39 ^a	51	50	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> - 49	44	97	$+7^{t}$	1 <i>S</i> ,7 <i>S</i> - 39	45	99	-137 ^u
$(\pm)-47^{v}$	40	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> - 50	43	>99	-6 ^z	1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> - 47	44	96	$+54^{\mathrm{w}}$
$(\pm)-52^{d}$	18	50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 53	32	>98	$+5^{z}$	1 <i>S</i> ,12 <i>R</i> - 52	47	>99	-6,9 ^{bb}
(±)- 54 ^d	99	50	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> - 55	46	>98	+8,3 ^{aa}	1 <i>R</i> ,12 <i>R</i> - 54	47	98	-140^{bb}
(±)- 56 ^j	14	50	<i>R</i> - 81	47	99	+30,3 ^{cc}	S- 56	48	99	-271 ^{dd}
$(\pm)-57^{j}$	11	50	<i>R</i> -62	46	99	$+5^{ee}$	S- 57	46	99	-118^{ff}
(±)- 58 ^j	15	50	R- 63	48	99	+16,3 ^{gg}	S- 58	46	99	-110^{hh}
(±)- 59 ^j	14	49	<i>R-</i> 64	47	99	$+4^{ii}$	S- 59	41	96	-73 ^{jj}
(±) -60 ^j	13	50	<i>R</i> - 65	43	99	$+4,9^{kk}$	<i>S</i> -60	49	99	-117 ¹¹
(±)- 66 ^{mr}	ⁿ 13	24	S- 68	27	89	$+7^{z}$				
	88	81					<i>R-</i> 66	36	>99 ^d	+38,8 ⁿⁿ
(±)- 67 ^{mr}	ⁿ 11	29	S- 69	31	87	$+24^{00}$				
	22	89					<i>R-</i> 67	30	>99 ^d	$+19^{pp}$
$(\pm)-70^{\rm rr}$	91	50	1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	42	98	-10,6 ^{ss}	1R, 4S	47	>99	$+158^{e}$
(\pm) -71 ^{rr}	4	50	1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	48	>99	-243 ^h	1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	46	>99	$+549^{i}$
$(\pm)-72^{szs}$	^{sz} 18	50	1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	44	96	$-40,8^{tt}$	1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	44	97	$+187^{u}$

^a50 mg mL⁻¹ CAL-B, 1 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 60 °C. ^b*c* = 0,5; H₂O. ^c*c* = 0,5; CHCl₃. ^d50 mg mL⁻¹ CAL-B, 0,5 or 1 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 70 °C. ^e*c* = 0,45; CHCl₃. ^f*c* = 0,3; CHCl₃. ^g50 mg mL⁻¹ CAL-B, 0,5 ekv. H₂O, *t*-BuOMe, 60 °C. ^h*c* = 0,34; H₂O. ⁱ*c* = 0,26; CHCl₃. ^j30 mg mL⁻¹ CAL-B, 1 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 60 °C. ^k*c* = 0,17; H₂O. ¹*c* = 0,28; EtOH. ^m*c* = 0,2; H₂O. ⁿ*c* = 0,26; EtOH. ^o*c* = 0,4; H₂O. ^p*c* = 0,3; H₂O. ^{*i*}*c* = 0,11; H₂O. ^s*c* = 0,33; CHCl₃. ^{sz}*c* = 0,35; CHCl₃. ^t*c* = 0,09; H₂O. ^u*c* = 0,28; CHCl₃. ^vCAL-B:szubsztrát 4:1 (m/m), 0,5 ekv. H₂O, 70 °C. ^z*c* = 0,2; H₂O. ^w*c* = 0,25; EtOH. ^{aa}*c* = 0,4; EtOH. ^{bb}*c* = 0,5; EtOH. ^{cc}*c* = 0,43; H₂O. ^{dd}*c* = 0,47; EtOH. ^{ee}*c* = 0,51; H₂O. ^{ff}*c* = 0,46; EtOH. ^{gg}*c* = 0,33; H₂O. ^{hh}*c* = 0,49; EtOH. ⁱⁱ*c* = 0,1; H₂O. ^{jj}*c* = 0,16; EtOH. ^{kk}*c* = 0,45; H₂O, ^{ll}*c* = 0,45; EtOH. ^{mm}30 mg mL⁻¹ CAL-B, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 60 °C. ^{ss}*c* = 0,3; H₂O. ^{szz3}30 mg mL⁻¹ CAL-B, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 30 °C. ^{tc}*c* = 0,25; H₂O.

A (±)-72 rezolválása eredményezte ternékek oszlopkromatográfiás szétválasztásának kivételével, valamennyi esetben a termék enantiomerek szétválasztását igen egyszerűen, szerves-vizes extrakcióval vagy szűréssel végeztük. A termék aminosavak, a CAL-B különböző enantioszelektivitására utaló abszolút konfigurációinak ellenére, az enzim enantiopreferenciája ugyanaz, a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek prioritási sorrendje változik (akárcsak a 4.2.7. pont alatti Diszkusszióban bemutatottak esetében).

4.3.2. Aminoészterek enantioszelektív hidrolízise

A laktám gyűrűnyitáson alapuló direkt enzimes módszer egyik hiányossága, hogy a racém kiindulási transz laktámok szintézise csak nagy gyűrűtagszámú laktámok esetében (4.3.1.4. pont alatt) lehetséges, így a kis gyűrűtagszámú transz aminosavak szintézisére nem nyújt lehetőséget. Egy másik hátránya, hogy a 4-benzil- és 4-fenil-etil-2-azetidinonok [(±)-66 és (±)-67] grammmennyiségű gyűrűnyitását, a termékek jó enantiomerfeleslegekkel történő előállítása céljából két lépésben kellett végeznünk (4.3.1.5. pont alatt). Következésképpen, egy olyan új, direkt enzimes eljárás kidolgozására volt szükségünk, amely a fenti hiányosságokat kiküszöböli. Kidolgoztuk tehát a megfelelő aminoészterek szerves közegű enantioszelektív hidrolízisét, amely módszer egyaránt alkalmazható mind *cisz*, mind pedig *transz*, kis gyűrűtagszámú aminosav enantiomerek előállítására. Az eljárás alkalmazhatóságát kiterjesztettük β -aril-, β -heteroaril- és β -arilalkilszubsztituált β -aminoészterek enzimes rezolválására is. Így számos értékes aciklusos β -aminosav enantiomer szintézisére is lehetőségünk nyilt, például elsőként adtunk meg enzimes eljárst a Sitagliptin intermedier [(R)-112 (n)] szintézisére. Másfelől az új módszerünkkel megoldottuk a (±)-66 és (±)-67 laktámok két-lépéses rezolválása támasztotta hiányosságokat is, azaz egy lépésben kaptuk, a jó enantiomerfeleslegekkel rendelkező aminosavakat. Az enzimes rezolválások eredményezte termékek: az aminosav és az el nem reagált aminoészter szétválasztását, hasonlóan a laktám és aminosav szétválasztásához, igen egyszerűen, szervesvizes extrakcióval vagy szűréssel végeztük.

4.3.2.1. Karbociklusos *cisz* és *transz* β-aminoészterek hidrolízise szerves közegben [16,17]

Enzimes eljárást dolgoztunk ki karbociklusos *cisz* β -aminosavak (pl. ciszpentacin, 1*R*,2*S*-40) enantiomertiszta formában történő előállítására a megfelelő β -aminoészterek [(±)-77–(±)-80] enantioszelektív hidrolízisén keresztül (40. ábra). A CAL-B-katalízissel, 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-

ben, 65 °C-on végzett reakciók jó termelés mellett (\geq 42%) eredményezték a jó enantiomerfelesleggel (\geq 94%) rendelkező termékeket.



40. ábra

A CAL-B kiváló enantioszelektivitással ($E \ge 183$) katalizálta a *transz* β -aminoészter modell vegyületek [(±)-**81** és (±)-**82**] hidrolízisét is (41. ábra), amikor a reakciókat 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben, 65 °C-on végeztük. A termékeket jó termelés mellett (≥44%) jó enantiomerfelesleggel (= 99%) kaptuk.



A módszer alkalmazhatóságát kiterjesztettük hidroxi-szubsztituált β -aminoészterek szintézisére, azonban a CAL-B-katalizált, szerves közegű észter hidrolízisek gyenge enantioszelektivitást

mutattak. A munka érdekessége és egyben nehézsége, a kezdetben feltételezett, majd később bizonyított polimerizáció volt, melynek következtében az enzimes elegyből csak az el nem reagált aminoésztereket tudtuk viszonylag jó, ill. elfogadható enantiomerfeleslegekkel izolálni³³.

Előkísérletek (enzim-, vízmennyiség-, oldószer-, hőmérséklet-, enzimmennyiség-, enzim újrafelhasználás-vizsgálat)

A (±)-**78** 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben, 45 °C-on végzett hidrolízisére kipróbált enzimek közül a PS, AK és AY lipázokkal gyakorlatilag nem tapasztaltunk reakciót (*konv.* ~0% 48 óra után), a PPL ellenben enantioszelektíven katalizálta a hidrolízist, igaz, a reakció rendkívül lassúnak bizonyult (22. táblázat, 17. sor). A CAL-A (Chirazyme L-5) enzim csekély enantioszelektivitás kíséretében szintén mutatott aktivitást, 65 °C-on (3. sor). A három CAL-B preparátum viszont jó enantioszelektivitással katalizálta a 65 °C-on végzett reakciókat (1., 2. és 4. sorok). A reakciósebességeket is figyelembevéve, a Lipolase enzimet választottuk további munkánkhoz.

Következő lépésben vizsgáltuk az oldószereknek a reakció enantioszelektivitására és sebességére gyakorolt hatását (22. táblázat, 4–11. sorok). A minden esetben kiváló enantioszelektivitással zajlódó reakció éter típusú oldószerekben bizonyultak a leggyorsabbnak (4., 8. és 9. sorok), némileg lassúb volt *n*-hexánban és toluolban, még lassúbb 1,4-dioxánban és THF-ban és igencsak lassú volt Me₂CO-ban.

Különböző hőmérsékleteken végezve a (\pm)-**78** Lipolase-katalizált, 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben végzett hidrolízisét (22. táblázat, 12–16. sorok), megállapítottuk, hogy a 60 °C alatti, akárcsak a 70 °C feletti hőmérsékleteken végzett reakciók sebessége lecsökkent a 60, ill. 70 °C-on végzett reakciók sebességéhez képest. Így a gramm-mennyiségű rezolválásokat 65 °C-on végeztük.

Sor	Enzim (30 mg mJ $^{-1}$)	T (°C)	Oldószer	Reakció-	Konv.	ee_s	ee_p	Ε
	(30 mg mL)	(\mathbf{C})		100 (11)	(%)	(%)	(%)	
1	Chirazyme L-2	65	<i>i</i> Pr ₂ O	26	48	89	96	147
2	Novozym 435	65	<i>i</i> Pr ₂ O	26	47	87	97	187
3	Chirazyme L-5 ^b	65	<i>i</i> Pr ₂ O	48	15	10	58	4
4	Lipolase	65	<i>i</i> Pr ₂ O	25	48	90	98	307
5	Lipolase	65	1,4-dioxán	28	19	23	99	249
6	Lipolase	65	Me ₂ CO	28	6	6	99	211
7	Lipolase	65	THF	28	12	14	99	228
8	Lipolase	65	Et_2O	28	45	80	98	245
9	Lipolase	65	t-BuOMe	28	49	92	96	161

22. táblázat. Enzim, oldószer és hőmérséket enantioszelektivitásra és reakciósebessége gyakorolt hatása a (±)-78 hidrolízise során^a

22. tá	blázat (folytatás)							
10	Lipolase	65	toluol	28	29	40	99	295
11	Lipolase	65	<i>n</i> -hexán	28	38	61	98	185
12	Lipolase	25	<i>i</i> Pr ₂ O	20 (5 nap)	11 (47)	12 (87)	99 (97)	223 (187)
13	Lipolase	45	<i>i</i> Pr ₂ O	20	21	26	99	256
14	Lipolase	60	<i>i</i> Pr ₂ O	19	36	55	99	346
15	Lipolase	70	<i>i</i> Pr ₂ O	19	36	55	98	172
16	Lipolase	80	<i>i</i> Pr ₂ O	19	29	40	98	146
17	PPL	45	<i>i</i> Pr ₂ O	48	6	6	99	211

^a0.05 M szubsztrát, 0.5 ekv. H₂O. ^b20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében.

Mivel a (±)-**78** Lipolase (30 mg mL⁻¹)-katalizált, víz hozzáadása nélkül, *i*Pr₂O-ben végzett reakció sebessége és *E* értéke szinte ugyanolyan jónak bizonyult, mint a 0,5 ekv. víz reakcióelegyhez történő hozzáadása esetében (23. táblázat, 3. sor vs 22. táblázat, 4. sor), újra megállapíthattuk, hogy az enzim felületén jelenlevő víz (<5%) vagy oldószer tartalmazta víz (<0,1%) mennyisége elégséges volt a teljes mértékű hidrolíziséhez.

Az enzim mennyiségének növelésével mérsékelt reakciósebességbeli növekedést tudtunk elérni a (\pm)-**78** Lipolase-katalizált, 0,5 ekv. vízzel, *i*Pr₂O-ben végzett hidrolízise során (23. táblázat, 1., 2. és 7–9. sorok). Vizsgáltuk az enzim újrafelhasználhatóságát, azaz a (\pm)-**78** hidrolíziséhez egyszer, kétszer, ill. háromszor már használt Lipolase enzimet (30 mg mL⁻¹) használtunk. A várakozásunknak megfelelően, az enzim katalitikus aktívitása csökkent, ez azonban a termék enantiomerfeleslegét látszólag nem befolyásolta (4–6. sorok).

) L
1 10 0.5 25 42 70 98	208
2 20 0.5 25 45 79 98	239
3 30 - 29 43 75 98	224
4 30 ^b - 24 43 74 98	244
5 30 [°] - 24 38 59 97	120
6 30 ^d - 24 32 46 97	103
7 40 0.5 25 48 91 97	209
8 50 0.5 22 50 95 96	183
9 75 0.5 22 51 99 94	174

23. táblázat. A konverzió és E alakulása a (±)-**78** hidrolízise során^a

^a0,05 M szubsztrát, *i*Pr₂O 65 °C. ^begyszer használt. ^ckétszer használt. ^dháromszor használt.

A (±)-**78** hidrolízisére optimalizált körülmények [Lipolase (30 mg mL⁻¹), 0,5 ekv. víz, *i*Pr₂O, 65 °C] között elvégeztük a, *cisz* [(±)-**77**, (±)-**79** és (±)-**80**] és *transz* [(±)-**81** és (±)-**82**] β -amino-észterek hidrolízisét és ahogy a gramm-mennyiségű rezolválások adataiból (24. táblázat) látható, a reakciókat kiváló enantioszelektivitás jellemezte.

Gramm-mennyiségű rezolválások

Az optimalizált körülmények (24. táblázat, lábjegyzet) között végezve a (\pm) -**77**– (\pm) -**82** preparatív-mennyiségű rezolválásokat, jó enantioszelektivitás (*E* általában > 100) jellemezte a reakciókat. A termék aminosav és el nem reagált aminoészter enantiomerek szerves-vizes extrakcióval történő elválasztását követően az aminoésztereket aminosav hidrokloridokká hidrolizáltuk, az enantiomerfeleslegek megtartása mellett (24. táblázat).

24. táblázat. A (±)-77–(±)-82 gramm-mennyiségű rezolválása^a

				β-	Aminosav	HCl			β -Amine	osav	
	Reakció- idő (h)	Konv. (%)	Ε	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_{\rm D}^{25}$ (H ₂ O)	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_D^{25}$ (H ₂ O)
(±)-77	87	48	74	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 40 HCl	42	94	-5 ^b	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> - 40	42	96	$+8^{c}$
(±)- 78	31	49	>200	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 7 HCl	46	99	-8,4 ^d	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> -7	47	98	$+21^{e}$
(±)- 79	72	50	110	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 8 HC1	45	98	-28 ^f	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> - 8	46	98	+34 ^g
(±)- 80	66	49	133	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> - 9 HCl	45	98	$+121^{c}$	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> - 9	46	99	-120 ^f
(±)- 81	68	49	>200	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> - 83 HCl	46	99	+51 ^c	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> - 83	48	99	-65 ^g
(±)- 82	58	50	183	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> - 84 HCl	44	99	$+123^{h}$	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> - 84	45	99	-152 ^e
a	30 mg mL	-1 CAL	-B, <i>i</i> Pr ₂	O, 0,5 ekv. H ₂ O	, 65 °C. ^b c	= 0,2	1. $c^{c} = 0,2$	3. $^{d}c = 0,5.$	$c^{e} c = 0,28. f c$	r = 0,11	c = c

 $0,26. \ ^{n}c = 0,27.$

4.3.2.2. A β-aril-, β-arilalkil- és β-heteroaril-szubsztituált β-aminoészterek hidrolízise szerves közegben [18-20]

A karbociklusos β -aminoészterek enzim-katalizált enantioszelektív hidrolízisére kidolgozott, majd iparjogilag is védett eljárás alkalmazhatóságát kiterjesztettük β -aril-szubsztituált [18], β heteroaril-szubsztituált [19] és β -arilalkil-szubsztituált [20] β -aminoészterek szerves közegű, enantioszelektív hidrolízisére. Így számos értékes aciklusos β -aminosav enantiomer szintézisére nyilt lehetőségünk, többek közt, elsőként adtunk meg enzimes eljárst a Sitagliptin intermedier (*R*)-**112** (**n**) szintézisére. A megfelelő racém aciklusos aminoészterek, a már ismertetett karbociklusos β -aminoészter hidrolízisekhez használt CAL-B helyett, PS (Celitre immobilizált),

ill. PS-IM lipáz-katalizált szerves közegű (*t*-BuOMe vagy *i*Pr₂O), 25 vagy 45 °C-on végzett enantioszelektív ($E \sim 200$) hidrolízisét 0,5 ekv. vízzel végeztük (42. ábra).



42. ábra

Előkísérletek (enzim-, vízmennyiség-, oldószer-, hőmérséklet-, enzimmennyiség-, enzim újrafelhasználás-vizsgálat)

Mindhárom vegyületcsalád kiválasztott modell vegyületeivel végeztünk előkísérleteket, a munkák megtervezésénél építkeztünk a karbociklusos aminoészterek enantioszelektív hidrolízisénél gyűjtött tapasztalatainkra. A modell vegyületek esetében végzett enzim-vizsgálat körülményeit és szignifikáns eredményeit a 25. táblázatban mutatom be. Fontos megjegyezni, hogy a karbociklusos aminoészterek hidrolízisét kiváló enantioszelektivitással katalizáló CAL-B enzim gyakorlatilag nem mutatott aktívitást az aciklusos aminoészterek hidrolízise során, míg szerény E volt tapasztalható AK és PPL lipázokkal (25. táblázat, 1–3. és 9–11. sorok). A táblázatból az is kitűnik, hogy mind az általunk (Celitre), mind pedig a gyárilag (PS-IM) immobilizált PS lipázok kiváló enantioszelektivitással katalizálták a hidrolízist (4–8. sorok).

Enzim	Racemát	Т (°С)	Reakció- idő (h)	ee _s (%)	ee_p (%)	Konv. (%)	Ε	Sor
	(\pm) -85 $(a)^{b}$	45	5	67	89	43	35	1
AK lipáz ^a	(\pm) -91 $(g)^{c}$	45	17	43	74	37	10	2
	(\pm) -97 $(m)^d$	25	87	19	88	18	19	3
	(\pm) -85 $(a)^{b}$	45	6	92	>99	49	>200	4
DS linda	(\pm) -85 $(a)^{b}$	25	6	92	>99	49	>200	5
r's lipaz	(\pm) -91 $(g)^{c}$	45	17	>99	90	52	100	6
	(\pm) -91 $(g)^{c}$	25	17	>99	98	50	>200	7
PS-IM lipáz	(\pm) -97 $(m)^{d}$	25	72	99	96	51	>200	8
	(\pm) -85 $(a)^{b}$	45	5	66	88	43	31	9
PPL	(\pm) -91 $(g)^{c}$	45	17	43	74	37	10	10
	(\pm) -97 $(m)^d$	25	87	2	88	2	16	11

25. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a (±)-**85** (**a**), a (±)-**91** (**g**) és a (±)-**97** (**m**) modell vegyületek hidrolízisére használt legígéretesebb enzimek függvényében

^a20% lipázt tartalmazó, cukor jelenlétében, Celitre adszorbeált preparátum. ^b0,05 M szubsztrát, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O. 50 mg mL⁻¹ enzim. ^c0,05 M szubsztrát, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O. 30 mg mL⁻¹ enzim. ^d0,05 M szubsztrát, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O vagy *t*-BuOMe, 50 mg mL⁻¹ enzim.

Következő lépésként. vizsgáltuk különböző oldószereknek az enantioszelektivitásra és reakciósebességre kifejtett hatását (26. táblázat).

							-		_							
			(±	:)-85 (a)			(±) -91 (g	g)			(±)	- 97 (1	m)	
Sor	Oldószer	R-idő (h)	Konv. (%)	ee_s^b (%)	ee_{p}^{b} (%)	E	R-idő (h)	Konv. (%)	ee ^b _s (%)	ee_{p}^{b} (%)	E	R-idć (h)	6 Konv. (%)	ee_s^b (%)	ee ^b (%)	Ε
1	<i>i</i> Pr ₂ O	5	49	96	>99	>200	18	48	>99	98	>200	35	38	60	96	90
2	t-BuOMe	5	48	92	>99	>200	18	50	>99	98	>200	35	34	50	96	81
3	Et_2O		nin	ics ad	at			nir	ics ad	at		35	10	8	74	7
4	<i>n</i> -hexán	5	50	98	>99	>200	18	52	>99	92	126	35	36	50	89	28
5	toluol	5	38	60	>99	>200	18	40	66	98	197	35	5	82	6	11
6	THF	5	14	16	>99	>200	18	17	20	98	120		nin	cs aa	lat	
7	1,4-dioxán	5	26	34	>99	>200	18	13	14	98	114		nin	cs aa	lat	
8	CHCl ₃	5	4	L4	>99	>200	18	6	6	98	105		nin	cs aa	lat	
9	Me ₂ CO	5	13	15	>99	>200	18	2	2	98	101		nin	cs aa	lat	
10	oldószer nélkül		nin	ics ad	at			nin	ics ad	at		35	53	74	66	11

26. táblázat. A konverzió és az enantioszelektivitás változása a (±)-85 (a), a (±)-91 (g) és a (±)-97 (m) modell vegyületek különböző oldószerekben végzett PS lipáz-katalizált hidrolízise során^a

^a0,05 M szubsztrát, 0,5 ekv. H₂O, (\pm)-**85** (**a**) esetében 50 mg mL⁻¹ PS lipázzal (Celitre adszorbeált), 45 °C-on; (\pm)-**91** (**g**) esetében 30 mg mL⁻¹ PS lipázzal (Celitre adszorbeált), 25 °C-on; (\pm)-**97** (**m**) esetében 50 mg mL⁻¹ PS-IM lipázzal, 45 °C-on.

A legnagyobb reakciósebességet mindhárom modell vegyület esetében a *i*Pr₂O-ben, *t*-BuOMeben és *n*-hexánban végzett reakciók esetében tapasztaltuk (1–3. sorok). Lassabban zajlódtak a reakciók, amikor a (±)-**85** (**a**) és (±)-**91** (**g**) hidrolízisét toluolban, THF-ban és 1,4-dioxánban (4–6. sorok) és jóval lassabban, amikor CHCl₃-ban és Me₂CO-ban (7. és 8. sorok) végeztük. Az enantioszelektivitási értékek a (±)-**97** (**m**) kivételével, minden esetben nagyok voltak (E > 100). A (±)-**97** (**m**) esetében a legnagyobb enantioszelektivitást *i*Pr₂O-ben értük el, és jóllehet ez az érték 100 alatt maradt, a módszer kiválóan alkalmazhatónak bizonyult a kívánt termékek nagy *ee*-el, egy lépésben történő előállítására, ami a korábbiakban bemutatott, megfelelő β -laktám [(±)-**66**] gyűrűnyitási módszerével (4.3.1.5. pont alatt) egy lépésben nem volt megvalósítható.

Vizsgáltuk a reakcióelegyhez hozzáadott víz mennyiségének (0–5 ekv.) reakciósebességre és enantioszelektivitásra gyakorolt hatását (27. táblázat). A reakciósebességek a hozzáadott víz mennyiségének növelésével csekély mértékben nőttek a (\pm)-85 (a) és a (\pm)-91 (g) esetében, míg a (\pm)-97 (m) esetében csökkentek (2. és 3. sorok). Megjegyzendő, hogy míg a (\pm)-85 (a) esetében az enantioszelektivitási érték változatlanul kitűnő maradt (E > 200), addig a (\pm)-91 (g) esetében jelentősen, a (\pm)-97 (m) esetében pedig kevésbé, de szintén csökkent (2. és 3. sorok). A víz hozzáadása nélkül is lejátszódó reakció (1. sor) bizonyítja, mint ahogy már a korábbiakban, CAL-B lipáz esetében is tapasztaltuk, hogy az enzim felületén (< 2%), illetve az oldószerben található víz (< 0.1%) mennyisége elegendő a reakció végbemeneteléhez. Elvégeztük a (\pm)-85 (a) és a (\pm)-91 (g) hidrolízisét víz:*i*Pr₂O 1:1 arányú elegyében is, azonban az *E* drasztikusan lecsökkent ($E \leq 30$).

			(=	±)- 85 ((a)			(±	-)-91 ((g)			(±)	- 97 (n	n)	
Sor	H ₂ O (ekv.)	R-idő (h)	Konv (%)	(%)	ee_{p}^{b} (%)	Ε	R-idő (h)	Konv. (%)	<i>ee</i> _s ^c (%)	ee_{p}^{c} (%)	E	R-idő (h)	Konv. (%)	ee_s^c (%)	ee _p ^c (%)	E
1	0	2	46	85	>99	>200	7	46	80	98	>200	25	28	38	96	71
2	1	2	48	93	>99	>200	7	53	94	83	38	25	24	31	96	66
3	5	2	50	>99	>99	>200	7	55	>99	81	49	25	19	22	96	61

27. táblázat A hozzáadott víz mennyiségének hatása a (±)-85 (a), a (±)-91 (g) és a (±)-97 (m) modell vegyületek PS lipáz-katalizált hidrolízisének sebességére és enantioszelektivitására^a

^a 0,05 M szubsztrát, (\pm)-**85** (**a**) esetében 50 mg mL⁻¹ PS lipázzal (Celitre adszorbeált), *i*Pr₂O-ben, 45 °C-on; (\pm)-**91** (**g**) esetében 30 mg mL⁻¹ PS lipázzal (Celitre adszorbeált), *i*Pr₂O-ben, 25 °C-on; (\pm)-**97** (**m**) esetében 50 mg mL⁻¹ PS-IM lipázzal, *t*-BuOMe-ben, 45 °C-on.

Akárcsak korábbi megfigyeléseinkben, a reakciósebességek egyértelműen növekedtek az enzim mennyiségének növelésével, miközben az enantioszelektivitás látszólag nem változott (28. táblázat). Így a (\pm)-**85** (**a**) és a (\pm)-**91** (**g**) PS lipáz (Celitre adszorbeált)-katalizált, 0,5 ekv. vízzel,

iPr₂O-ben végzett hidrolízise 75 mg mL⁻¹ enzimmel volt a leggyorsabb. Gazdaságossági okokból azonban, a gram-mennyiségű rezolválásokat 30 mg mL⁻¹ enzimmel hajtottuk végre.

			(=	(±)- 91 (g)							
Sor	PS lipáz (mg mL ⁻¹)	R-idő (h)	Konv. (%)	ee_s^b (%)	ee_{p}^{b} (%)	Ε	R-idő (h)	Konv. (%)	ee_s^c (%)	ee_{p}^{c} (%)	Ε
1	10	1	17	20	>99	>200	3	16	18	98	118
2	10	24	45	82	>99	>200	22	49	93	98	>200
3	20	1	27	36	>99	>200	3	24	31	98	134
4	30	1	31	45	>99	>200	3	32	47	98	158
5	40	1	35	54	>99	>200	3	37	58	98	179
6	50	1	38	60	>99	>200	3	42	72	98	>200
7	75	1	45	82	>99	>200	3	49	93	98	>200

28. táblázat A PS lipáz (Celitre adszorbeált) mennyiségének hatása a reakciók sebességére és enantioszelektivitására^a

További reakciósebesség növelése céljából a (\pm)-**97** (**m**) PS-IM lipáz-katalizált hidrolízisét különböző adalékanyagok hozzáadásával végeztük (29. táblázat). Amint a táblázat adataiból kitűnik, a *i*Pr₂EtN, Et₃N vagy 2-oktanol nem gyakorolt jótékony hatást sem az enzim aktivitására, sem pedig az enantioszelektivitásra.

Sor	Additív (1 ekv.)	$ee_{s}^{[b]}(\%)$	$ee_{p}^{[b]}(\%)$	Konv. (%)	Ε
1	H_2O	44	96	31	76
2	<i>i</i> Pr ₂ EtN	41	96	30	73
3	Et ₃ N	43	96	31	75
4	2-oktanol	39	96	29	72

29. táblázat Additív hatása a (±)-97 (m) hidrolízisének sebességére és enantioszelektivitására^a

^a0,05 M szubsztrát, 1 mL *t*-BuOMe, 50 mg mL⁻¹ lipáz PS-IM, 45 °C, 31 h után.

Gramm-mennyiségű rezolválások

Kiváló enantioszelektivitás (E > 200) jellemezte mind a β -aril- [(±)-**85**–(±)-**99** (**a**-**e**)], mind a β -arilalkil- [(±)-**85**–(±)-**99** (**f**-**l**)], mind pedig a β -heteroaril- [(±)-**85**–(±)-**99** (**m**-**o**)] szubsztituált β -aminoészterek gramm-mennyiségű rezolválásait (30. táblázat).

30. táblázat. A (±)-85–(±)-99 (a-o) PS lipáz-katalizált gramm-mennyiségű rezolválása^a

				β -Aminosav HCl				eta -Aminosav			
	R-idő (h)	(%)	Ε	Izomer	Termelés (%)	Ee (%)	$\begin{array}{c} [\alpha]_{\rm D}^{25} \\ ({\rm H_2O}) \end{array}$	Izomer	Termelés (%)	ee (%)	$[\alpha]_{D}^{25}$ (H ₂ O)
(±)- 85 (a)) 22	50	>200	<i>R</i> -100 HCl	44	>99	-4 ^b	<i>S</i> -100	44	>99	-8 ^c
(±)- 86 (b) 23	49	>200	<i>R</i> -101 HCl	40	>99	-6,5 ^d	<i>S</i> -101	40	>99	-1,8 ^e
(±)- 87 (c)) 74	50	>200	<i>R</i> -102 HCl	43	>99	-5,1 ^f	S-102	44	>99	-5,5 ^e
(±)- 88 (d) 18	50	>200	<i>R</i> -103 HCl	41	>99	-7,9 ^g	<i>S</i> -103	41	>99	+1,3 ^h
(±)- 89 (e)) 16	52	>200	<i>R</i> -104 HCl	44	97	-8,4 ⁱ	S- 104	46	>99	$+4^{b}$
(±) -90 (f)	67	50	>200	<i>R</i> -105 HCl	45	98	+9,7 ^g	<i>S</i> -105	43	>99	-3,2 ^g
(±)-91 (g) 40	50	>200	<i>R</i> -106 HCl	40	>99	+4,1 ⁱ	S- 106	46	>99	-5,1 ^j
(±)-92 (h) 24	50	>200	<i>R</i> -107 HCl	43	97	$+3,2^{m}$	S-107	45	98	-11,7 ^m
(±)- 93 (i)	60	49	>200	<i>R</i> -108 HCl	44	97	+5,4 ^g	<i>S</i> -108	46	>99	-5,8 ^k
(±)- 94 (j)	47	50	>200	<i>R</i> -109 HCl	49	>99	$+5,3^{1}$	<i>S</i> -109	44	>99	-6,7 ^f
(±)-95 (k) 60	50	>200	<i>R</i> -110 HCl	46	>99	+4,1 ⁱ	S-110	44	>99	-3,1 ⁱ
(±)-96 (l)	42	50	>200	<i>R</i> -111 HCl	46	>99	$+4,0^{f}$	<i>S</i> -111	43	>99	-3,2 ^g
(±)- 97 (m) 5 ⁿ	50	194	S-68 HCl	42	96	+4,6 ^m	<i>R-</i> 68	45	96	-4,6 ^b
(±) -98 (n) 5 ⁿ	50	>200	<i>S</i> -112 HCl	44	96	-9,8 ^g	<i>R</i> -112	43	97	+15,5°
(±) -99 (0)) 3 ⁿ	51	>200	S-69 HCl	47	98	+11,5 ^p	R- 69	47	96	-12,1 ^f

^a30 mg mL⁻¹ PS lipáz (Celitre adszorbeált), *i*Pr₂O, 0,5 ekv. H₂O, (±)-**85**–(±)-**89** (**a**-**e**) esetében 45 °C-on; (±)-**90**–(±)-**96** (**f**-1) esetében 25 °C-on; 50 mg mL⁻¹ PS-IM lipáz, *i*Pr₂O, 0,5 ekv. H₂O, (±)-**97**–(±)-**99** (**m**-**o**) esetében 45 °C-on. ^bc = 0,3. ^cc = 0,27. ^dc = 0,31. ^ec = 0,38. ^fc = 0,34. ^gc = 0,32. ^hc = 0,51. ⁱc = 0,33. ^jc = 0,41. ^kc = 0,52. ^lc = 0,42. ^mc = 0,36. ⁿnap. ^oc = 0,35. ^pc = 0,4.

Akárcsak a karbociklusos β -aminoészterek preparatív-mennyiségű hidrolízisénél (4.3.2.1. pont alatt), a termék aminosav és el nem reagált aminoészter enantiomerek szerves-vizes extrakcióval, vagy szűréssel történő elválasztását követően, az aminoésztereket aminosav hidrokloridokká alakítottuk, az enantiomerfeleslegek csökkenése nélkül ($ee \ge 96\%$).

4.3.2.3. Az etil-(3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionát) enantioszelektív hidrolízise [21]

A Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének szintézisére kidolgozott korábbi eljárásaink (4.2.4. és 4.3.1.7. pontok alatt) továbbfejlesztéseként új, direkt enzimes stratégiát dolgoztunk ki a (2*R*,3*S*)-3-fenilizoszerin [(2*R*,3*S*)-**76** HCl] szintézisére, a megfelelő β -aminoészter [(2*R**,3*S**)-(±)-**113**] enantioszelektív (*E* > 200) szerves közegű hidrolízisén keresztül (43. ábra). Kiváló enantioszelektívitást (*E* > 200) értünk el, amikor a reakciót PS-IM lipázzal, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on végeztük. A jó enantiomerfelesleggel (*ee* ≥ 98%) és jó termeléssel (≥ 45%) kapott termékeket [(2*S*,3*R*)-**76** és (2*R*,3*S*)-**113**] szűréssel, ill. szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.





43. ábra

Előkísérletek (enzim-, oldószer-, vízmennyiség-, enzimmennyiség-vizsgálat)

A vizsgált karbociklusos és aciklusos β -aminoészterek enzimes hidrolízise területén elért eredményeink alapján (4.3.2.1. és 4.3.2.2. pontok alatt), az első, enzim-vizsgálatra irányuló próbálkozásainkat 0,5 ekv. víz hozzáadásával, *t*-BuOMe-ben, 50 °C-on végeztük (31. táblázat, 1–3. és 12–15. sorok). A CAL-B enzim használatakor, 8 óra után csak nyomnyi mennyiségű szubsztrát és igen csekély mennyiségű racém aminosav volt kimutatható a reakcióelegyben (1. sor) (feltételeztük, hogy az aminoészter polimerizálódott). A CAL-A és AY lipázok gyakorlatilag nem katalizálták a hidrolízist (12. és 14. sorok), míg a többi kipróbált enzim, más-más reakciósebességek mellett, de kiváló enantioszelektivitással (E > 200) katalizálták az átalakulást (2., 3., 13. és 15. sorok). A leggyorsabb reakciót, kiváló enantioszelektivitás mellett a PS-IM lipáz biztosította (*konv.* = 50% 3 óra után, 3. sor), így a további előkísérletekhez és gramm-mennyiségű rezolváláshoz a PS-IM lipázt használtuk.

Vizsgáltuk különböző oldószereknek a ($2R^*$, $3S^*$)-(\pm)-**113** PS-IM lipáz-katalizált hidrolízisének (0,5 ekv. víz, 50 °C) enantioszelektivitására és sebességére gyakorolt hatását (3–7. sorok). A reakció jelentősen gyorsabbnak bizonyult mind *n*-hexánban, mind pedig *i*Pr₂O-ben (4. és 5. sorok), mint *t*-BuOMe-ben vagy toluolban (3. és 6. sorok). Amikor a reakciót vízben végeztük (7. sor), nagyon gyors reakciót tapasztaltunk, azonban az enantioszelektivitás drasztikusan lecsökkent (E = 37). Próbálkoztunk a hidrolízis elvégzésével oldószer nélküli rendszerben [9 mg szubsztrát (0.05 mmol), 50 mg PS-IM lipáz, víz (0.025 mmol)], azonban 2 nap után sem volt kimutatható termék a reakcióelegyben. Összegezve, a további reakciókat és gramm-mennyiségű rezolválást *i*Pr₂O-ben végeztük.

Sor	Enzim (50 mg mL ⁻¹)	Reakció- idő (h)	Oldószer	H ₂ O (ekv.)	Konv. (%)	ee_S (%)	ee_P (%)	E
1	CAL-B	2 (5) (8)	t-BuOMe	0,5	59 (90) (100) ^c	0	0^{b}	
2	PS-SD lipáz	22	t-BuOMe	0,5	23	30	>98	>200
3	PS-IM lipáz	3 (2)	t-BuOMe	0,5	50 (34)	96 (51)	>98	>200
4	PS-IM lipáz	2	<i>i</i> Pr ₂ O	0,5	46	83	>98	>200
5	PS-IM lipáz	2	<i>n</i> -hexán	0,5	48	90	>98	>200
6	PS-IM lipáz	2	toluol	0,5	34	52	>98	>200
7	PS-IM lipáz	1	H_2O	_	64	61	35	37
8	PS-IM lipáz	2	<i>i</i> Pr ₂ O	_	44	77	>98	>200
9	PS-IM lipáz	2	<i>i</i> Pr ₂ O	2	46	84	97	75
10	PS-IM lipáz	2	<i>i</i> Pr ₂ O	10	50	80	80	21
11	PS-IM lipáz	2	<i>i</i> Pr ₂ O	100	52	80	74	16
12	CAL-A ^d	22	t-BuOMe	0,5	nem tapasztalható reakció			
13	PPL	22	t-BuOMe	0,5	13	15	>98	>200
14	AY lipáz ^d	22	t-BuOMe	0,5	nem tapasztalható reakció			
15	AK lipáz ^d	22	t-BuOMe	0,5	42	72	>98	>200

31. táblázat. A konverzió és enantioszelektivitás változása a $(2R^*, 3S^*)$ - (\pm) -**113** hidrolízise során^a

A korábbi, reakcióelegyhez adott víz mennyisége és PS lipáz aktívitása, valamint szelektivitása közötti megfigyelésünkkel (27. táblázat) összhangban, itt is megállapítottuk, hogy a reakcióelegyhez adott víz mennyiségének növelésével, jóllehet kis mértékben, de nőtt az enzim aktívitása, azonban az enantioszelektivitása már viszonylag kis mennyiségű víz (2 ekv.) hozzáadásánál is drasztikusan lecsökkent (4. és 8–11. sorok). A víz hozzáadása nélkül végzett korábbi hidrolitikus reakciók tapasztalataival (23. és 27. táblázatok) összhangban, a ($2R^*$, $3S^*$)- (±)-**113** PS-IM lipáz-katalizált, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on, víz hozzáadása nélkül végzett hidrolízise gyorsan és enantioszelektíven játszódott le (8. sor).

A szubsztrát és enzim tömegarányának optimalizálása (1:5 -ről 1:1 -re) céljából végeztünk egy sor előkísérletet, azaz vizsgáltuk különböző enzimmennyiségek (50, 40, 30, 20 és 10 mg ml⁻¹) reakciósebességre gyakorolt hatását (0,05M szubsztrát). Az enzimmennyiségek csökkentésével enyhén csökkentek a reakciósebebességek [*konv.* = 42% 3,5 óra után, 10 mg ml⁻¹ enzimmel vs *konv.* = 46% 2 óra után, 50 mg ml⁻¹ enzimmel (4. sor)], az enantioszelektivitási értékek viszont, látszólag nem változtak. Mivel a reakciósebességek enzimmennyiség függvényében történő

^a0,05 M szubsztrát, 50 °C. ^bIgen kis mennyiségben volt kimutatható a β -aminosav (8 óra után); feltételeztük, hogy az aminoészter polimerizálódott. ^cSzámítva, standard (*n*-hexadekán) használattal. ^d20% (m/m) lipázt tartalmaz Celitre adszorbeálva, cukor jelenlétében.
változása csekély mértékű volt, ezért a gramm-mennyiségű rezolválást 20 mg mL⁻¹ enzimmennyiséggel végeztük.

Gramm-mennyiségű rezolválás

A $(2R^*,3S^*)$ -(±)-113 preparatív-mennyiségű rezolválását PS-IM lipáz (enzim:szubsztrát tömegarány 2:1) katalízissel, 0,5 ekv. víz hozzáadása mellett, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on végeztük és kaptuk 2,5 óra után (*konv.* = 50%) kiváló enantiomerfelesleggel és jó termeléssel a termék aminosav {(2S,3R)-76; termelés 45%; $[\alpha]_D^{25} = +6,7$ (c = 0,25; H₂O); ee > 98%} és el nem reagált aminoészter {(2R,3S)-113; termelés 47%; $[\alpha]_D^{25} = -2,9$ (c = 0,26; CHCl₃); ee > 99%} enantiomereket. Szétválasztásukat a már korábbi munkákból ismert, szerves-vizes extrakcióval végeztük. A (2R,3S)-113 18%-os HCl-val végzett hidrolízise eredményezte a kívánt abszolút konfigurációval rendelkező aminosav hidrokloridot {(2R,3S)-76 HCl; $[\alpha]_D^{25} = +15$ (c = 0,3; H₂O); ee > 98%}.

4.3.3. Egy új típusú, két-lépéses enzimes dominó reakció [4]

Az első mondatommal visszautalok a $(3R^*, 4S^*)$ - (\pm) -22 szerves közegű OAc enzimes hidrolíziséhez (4.2.4. pont alatt). Az ott bemutatott enzim-vizsgálat keretében a CAL-B enzim szintén kipróbálásra került, de a kívánt reakcióban igen csekély enantioszelektivitást mutatott. A meglepő az volt, hogy a reakció előrehaladtával a $(3R^*, 4S^*)$ - (\pm) -22 teljesen elfogyott a reakcióelegyből, és ami még ennél is meglepőbb volt, hogy a termék cisz-3-hidroxi-4fenilazetidin-2-on enantiomerfeleslege egyre jobb lett (~20%-ról 98%-ra nőtt). A megfejtésben a (2R,3S)-3-fenilizoszerin [(2R,3S)-76], [$(3R^*,4S^*)$ - (\pm) -23] enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztüli szintézisére kidolgozott direkt enzimes módszerünk (4.3.1.7. pont alatt) segített. A megoldás birtokában, elsőként írtunk le egy olyan új típusú enzimes dominó vagy más néven szekvenciális rezolválást, amely közbeiktatott beavatkozás nélkül zajlódott le, és amelynek során egy racém szubsztrát két, egymást követő reakció eredményeként két különböző enantiomertiszta termékké alakult [4]. A (3R*,4S*)-(±)-22 CAL-B-katalizált szekvenciális rezolválása (44. ábra) feltételezett egy gyors, viszonylag alacsony enantioszelektivitással zajlódó enzimes első lépést (a C-3 észter hidrolízise) és egy jó enantioszelektivitással zajlódó második lépést (a laktámgyűrű hasítása) (45. ábra). A kiváló enantiomerfelesleggel ($ee \ge 98\%$) és jó termeléssel (> 43%) kapott termékeket [(3S,4R)-23 és (2R,3S)-76] a már ismertetett, szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.





Fontos kiemelni, hogy a korábbi irodalmi példákkal ellentétben, a jelen racém szubsztrát két teljesen különböző egysége vett részt a reakciókban: a C-3 észter hidrolízise, valamint az amid kötés hidrolitikus hasítása és keletkezett kiváló enantiomerfelesleggel a két különböző termék [a (3S,4R)-**23** laktám és a gyűrűnyilt Taxol kulcs-intermedier (2R,3S)-**76** aminosav].

Előkísérletek (enzim-, oldószer-, enzim-mennyiség-, enzim újrafelhasználás-vizsgálat)

A $(3R^*,4S^*)$ -(±)-**22** C-3 észter hidrolízisére (4.2.4. pont alatt) utalok vissza, ugyanis ezen új típusú szekvenciális rezolválás az ott bemutatott enzim-vizsgálat során bukkant fel. Az akkor, kipróbálásra került PS-SD, PS-IM, AK, AY, CAL-A lipázok egyike sem katalizálta a laktámgyűrű N1-C2 hasítását, azaz még nyomokban sem volt kimutatható β -aminosav a reakcióelegyekben. A CAL-B (30 mg mL⁻¹) lipáz viszont katalizálta a (3 $R^*,4S^*$)-(±)-**22** (0.05 M) vízzel (0,5 ekv.), *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végzett hidrolízisét, azonban eltérően az összes eddig bemutatott kinetikus rezolválás alapjaitól (2.1. pont alatt), két, egymást követő enzimes reakció játszódott le. Első lépésben zajlódott a C-3 észter hidrolízise, viszonylag alacsony enantioszelektivitás (*ee_{intermedier}* < 20%) mellett és ezt követte az amid kötés kiváló enantioszelektivitású (*E* > 200, 4.3.1.7. pont alatt) hidrolitikus hasítása. A szekvenciális rezolválás eredményeként kaptuk a (3*S*,4*R*)-**23** laktámot és a Taxol kulcs-intermedier, enantiomertiszta (*ee* > 98%) (2*R*,3*S*)-**76** aminosavat (44. ábra). Az átalakulások össz-reakciósebességét az alacsony enantioszelektivitással zajlódó első lépés reakciósebessége határozta meg. Az intermedier (3*S*,4*R*)-**23** laktám

enantiomerfeleslege a reakció előrehaladásával nőtt, a teljes átalakuláskor (teljes-*konv.* = 50%) pedig, elérte a 99%-ot.

Az oldószer-vizsgálat előtt, mivel a két-lépéses rezolválás esetében az *ee* és a konverzió számítása a szokásos úton nem volt lehetséges, ezért a reakciók időbeni előrehaladásáról, valamint a megfelelő enantiomerfeleslegekről a reakcióelegyből, különböző időközönként vett minták gázkromatográfiás analizisével kaptunk információt. A kromatogrammok kiértékelésével pontos képet kaptunk a reakciók előrehaladásáról, pl. a 46. ábra a $(3R^*, 4S^*)$ -(±)-**22** (0,05 M szubsztrát *i*Pr₂O-ben) CAL-B (80 mg mL⁻¹)-katalizált 0,5 ekv. vízzel, 60 °C-on végzett hidrolízisének előrehaladását mutatja be. A teljes átalakulás 48 óra után következett be, enantiomertiszta (3*S*, 4*R*)-**23** és (2*R*3*S*)-**76** termékeket eredményezve (*ee* > 98%).



46. ábra. Mólfrakciók: 22 (♦), 23 (■) és 76 (▲) különböző időpontokban (3 h: 73% 22, 17% 23, 10% 76; 6 h: 51% 22, 29% 23, 20% 76; 21 h: 22% 22, 42% 23, 36% 76; 36 h: 9% 22, 47% 23, 44% 76; 48 h: 0% 22, 50% 23, 50% 76) a (3*R**,4*S**)-(±)-22 CAL-B-katalizált két-lépéses szekvenciális rezolválása során

A követési módszer felállítása után, az ugyanazon körülmények között, különböző oldószerekben (Me₂CO, *t*-BuOMe, *n*-hexán, 1,4-dioxán, Et₂O, toluol és CH₂Cl₂,) elvégzett reakciók eredményeként megállapítottuk, hogy egyik vizsgált oldószerben sem volt gyorsabb az enzimes első lépés (a C-3 észter hidrolízise), mint *i*Pr₂O-ben. Így a ($3R^*$, $4S^*$)-(±)-**22** további előkísérleteit és preparatív-mennyiségű szekvenciális rezolválását *i*Pr₂O-ben végeztük.

Mint ahogy a 32. táblázat adatai mutatják, a leggyorsabb reakciót a viszonylag nagy mennyiségben használt CAL-B enzim esetében tapasztaltuk (6. sor). A nagy mennyiségben használt enzim indokolttá tette az enzim újrafelhasználhatóságának vizsgálatát (3–5. sorok). Az enzim katalitikus aktivitása az enzim többszöri újrafelhasználásával fokozatosan és viszonylag nagy mértékben csökkent, azonban a termékek enantiomerfeleslege látszólag nem változott.

Sor	CAL-B (mg mL ⁻¹)	Reakció- idő (h)	Mólfrakciók (%)			
			22	23	76	
1	30	72	18	45	37	
2	50	54	10	47	43	
3	50 ^b	54	17	44	39	
4	50 ^c	54	28	38	34	
5	50^{d}	54	51	28	21	
6	80	44	3	49	48	

32. táblázat. A $(3R^*, 4S^*)$ - (\pm) - 2^a CAL-B-katalizált hidrolízise különböző enzimmennyiségekkel

^a0,05 M szubsztrát, 0,5 ekv. H₂O, *i*Pr₂O, 60 °C. ^begyszer használt. ^ckétszer használt. ^dháromszor használt.

Gramm-mennyiségű rezolválás

A $(3R^*,4S^*)$ - (\pm) -**22** grammos tételű szekvenciális rezolválását CAL-B (80 mg mL⁻¹)-katalízissel 0,5 ekv. víz hozzáadásával, *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végeztük és kaptuk 58 óra után (össz-*konv.* = 50%) jó termeléssel (43, ill. 49%) a kiváló enantiomerfeleslegekkel rendelkező (2*R*,3*S*)-**76**, Taxol kulcs-intermedier aminosav {[α]_D²⁵ = -7,2 (c = 0,34; H₂O); ee > 98%} és (3*S*,4*R*)-**23** laktám {[α]_D²⁵ = -171 (c = 0,35; CHCl₃); ee > 99%} enantiomereket. A termékek szétválasztását szerves-vizes extrakcióval, ill. szűréssel végeztük.

4.3.4. Továbbalakítások

A direkt enzimes reakciók eredményezte enantiomereket (aminosav, laktám és aminoészter) 18% HCl, ill. 22% HCl/EtOH jelenlétében (pl. 30., 31., 36., 37. és 39. ábrák) a megfelelő aminosav, ill. aminoészter hidrokloridokká alakítottuk. A hidrokloridsókat EtOH/Et₂O elegyéből történő átkristályosítással tisztítottuk. Az átalakítások során még részleges racemizáció sem következett be egyetlen esetben sem. A termékek fizikai jellemzőit a 33. táblázatban tüntettem fel.

Enantiomer ·HCl	Absz. konfig.	ee (%)	$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{25}$	Enantiomer ·HCl	Absz. konfig.	ee (%)	$[\alpha]_{\mathrm{D}}^{25}$
7	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99	-8,4 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	61	R	>99	+8,4 (<i>c</i> 0,47; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	+8,8 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		S	99	-8,6 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)
8	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99	-26 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)	62	R	99	-3,2 (<i>c</i> 0,43; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	+25,8 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)		S	99	+3, 3 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)
9	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99	+121.7 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	63	R	99	-5,2 (<i>c</i> 0,46; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	-121,4 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)		S	99	+5,3 (<i>c</i> 0,46; H ₂ O)

33. táblázat. A továbbalakítások eredményezte enantiomerek fizikai jellemzői

33. táblázat (folytatás)

29	R	>99	-3 (<i>c</i> 0,3; MeOH)	64	R	99	-4,1 (<i>c</i> 0,45; H ₂ O)
	S	99	+3 (c 0,28; MeOH)		S	99	+3,8 (<i>c</i> 0,45; H ₂ O)
30	R	>99	-4,5 (<i>c</i> 0,36; H ₂ O)	65	R	99	-1,2 (<i>c</i> 0,37; H ₂ O)
	S	99	+4 (<i>c</i> 0,28; H ₂ O)		S	99	+1,5 (<i>c</i> 0,47; H ₂ O)
40	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99	-5,1 (<i>c</i> 0,5; H ₂ O)	68	S	89	+6 (<i>c</i> 0,21; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	+5,2 (<i>c</i> 0,5; H ₂ O)		R	>99	-8 (<i>c</i> 0,11; H ₂ O)
41	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	98	-6,1 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)	69	S	87	+12 (<i>c</i> 0,21; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	+6,3 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		R	>99	-15 (<i>c</i> 0,21; H ₂ O)
42	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	96	+12,2 (<i>c</i> 0,5; H ₂ O)	73	1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	99	-10,8 (<i>c</i> 0,6; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	99	-12,9 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	97	+10,7 (<i>c</i> 0,5; H ₂ O)
43	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	99	+3,8 (<i>c</i> 0,4; MeOH)	74	1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	>99	-110,9 (<i>c</i> 0,55; H ₂ O)
	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	99	-3,8 (<i>c</i> 0,3; MeOH)		1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	>99	+111,1 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)
44	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	99	-13,2 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)	75	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	99	-51 (<i>c</i> 0,21; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>	99	+13,4 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	99	+51 (<i>c</i> 0,23; H ₂ O)
45	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	99	+81,6 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)	76	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	>98	-15 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	98	-80,2 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>98	+15 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)
46	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	95	+14,2 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)	84	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	99	-121 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	98	+15,9 (<i>c</i> 0,3; H ₂ O)		1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	99	+123 (<i>c</i> 0,27; H ₂ O)
47	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	98	-5,8 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	101	S	>99	+5,7 (<i>c</i> 0,31; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	>99	+5,7 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	102	S	>99	+5,7 (<i>c</i> 0,34; H ₂ O)
48	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	>99	+27,8 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)	103	S	>99	+7,2 (<i>c</i> 0,315; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	99	-27,5 (<i>c</i> 0,37; H ₂ O)	104	S	>99	+8,9 (<i>c</i> 0,33; H ₂ O)
49	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	>99	+40 (c 0,15; EtOH)	105	S	>99	-8,6 (<i>c</i> 0,31; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	>99	-39 (c 0,17; EtOH)	106	S	>99	-3,9 (<i>c</i> 0,33; H ₂ O)
50	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	>99	-5 (<i>c</i> 0,15; H ₂ O)	107	S	98	-3,6 (<i>c</i> 0,35; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	96	+5 (<i>c</i> 0,25; H ₂ O)	108	S	>99	-4,9 (<i>c</i> 0,32; H ₂ O)
51	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	95	+4 (c 0,14; EtOH)	109	S	>99	-4,6 (<i>c</i> 0,42; H ₂ O)
53	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>	>98	$+15 (c 0,2; H_2O)$	110	S	>99	-3,1 (<i>c</i> 0,33; H ₂ O)
	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>	>98	-15,8 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	111	S	>99	-3,6 (<i>c</i> 0,34; H ₂ O)
55	1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>	>98	+6,2 (<i>c</i> 0,4; H ₂ O)	112	R	97	+10,6 (<i>c</i> 0,31; H ₂ O)
	1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>	>98	$-6 (c 0, 2; H_2O)$				

4.3.5. Diszkusszió

Direkt, lipáz-katalizált szerves közegű módszereket fejlesztettünk ki értékes aminosavak, pl. a ciszpentacin [(1R,2S)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav] és 8 új analóg és homológ származékának a szintézisére (47. ábra). Továbbá, jó enantiomerfelesleggel és jó termeléssel állítottuk elő az Abacavir és Carbovir intermedierjét [(1S,4R)-4-aminociklopent-2-én-1-

karbonsav], valamint a Sitagliptin intermedierjét [(R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluor-fenil)butánsav]. Három különböző enzimes stratégiát dolgoztunk ki a Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének [(2R,3S)-3-fenilizoszerin] enantiomertiszta formában történő szintézisére.





A módszerek közül kettőnek az iparjogvédelme megtörtént. A szerves közegű, lipáz-katalizált indirekt módszerekkel összehasonlítva, a direkt módszereink legfontosabb előnye a termékek nagy termeléssel való előállítása, valamint, hogy míg az indirekt enzimes módszerek eredményezte termékek szétválasztása minden esetben oszlopkromatográfiásan történt, addig a direkt enzimes reakciók eredményezte aminosavak és laktámok, ill. aminosavak és aminoészterek elválasztását igen egyszerű elválasztási protokoll szerint, szerves-vizes extrakcióval vagy szűréssel végeztük. Ez utóbbi alól az egyetlen kivételt a nitrogénen védett γ laktám [(±)-72] rezolválásakor keletkezett termékek oszlopkromatográfiás szétválasztása képezte.

A 4-benzil- $[(\pm)-66]$ és 4-feniletil- $[(\pm)-67)$] szubsztituált β -laktámok kivételével, valamennyi karbociklusos és aciklusos laktám (β és γ) gyűrűnyitását, valamint karbociklusos β -aminoészter hidrolízisét a CAL-B (Lipolase) enzim kiváló enantioszelektivitással, az aciklusos β aminoészterek hidrolízisét pedig minden esetben a *Pseudomonas cepacia* PS (Celitre immobilizált), ill. PS-IM lipáz katalizálta. A CAL-B, laktámok gyűrűnyitása során tanúsított enantiopreferenciája minden esetben ugyanaz volt, jóllehet, látszólagos ellentmondás áll fenn a 3,4-benzo-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on és homológjainak enantioszelektív gyűrűnyitása esetében [(1*R*,2*R*) aminosavak képződtek], ezt azonban a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek prioritási sorrendjének megváltozása magyarázza.

Kiemelem, hogy ugyanaz a CAL-B lipáz különböző enantioszelektivitással katalizálta a β -laktám amid kötésének hasítását és a β -aminoészter hidrolízisét (mindkettő hidrolitikus folyamat), pl. a *cisz* β -laktámok enantioszelektiv gyűrűnyitásakor (1*R*,2*S*)-aminosav, a megfelelő *cisz* β -aminoészterek hidrolízisekor pedig az antipód (1*S*,2*R*)-aminosav képződött.



4.4. Egy új analitikai módszer kidolgozása az enzimes reakciók követésére [4,22]

Általunk dupla derivatizálás (DD) néven bevezetett analitikai módszert (észterezés és ezt követő N-acilezés) dolgoztunk ki különböző *cisz* és *transz* karbociklusos és aciklusos β -aminosavak

[(±)-AS1–AS20] (49. ábra) gázkromatográfiás elválasztására. A módszer segítségével határoztuk meg a mind direkt, mind pedig indirekt enzimes módszerek eredményezte aminosavak enantiomerfeleslegeit, így a zárójelekben az ezekre utaló jelölések szerepelnek.



49. ábra

A racém aminosavat első lépésben diazo-metánnal derivatizáltuk (kizárólag jól szívó fülke alatt, az óvintézkedések szigorú betartásával), azaz addig adtuk a diazo-metán éteres oldatát a derivatizálandó mintához, amíg a sárga szín maradandóvá vált. Akkor, második lépésben savanhidridet [(MeCO)₂O, (EtCO)₂O, (*n*-PrCO)₂O vagy (*n*-pentilCO)₂O] és 4-dimetil-aminopiridin:piridin (1:9) elegyét (15-15 μ L ~0,1 mL 0,05 mólos szubsztráthoz) adtuk a korábbi, már CH₂N₂-al derivatizált mintához. A mindössze néhány másodpercet igénybevevő DD eredményezte [(±)-AS1A–AS20A] mintákat a GC királis oszlopára injektáltuk. A legtöbb esetben alapvonalra történő szétválasztást értünk el (50. ábra) az optimalizált körülmények (34. táblázat) között.





34. táblázat. Módszerek a (±)-AS1A-(±)-AS20A gázkromatográfiás enantioszeparálására

Módszer	Oszlop	Hőmérséklet-program	Hőmérséklet-lépcső	Fej-nyomás (kPa)
Α	L-Val	$100 ^{\circ}\text{C} (10 \text{min}) \rightarrow 160 ^{\circ}\text{C}$	10 °C min ⁻¹	85
В	β-CD	$120 ^{\circ}\text{C} (10 \text{min}) \rightarrow 180 ^{\circ}\text{C}$	10 °C min ⁻¹	100
С	L-Val	$100 \text{ °C} (15 \text{ min}) \rightarrow 140 \text{ °C}$	5 °C min ⁻¹	85
D	β-CD	90 °C (25 min) \rightarrow 150 °C	10 °C min ⁻¹	120
Ε	β-CD	$120 \text{ °C} (7 \text{ min}) \rightarrow 160 \text{ °C}$	10 °C min ⁻¹	120
F	β-CD	$120 \text{ °C} (10 \text{ min}) \rightarrow 150 \text{ °C}$	10 °C min ⁻¹	120
G	β-CD	$120 \text{ °C} (7 \text{ min}) \rightarrow 190 \text{ °C}$	20 °C min ⁻¹	120
H	L-Val	$120 \text{ °C} (7 \text{ min}) \rightarrow 190 \text{ °C}$	20 °C min ⁻¹	140
Ι	L-Val	$120 \text{ °C} (7 \text{ min}) \rightarrow 190 \text{ °C}$	20 °C min ⁻¹	85

34. táblá:	zat (folytatás	r)					
J	L-Val	$120 \degree C (12 \min) \rightarrow 180 \degree C$	10 °C min ⁻¹	140			
K	L-Val	$120 \text{ °C} (15 \text{ min}) \rightarrow 180 \text{ °C}$	10 °C min ⁻¹	100			
L	L-Val	$120 \text{ °C} (2 \text{ min}) \rightarrow 160 \text{ °C}$	20 °C min ⁻¹	160			
М	β-CD	$120 \text{ °C} (4 \text{ min}) \rightarrow 150 \text{ °C}$	20 °C min ⁻¹	120			
N	β-CD	$120 \degree C (7 \min) \rightarrow 190 \degree C$	20 °C min ⁻¹	120			
Kromatográfiás körülmények: oszlop, CP-Chirasil-Dex CB (β-CD) vagy CP-Chirasil L-Val (L-Val)							

A retenciós faktor (k'), szelektivitás (α) és szétválasztás (R_S) értékeket minden vegyületre megadtuk, az optimális körülmények között (35. táblázat).

35. táblázat. A dupla-derivatizált β -aminosavak [(±)-AS**1A**–AS**20A**] enantioszeparálására jellemző adatok: holt-idő (t_0), retenciós faktor (k'), elválasztás (α), rezolválás (R_S) és enantiomerek elúciós sorrendje

Vegyület	Módszer	$t_0(\min)$	k_1	α	R_S	Elúciós sorrend
(±)-1A	Α	1,93	6,93	1,017	2,72	1R, 2S < 1S, 2R
(±)- 2 A	A	1,93	8,62	1,010	1,39	1R, 2S < 1S, 2R
(±)- 3A	В	1,65	11,80	1,006	1,12	1R, 2S, 4R < 1S, 2R, 4S
(±)- 4 A	Α	1,93	7,46	1,012	2,18	1R, 2S < 1S, 2R
(±)- 5 A	A	1,93	9,42	1,010	1,94	1R, 2S < 1S, 2R
(±) -6A	Α	1,93	9,81	1,013	1,69	1R, 2S < 1S, 2R
(±)- 7 A	С	1,93	16,18	1,013	2,69	1R, 2S < 1S, 2R
(±)- 8A	D	1,58	36,42	1,011	1,19	1R, 2S < 1S, 2R
(±) -9A	E	1,66	11,22	1,019	1,77	1S,2R,3S,4R < 1R,2S,3R,4S
(±)- 10A	F	1,66	13,53	1,016	2,25	1R, 2R, 3S, 4S < 1S, 2S, 3R, 4R
(±)-11A	G	1,66	11,15	1,016	2,06	1S, 2S < 1R, 2R
	Н	1,14	16,69	1,013	1,51	1R, 2R < 1S, 2S
(±)-12A	G	1,66	23,82	1,016	1,73	1S, 2S < 1R, 2R
	Н	1,14	15,81	1,014	1,84	1R, 2R < 1S, 2S
(±)- 13A	Ι	1,44	11,17	1,029	1,33	1R, 2R < 1S, 2S
(±)- 14A	J	1,14	11,22	1,007	1,35	R < S
(±)- 15 A	K	1,73	28,02	1,007	0,95	R < S
(±)- 16A	j	1,14	26,19	1,016	1,44	R < S
(±)- 17A	l	0,67	11,32	1,037	1,56	R < S
(±)- 18A	l	0,67	21,46	1,035	1,20	R < S
(±)- 19A	М	1,65	11,51	1,018	1,28	1S, 2S < 1R, 2R
(±)- 20 A	Ν	1,65	7,06	1,009	1,73	1S, 2S < 1R, 2R

Az egyszerű és gyors, enzimes reakcióink követésére kiválóan alkalmas új analitikai módszerre, jóllehet nem kvantitativ meghatározás céljából dolgoztuk ki, jó validálási eredményeket kaptunk

(LOD, LOQ, linearitás, megbízhatóság megismételhetőség). Igen fontosnak tartom kiemelni, hogy az $ee_{\text{számított}}$ (AS12) és $ee_{\text{kísérleti}}$ (AS12A) értékek közötti kiváló korreláció (r² = 0.9998) kizárja a minta DD során elképzelhető legcsekélyebb mértékű racemizációját is (51. ábra).



51. ábra

A DD módszerét a későbbiekben sikeresen alkalmaztuk a Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének enzimes szintézise során, az aminosav enantiomerfeleslegek meghatározására (52. ábra; holt-idő: $t_0 = 1,28$ min, retenciós faktor: k' = 12,32, elválasztás: $\alpha = 1,01$ és rezolválás: $R_S = 1,33$) [4].



52. ábra

5. Összefoglalás

Az enantiomertiszta biológiailag aktív β - és γ -aminosavak jelentősége egyre fokozódik. Munkám ezek nem-vizes közegű, enzimes rezolválással történő előállítására irányult.

I. Egyszerű indirekt enzimes eljárást dolgoztunk ki karbociklusos β -laktámok, így a 7-azabiciklo[4.2.0]oktán-8-on, a 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-4-én-8-on és a 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-3-én-8on rezolválására, N-hidroxi-metilezett-származékaik aszimmetrikus O-acilezésén keresztül [1]. A királis centrum és reakcióhely egymástól való viszonylagos nagy távolsága ellenére, kiváló *S* enantioszelektivitást (E > 200) értünk el, amikor a reakciókat *Pseudomonas cepacia* PS lipáz (Celitre immobilizált) katalízissel, 2 ekv. vinil-butiráttal, acetonban, szobahőmérsékleten végeztük. Az oszlopkromatográfiásan szétválasztott termék enantiomerekből savas hidrolízissel előállítottuk a megfelelő karbociklusos aminosav enantiomereket ($ee \ge 97\%$), míg az enzimes reakcióban el nem reagált N-hidroxi-metil-szubsztituált laktám enantiomerekből NH₄OH/MeOHos kezelésével enantiomertiszta β -laktámokat kaptunk.

2. Az enantiomertiszta Anatoxin-*a* (a nikotinos acetilkolin receptorra sztereospecifikus agonista, igen erős idegméreg) előállítására formális totál-szintézist dolgoztunk ki a 9-(hidroximetil)-9-aza-biciklo[6.2.0]dek-4-én-10-on $[(\pm)-13]$ lipáz-katalizált aszimmetrikus O-acilezésén keresztül [2]. A legjobb enantioszelektivitást (E = 94) akkor értük el, amikor a primer OH acilezését 2 ekv. vinil-acetáttal, Celitre immobilizált PS lipáz jelenlétében, *i*Pr₂O-ben, -15 °C-on végeztük. Az enantiomerdús ($ee \ge 92\%$) észter és alkohol termékeket oszlopkromatográfiás szétválasztásuk után, NH₄OH/MeOH-os kezeléssel alakítottuk a kívánt Anatoxin-*a* intermedierekké ($ee \ge 93\%$). Ugyanakkor, az enzimes reakció eredményezte termékek gyűrűnyitásával, majd ezt követő hidrogénezésével nyolctagú gyűrűs telítetlen és telített β -aminosav származékokat állítottunk elő.

3. Hatékony indirekt enzimes módszert dolgoztunk ki aciklusos β -laktámok, így a 4-fenil- és 4-(*p*-tolil)-2-azetidinonok enzimes rezolválására mind a N-hidroxi-metilezett 4-aril-szubsztituált β -laktámok enantioszelektív acilezésén, mind pedig a N-acetoxi-metilezett-származékok enantioszelektív hidrolízisén keresztül [3]. Azt találtuk, hogy a Celitre immobilizált PS lipáz mind az acilezést (vinil-butiráttal, toluolban, 25 °C-on), mind pedig a deacilezést (EtOH-al, *i*Pr₂O-ben, 40 °C-on) *R* szelektivitással katalizálta. Kiváló enantioszelektivitás ($E_{acilezés}$ és $E_{hidrolízis}$ > 200) jellemezte a 4-fenil-2-azetidinon enzimes rezolválásokat, míg a 4-(*p*-tolil)-2-azetidinon

esetében végzett enzimes rezolválások esetében alacsonyabb értékeket tapasztaltunk ($E_{acilezés} = 57, E_{hidrolízis} = 89$).

4. Kidolgoztuk a racém *cisz*-3-acetoxi-4-fenil-2-azetidinon C3 észter funkció enzimes hidrolízisét szerves oldószerben [4]. Jó enantiomerfelesleggel (ee = 94%) de viszonylag alacsony termeléssel (33%) kaptuk a kívánt abszolút konfigurációjú el nem reagált laktám enantiomert (Taxol oldallánc kulcs-intermedier), amikor a hidrolízist 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *Burkholderia cepacia* lipáz (PS-IM)-katalízissel, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on végeztük (a reakciót 56%-os konverziónál dolgoztuk fel). A termékek szétválasztását oszlopkromatográfiával végeztük.

5. Új, direkt enzimes eljárást adtunk meg a karbociklusos 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-3-én-8-on és a 7-aza-biciklo[4.2.0]okt-4-én-8-on, valamint aciklusos 4-fenil- és 4-(*p*-tolil)-2-azetidinonok rezolválására, szerves oldószerben [5]. Kiváló enantioszelektivitás (E > 200) jellemezte a reakciókat, amikor *Candida antarctica* B lipázt (Novozym 435) használtunk katalizátorként, 2oktanolt nukleofilként, és a reakciókat *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végeztük. Jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 96\%$) és jó termeléssel (39–46%) kaptuk az el nem reagált laktám enantiomereket, azonban a gyűrűnyilt aminoésztereket nem tudtuk izolálni (feltételeztük a termék polimerizációját, hidrolízisét). Jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 96\%$) de igen kis mennyiségben (7–11%) izoláltunk β -aminosavakat. A Novozym 435 enzim laktámok gyűrűnyitása során tanúsított aktivitásának és kiváló enantioszelektivitásának, valamint az alkohol kritikus szerepének megmagyarázására molekula-modellezést végeztünk és azt találtuk, hogy a reakció egy szokatlan átmeneti állapoton keresztül zajlik, amelyben szervesen részt vesz a 2-oktanol (vagy víz), azaz bekötődik a katalitikus hisztidin és a gyorsan reagáló (R)-laktám nitrogénje közé, mintegy hídként helyettesítve a hiányzó kulcsfontosságú hidrogénkötést.

6. Igen hatékony és egyszerű direkt enzimes módszert dolgoztunk ki elsőként 5-8-tagú karbocikusos *cisz* β -aminosavak szintézisére a megfelelő, nem védett β -laktámok szerves közegű enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül [6]. A kiváló enantioszelektivitással (E > 200) zajló reakciókból [*Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissel, 1 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on] jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 93\%$) és jó termeléssel ($\ge 36\%$) kaptuk a termékeket. A módszer egyik nagy előnye, hogy a termék aminosav és el nem reagált laktám enantiomerek szétválasztását egyszerű módon, szerves-vizes extrakcióval végeztük. Az eljárást méretnöveltük és grammos tételben állítottuk elő a gombaellenes aktívitású ciszpentacint [(1R,2S)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav] és másik 3 homológját ($ee \ge 96\%$).

7. Direkt enzimes eljárást dolgoztunk ki az 1,4-etil- és 1,4-etilén-áthidalt új, ciszpentacin származékok előállítására, a megfelelő racém *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2.5}]nonán-4-on és *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2.5}]non-7-én-4-on *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált enantioszelektív (E > 200) gyűrűnyitásán keresztül [7]. Az 1 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-ben, 70 °C-on végzett reakciók, jó enantiomerfelesleggel ($\geq 98\%$) és jó termeléssel ($\geq 40\%$) eredményezte termékeket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.

8. További funkcionalizálás lehetőségét kínálva, telítetlen 5-8-tagú karbociklusos β aminosavakat szintetizáltunk jó termeléssel ($\geq 45\%$) és jó enantiomerfelesleggel ($ee \geq 95\%$), a megfelelő telítetlen β -laktámok *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált enantioszelektív (E > 200) gyűrűnyitásán keresztül. A reakciókat 1 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂-ben, 70 °C-on végeztük [8].

9. Kiváló enantiomerfelesleggel ($ee \ge 96\%$) állítottuk elő a benzociszpentacint és új, hat- ill. héttagú homológjait a megfelelő racém 3,4-benzo-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on, a 4,5-benzo-7-aza-biciklo[4.2.0]oktán-8-on és az 5,6-benzo-8-aza-biciklo[5.2.0]nonán-9-on *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált enantioszelektív (E > 200) gyűrűnyitásán keresztül. A reakciókat 1 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂-ben, 60 °C-on végeztük [9]. Fontos megjegyezni, hogy a Lipolase enantiopreferenciája a korábbiakban bemutatott gyűrűnyitásokhoz képest nem, csupán a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek prioritási sorrendje változott.

10. Környezetkímélő, oldószermentes *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-kalizált eljárást optimalizáltunk mono-, bi- és triciklusos, valamint 4-aril-szubsztituált β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására. A szerves oldószerben végzett reakciókkal összehasonlítva, viszonylag lassúbb reakciókat tapasztaltunk, az enantioszelektivitási értékek azonban változatlanul kiválóak (E > 200) voltak. A reakciókat az enzim mennyiségének növelésével gyorsítottuk, az enzim újrafelhasználásával pedig a módszert gazdaságossá tettük. Az új, "zöld" módszert sikeresen alkalmaztuk a ciszpentacin és különböző származékainak enantiomertiszta formában történő előállítására [10].

11. Elsőként állítottunk elő enantiomertiszta *transz* β-aminosavakat nagy gyűrűtagszámú *transz*-β-laktám enzimes gyűrűnyitásán keresztül ($ee \ge 98\%$) [11]. Kidolgoztuk a *cisz*-13-azabiciklo[10.2.0]tetradekán-14-on rezolválása mellett a *transz*-13-aza-biciklo[10.2.0]tetradekán-14-

on enzim-katalizált enantioszelektív (E > 200) gyűrűnyitását is [*Candida antarctica* B lipáz (Lipolase), 0,5 ekv. hozzáadott víz, *i*Pr₂O, 70 °C].

12. Új, hatékony direkt enzimes módszert optimalizáltunk enantiomertiszta ($ee \ge 95\%$) β -arilszubsztituált β -aminosavak és β -laktámok előállítására a megfelelő 4-aril-szubsztituált β laktámok enantioszelektív hidrolízisén keresztül [12]. Kiváló enantioszelektivitást (E > 200) értünk el, amikor a reakciókat *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalízissel, 1 ekv. hozzáadott vízzel, iPr_2 -ben, 60 °C-on végeztük. Fontos megjegyezni, hogy nem találtunk összefüggést az arilgyűrű szubsztituensének sztérikus és elektronikus természete és laktám gyűrűnyitásának aktiválása közt. A módszert kiterjesztettük a 4-benzil- és 4-fenil-etilszubsztituált β -laktámok rezolválására [13], azonban mindkét esetében viszonylag alacsony enantioszelektivitást ($E \sim 12$) tapasztaltunk az optimalizált körülmények [*Candida antarctica* B lipáz (Lipolase), 0,5 ekv. hozzáadott víz, iPr_2O , 45 °C] között. Így két lépésben végeztük az enzimes rezolválást, és kaptuk jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 87\%$) de viszonylag alacsony termeléssel ($\le 36\%$) a laktám és aminosav termékeket.

13. Hatékony, direkt enzimes stratégiát dolgoztunk ki a racém *cisz*-3-hidroxi-4-fenil-2azetidinon enantioszelektív (E > 200) gyűrűnyitására [4]. A célmolekula (2*R*,3*S*)-3fenilizoszerint, a Taxol oldallánc kulcs-intermedierjét kiváló enantiomerfelesleggel (*ee* > 98%) és jó termeléssel (48%) kaptuk, amikor a hidrolízist 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissel, *t*-BuOMe-ben, 60 °C-on végeztük. A termékeket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.

14. Kidolgoztunk egy új enzimes eljárást mind N-védett, mind pedig szabad NH funkciót tartalmazó γ-laktámok enantioszelektív hidrolízisére [14,15]. Kiváló enantioszelektivitást (E >200) értünk el *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) enzimet használva katalizátorként, 0,5 ekv. vizet nukleofilként és amikor a reakciókat *i*Pr₂O-ben, 30 vagy 65 °C-on végeztük. A jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 96\%$), jó termelés mellett (> 42%) kapott el nem reagált γ -laktámot és gyűrűnyílt γ -aminosavat N-védett termékek esetén oszlopkromatográfiásan, szabad NH funkciót tartalmazó termékek esetén pedig szűréssel választottuk szét. A módszer segítségével preparatív mennyiségben (> 5 g) állítottuk elő az Abacavir és Carbovir (antivirális hatású gyógyszerek) szintézisének kulcs-intermedierjét, az (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1karbonsavat.

15. Új enzimes eljárást dolgoztunk ki karbociklusos *cisz*- és *transz* β-aminoészterek enantioszelektív hidrolízisére, szerves közegben [16,17]. Jó enantioszelektivitást (*E* általában > 100) értünk el, amikor a hidrolízist *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissel, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-en, 65 °C-on végeztük Az eljárással sikeresen állítottunk elő jó termelés mellett mind *cisz* (\geq 42%), mind pedig *transz* (\geq 44%) enantiomertiszta (*ee* \geq 96%) β-aminosavakat (köztük a ciszpentacint).

16. Direkt enzimes eljárást dolgoztunk ki β-aril- [18], β-heteroaril- [19] és β-arilalkilszubsztituált [20] β-aminoészterek enantioszelektív hidrolízisére. Kiváló enantioszelektivitást (E > 100) kaptunk, amikor a reakciókat *Burkholderia cepacia* lipáz [PS (Celitre immobilizált), ill. PS-IM] katalízissel, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, szerves közegben (*i*Pr₂O vagy *t*-BuOMe), viszonylag alacsony hőmérsékleten (25 vagy 45 °C) végeztük. A termék aminoészter és aminosav enantiomereket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét. A módszer segítségével, elsőként állítottuk elő enzimes úton, jó enantiomerfelesleggel (*ee* = 97%) és jó termeléssel (43%) a Sitagliptin intermedier (*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluor-fenil)butánsavat [20].

17. Új, enzimes stratégiát dolgoztunk ki a (2R,3S)-3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionsav (Taxol kulcs-intermedier) előállítására a racém etil-(3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionát) enantioszelektív hidrolízisén keresztül [21]. Kiváló enantioszelektívitást (E > 200) értünk el PS-IM lipázzal, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-ben, 50 °C-on és nyertük jó enantiomerfelesleggel ($ee \ge 98\%$), jó termelés mellett ($\ge 45\%$) a termékeket, melyek szétválasztását szerves-vizes extrakcióval végeztük.

18. Új típusú enzimes szekvenciális reakciót dolgoztunk ki és alkalmaztunk sikeresen a Taxol kulcs-intermedierjének szintézisére. A módszer különlegessége, hogy egy racém szubsztrát, ugyanazon enzim-katalizált két, egymást követő reakció eredményeként két különböző termékké alakul. Így, a *cisz*-3-acetoxi-4-fenil-azetidin-2-on *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált hidrolízise során jó termeléssel (> 43%) kaptuk a két különböző, enantiomertiszta (*ee* \geq 98%) terméket [egyik a (2*R*,3*S*)-3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionsav, a Taxol kulcs-intermedierje] [4]. Fontos kiemelni, hogy a jelen szubsztrát két teljesen különböző egysége vett részt a Lipolase katalízissel, 0,5 ekv. hozzáadott H₂O-el, *i*Pr₂O-en, 60 °C-on végzett átalakításban: a C-3 észter hidrolízise és az amid kötés hidrolítikus hasítása.

19. Általunk dupla derivatizálás (DD) elnevezéssel ismertetett analitikai módszert (észterezés és ezt követő N-acilezés) dolgoztunk ki különböző *cisz* és *transz* karbociklusos és aciklusos β -aminosavak enantioszeparálására [22]. A racém aminosavat derivatizáltuk: első lépésben diazometánnal, második lépésben ecetsav-anhidriddel 4-dimetil-amino-piridin:piridin (1:9) jelenlétében, majd injektáltuk a GC királis oszlopára. A gyors, enzimes reakcióink követésére kiválóan alkalmas analitikai módszert jóllehet nem kvantitativ meghatározás céljából dolgoztuk ki, jó validálási eredményeket kaptunk.

A tézispontok alatt bemutatott direkt és indirekt enzimes módszereinket az irodalmi háttérrel összevetve, szisztematikusan rendszereztük [23,24] és ³¹.

Bizonyítottuk, hogy a szerves közegű enzim-katalizált rezolválások kiválóan alkalmazhatók enantiomertiszta, biológiailag aktív β - és γ -aminosavak előállítására.

6. Az eredmények gyakorlati hasznosítása

Az enantiomertiszta biológiailag aktív anyagok nagy volumenű, gazdaságos előállítása iránti egyre növekvő igény miatt, a kutatás eredményei nemcsak tudományos, hanem gyakorlati szempontokból is jelentősek lehetnek.

Egyszerű és igen hatékony direkt és indirekt enzimes módszereket dolgoztunk ki és alkalmaztunk értékes, enantiomertiszta β - és γ -laktámok és β - és γ -aminosavak szintézisére. Így pl. formális totál-szintézist adtunk meg az enantiomertiszta Anatoxin-*a* szintézisére. Jó enantiomerfelesleggel és jó hozammal állítottuk elő a ciszpentacint [(1*R*,2*S*)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav] és 8 új analóg és homológ származékait. Megvalósítottuk az Abacavir és Carbovir értékes intermedierjének, az (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsavnak a szintézisét. Kidolgoztuk az első enzimes utat a Sitagliptin intermedier (*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluor-fenil)butánsav szintézisére. Több direkt enzimes stratégiát dolgoztunk ki és alkalmaztuk sikeresen a Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének, a (2*R*,3*S*)-3-fenilizoszerinnek az előállítására. A β -aminosav enantiomerek szintézisére kifejlesztett direkt enzimes módszerek némelyikét méretnöveltük, több-grammos tételben (> 5 g) állítottuk elő a kívánt enantiomereket. Ezen vegyületek képezték, képezik az alapját számos együttműködésnek is.

A β -aminosavak szintézisére kidolgozott két, enzimes eljárásunk iparjogvédelme megtörtént [14,16]. A **PCT** WO2007091110 A1 [14] szabadalmat a Szegedi Tudományegyetem hasznosította.

Az általunk kidolgozott enzimes módszerekkel készült enantiomerek közül több mint 20 enantiomerünket az Acros Organics és BioBlocks Inc. vállalatok forgalmazzák.

7.1. Irodalomjegyzék I

Ia: Az értekezés alapját képező közleményeim

- [1] J. Kámán; E. Forró; F. Fülöp, Enzymatic resolution of alicyclic β -lactams, *Tetrahedron:* Asymmetry 2000, 11, 1593-1600.
- [2] **E. Forró**; J. Árva; F. Fülöp, Preparation of (1*R*,8*S*)- and (1*S*,8*R*)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10one: potential starting compounds for the synthesis of Anatoxin-*a*, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 643-649.
- [3] **E. Forró**; F. Fülöp, Synthesis of 4-aryl-substituted β -lactam enantiomers by enzyme-catalysed kinetic resolution, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2351-2358.
- [4] **E. Forró**; F. Fülöp, New Enzymatic two-step cascade reaction for the preparation of a key Intermediate for the Taxol side-chain, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3074-3079.
- [5] S. Park; E. Forró; H. Grewal; F. Fülöp; R.J. Kazlauskas, Molecular basis for the enantioselective ring opening of β-lactams catalyzed by *Candida antarctica* lipase B, Adv. Synth. Catal. 2003, 345, 986-995.
- [6] **E. Forró**; F. Fülöp, Lipase-catalyzed enantioselective ring opening of unactivated alicyclic-fused β -lactams in an organic solvent, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1209-1212.
- [7] **E. Forró**; F. Fülöp, Synthesis of enantiopure 1,4-ethyl- and 1,4-ethylene-bridged cispentacin by lipase-catalyzed enantioselective ring opening of β -lactams, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 573-575.
- [8] E. Forró; F. Fülöp, Advanced procedure for the enzymatic ring opening of unsaturated alicyclic β-lactams, *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, 15, 2875-2880.
- [9] **E. Forró**; F. Fülöp, An efficient enzymatic synthesis of benzocispentacin and its new six- and seven-membered homologues, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2587-2592.
- [10] **E. Forró**; F. Fülöp, Vapour-assisted enzymatic hydrolysis of β -lactams in a solvent-free system, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1005-1009.
- [11] **E. Forró**; F. Fülöp, Do lipases also catalyse the ring cleavage of inactivated cyclic *trans* β -lactams? *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3193-3196.
- [12] **E. Forró**; T. Paál; G. Tasnádi; F. Fülöp, A new route to enantiopure β -aryl-substituted β -amino acids and 4-aryl-substituted β -lactams through lipase-catalyzed enantioselective ring cleavage of β -lactams, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 917-923.
- [13] G. Tasnádi; E. Forró; F. Fülöp, *Candida antarctica* lipase B-catalyzed ring opening of 4-arylalkyl substituted β-lactams, *Tetrahedron: Asymmetry* 2007, *18*, 2841-2844.
- [14] E. Forró; F. Fülöp, Resolution process, PCT WO2009007759 A1 (15.01.2009); Eljárás ciklusos cisz γ-aminosavak és származékaik enantiomereinek előállítására, PO700472 (2007.07.09).
- [15] E. Forró; F. Fülöp, Enzymatic method for the synthesis of blockbaster drug intermediates synthesis of five-membered cyclic γ -amino acid and γ -lactam enantiomers, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 5263-5268.
- [16] **E. Forró**; F. Fülöp, *Enzymatic resolution process for the preparation of cyclic* β *-amino acid and ester enantiomers*, **PCT** WO2007091110 A1 (16.08.2007); *Eljárás ciklusos* β *-aminosavak és észtereik enantiomereinek előállítására*, **PO600101** (2006.02.09).
- [17] **E Forró**; F. Fülöp, The first direct enzymatic hydrolysis of alicyclic β -amino esters: -a route to enantiopure *cis* and *trans* β -amino acids, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6397-6401.

- [18] G. Tasnádi; **E. Forró**; F. Fülöp, An efficient new enzymatic method for the preparation of β -aryl- β -amino acid enantiomers, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 2072-2077.
- [19] G. Tasnádi; E. Forró; F. Fülöp, *Burkholderia cepacia* lipase is an excellent enzyme for the enantioselective hydrolysis of β -heteroaryl- β -amino esters, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20, 1771-1777.
- [20] G. Tasnádi; **E. Forró**; F. Fülöp, An improved enzymatic method for the preparation of valuable β -arylalkyl-substituted β -amino acid enantiomers, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886-895.
- [21] **E. Forró**; F. Fülöp, A new enzymatic strategy for the preparation of (2*R*,3*S*)-3-phenylisoserine: a key intermediate for the Taxol side-chain, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 637-639.
- [22] **E. Forró**, New gas chromatographic method for the enantioseparation of β -amino acids by a quick double-derivatization technique, *J. Chromatogr. A.* **2009**, *1216*, 1025-1029.
- [23] **E. Forró**; F. Fülöp, Direct and indirect enzymatic methods for the preparation of enantiopure cyclic β -amino acids and derivatives from β -lactams, *Mini Rev. Org. Chem.* **2004**, *1*, 93-102.
- [24] E. Forró, β-Laktámok enzim-katalizálta kinetikus rezolválása: direkt és indirekt módszerek, Magy. Kém. Foly. 2006, 112, 39-43.

Ib: Egyéb közleményeim

-Enzimes közlemények, könyvfejezet

- ^{25.} J. Kámán; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1881-1886.
- ^{26.} M. Solymár; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3281-3287.
- ^{27.} T. Paál; E. Forró; A. Liljeblad; L.T. Kanerva; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* 2007, *18*, 1428-1433.
- ^{28.} M. Fitz; E. Forró; E. Vigóczki; L. Lázár; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* 2008, 19, 1114-1119.
- ^{29.} T.A. Paál; A. Liljeblad; L.T. Kanerva; **E. Forró**; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5269-5276.
- ^{30.} T.A. Paál; **E. Forró**; F. Fülöp, A. Liljeblad, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2784-2788.
- ^{31.} L. Kiss; E. Forró; F. Fülöp, Synthesis of carbocyclic β-amino acids, in *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. Vol. 1 (Ed. A. B. Hughes) Wiley-VCH, Weinheim, 2009, pp 367-409.
- ^{32.} M. Utczás; E. Székely; G. Tasnádi; É. Monek; L. Vida; **E. Forró**; F. Fülöp; B. Simándi, J. Supercrit. Fluid **2010**, közlésre beküldve.
- ^{33.} **E Forró**; L. Schönstein; L. Kiss; A.V. Peñaloza; E. Juaristi; F. Fülöp, *Molecules* **2010**, *15*, 3998-4010.

-Enzimes alapanyagokat használó szintetikus közleményeim

- ^{34.} F. Fülöp; **E. Forró**; G.K. Tóth, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4239-4241.
- ^{35.} L. Kiss; E. Forró; G. Bernáth; F. Fülöp, *Synthesis* **2005**, 1265-1268.
- ^{36.} F. Fülöp; M. Palkó; E. Forró; M. Dervarics; T. Martinek, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3214-3220.
- ^{37.} Z. Szakonyi; S. Gyónfalvi; **E. Forró**; A. Hetényi; N.De Kimpe, F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4017-4023.
- ^{38.} L. Kiss; **E. Forró**; F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2855-2858.

- ^{39.} L. Kiss; **E. Forró**; R. Sillanpää; F. Fülöp, J. Org. Chem. **2007**, 72, 8786-8790.
- ^{40.} L. Kiss; B. Kazi; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* **2008**. *49*, 339-342.
- ^{41.} L. Kiss; **E. Forró**; T. Martinek; G. Bernáth; N.De Kimpe; F. Fülöp, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5036-5043.
- ^{42.} G. Benedek; M. Palkó; E. Wéber; T.A. Martinek; E. Forró; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 3724-3750.
- ^{43.} F. Fülöp; F. Miklós; E. Forró, *Synlett* **2008**, 1687-1689.
- ^{44.} L. Kiss; **E. Forró**; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2856-2860.
- ^{45.} L. Kiss; M. Nonn; **E. Forró**; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2605-2608.
- ^{46.} G. Benedek; M. Palkó; E. Wéber; T.A. Martinek; **E. Forró**; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2220-2225.
- ^{47.} B. Kazi; L. Kiss; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 82-85.
- ^{48.} L. Kiss; **E. Forró**; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Synthesis* **2010**, 153-160.
- ^{49.} L. Kiss; **E. Forró**; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3599-3607.
- ^{50.} B. Kazi; L. Kiss; **E. Forró**; I. Mándity; F. Fülöp, *Arkivoc* **2010**, (ix) 31-39.
- ^{51.} M. Palkó; G. Benedek; **E. Forró**; E. Wéber; M. Hänninen; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 957-961.

-Egyéb szintetikus és analítikai közleményeim

- ^{52.} G. Török; A. Péter; E. Forró; F. Fülöp, J. Chromatogr. Sci. 2001, 39, 188-194.
- ^{53.} A. Péter; A. Árki; D. Tourwé; E. Forró; Fülöp F; D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A 2004, 1031, 159-170.
- ^{54.} L. Lázár; Z. Szakonyi; E. Forró; M. Palkó; Z. Zalán; I. Szatmári; F. Fülöp, Acta Pharm. Hung. 2004, 74, 11-18.
- ^{55.} A. Péter; A. Árki; **E. Forró**; F. Fülöp, *Chirality* **2005**, *17*, 193-200.
- ^{56.} R. Berkecz; I. Ilisz; E. Forró; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Chromatogr.* 2006, *63*, S29-S35.
- ^{57.} R. Berkecz; R. Török; I. Ilisz; E. Forró; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Chromatogr.* 2006, 63, S37-S43.
- ^{58.} P. Sun, C. Wang, D.W. Armstrong, A. Péter, E. Forró, J. Liq. Chrom. Rel. Tech. 2006, 29, 1847-1860.
- ^{59.} E. Vass; M. Hollósi; E. Forró; F. Fülöp, *Chirality* **2006**, *18*, 733-740.
- ^{60.} R. Berkecz; A. Sztojkov-Ivanov; I. Ilisz; E. Forró; F. Fülöp; M.H. Hyun; A. Péter, J. Chromatogr. A 2006, 1125, 138-143.
- ^{61.} T.A. Martinek; I.M. Mándity; L. Fülöp; G.K. Tóth; E. Vass; M. Hollósi; **E. Forró**; F. Fülöp, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13539-13544.
- ^{62.} J. Frelek; M. Górecki; A. Suszczyñka; E. Forró; Z. Majer, *Mini Rev. Org. Chem.* 2006, 281-290.
- ^{63.} I. Schuster; A. Koch; M. Heydenreich; E. Kleinpeter; E. Forró; L. Lázár; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1464-1472.
- ^{64.} A. Keresztes; M. Szűcs; A. Borics; K.E. Kövér; E. Forró; F. Fülöp; C. Tömböly; A. Péter; A. Páhi; G. Fábián; M. Murányi; G. Tóth, *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 4270-4279.

- ^{65.} A.R.M. Hyyryläinen; J.M.H. Pakarinen; E. Forró; F. Fülöp; P. Vainiotalo, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009, 20, 1235-1241.
- ^{66.} K. Huang; D.W. Armstrong; E. Forró; F. Fülöp; A. Péter, *Chromatographia* **2009**, *69*, 331-337.
- ^{67.} I. Ilisz; R. Berkecz; E. Forró; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Chirality* **2009**, *21*, 339-348.
- ^{68.} A.R.M. Hyyryläinen; J.M.H. Pakarinen; **E. Forró**; P. Vainiotalo, J. Mass. Spectrom. **2010**, 45, 198-204.
- ^{69.} Z. Patai; R. Berkecz; I. Ilisz; **E. Forró**; F. Fülöp; A. Péter, *Chirality* **2010**, *22*, 120-128.
- ^{70.} Z. Pataj; I. Ilisz; **E. Forró**; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Proc. Chem.* **2010**, *2*, 116-119.
- ^{71.} K. Németh; E. Varga; R. Iványi; J. Szemán; J. Visy; L. Jicsinszky; L. Szente; E. Forró; F. Fülöp; A. Péter; M. Simonyi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 382-388.
- ^{72.} Z. Patai; I. Ilisz; A. Aranyi; **E. Forró**; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Chromatographia* **2010**, *71*, 13-19.
- ^{73.} G. Fodor; I. Ilisz; J. Szemán; R. Iványi; L. Szente; G. Varga; **E. Forró**; F. Fülöp; A, Péter, *Chromatographia* **2010**, *71*, 29-34.
- ^{74.} C.D. Chisholm; F. Fülöp; **E. Forró**; T.J. Wenzel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *közlésre elfogadva*.

7.2. Irodalomjegyzék II

- ^{75.} H.Y. Aboul-Enein; I.W. Wainer, *The impact of stereochemistry on drug development and use*, John Wiley & Sons Inc., 1997, Ch. 1, p. 12.
- ^{76.} D. Stirling, Annu. Rep. Med. Chem. **1995**, 30, 319-327.
- ^{77.} T.D. Stephens; C.J.W. Bunde; B.J. Fillmore, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1489-1499.
- ^{78.} C. Therapontos; L. Erskine; E.R. Gardner; W.D. Figg; N. Vargesson, *PNAS* **2009**, *106*, 8573-8578.
- ^{79.} H.Y. Aboul-Enein; I.W. Wainer, *The impact of stereochemistry on drug development and use*, John Wiley & Sons Inc., 1997, Ch. 1, p. 16.
- ^{80.} R.A. Sheldon, *Green Chem.* **2005**, *7*, 267-278.
- ^{81.} K. Alfonsi; J. Colberg; P.J. Dunn; T. Fevig; S. Jennings; T.A. Johnson; H.P. Kleine; C. Knihgt; M.A. Nagy; D.A. Perry; M. Stefaniak, *Green Chem.* **2008**, *10*, 31-36.
- ^{82.} L. Pasteur, *Compt. rend.* **1853**, *37*, 162.
- ^{83.} Enzyme Nomenclature, IUB, Academic Press, San Diego, 1984.
- ^{84.} V. Gotor-Fernández; V. Gotor, *Use of lipases in organic synthesis*, in *Industrial enzymes*, (Eds. J. Polaina; A.P. McCabe) Springer, 2007, Ch. 18, pp. 301-315.
- ^{85.} K. Drauz; H. Waldmann, *Enzyme catalysis in organic synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2001, Vol. 1.
- ^{86.} U.T. Bornscheuer; R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- ^{87.} A. Hidalgo; U.T. Bornscheuer, In *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnological industries;* (Ed. R.N. Patel) Taylor & Francis Group: Broken, 2007; Ch. 5, pp. 159-180.
- ^{88.} Enzyme Structures Database–European Bioinformatics Institute; updated: December **2009**; http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/

- ^{89.} S. Park; R.J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 432-437.
- ^{90.} Y. Fan; J. Qian, J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2010**, 66, 1-7.
- ^{91.} T. Itoh, *Biotransformation in ionic liquid*, in *Future directions in biocatalysis*, 2007, Ch. 1, pp. 3-20.
- ^{92.} T. Hartmann; E. Schwabe; T. Scheper; D. Combes, *Enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide*, in *Stereoselective biocatalysis*, (Ed. R.N. Patel) Marcel Dekker Inc., New York Basel 2000, pp. 799-839.
- 93. S. Keskin; D. Kayrak-Talay; U. Akman; O. Hortaçsu, J. Supercrit. Fluids 2007, 43, 150-180.
- ^{94.} G. Fernández-Lorente; R. Fernández-Lafuente; P. Armisén; P. Sabuquillo; C. Mateo; J.M. Guisán, *Engineering of enzymes via immobilization and post-immobilization techniques: preparation of enzyme derivatives with improved stability in organic media*, in *Methods in non-aqueous enzymology*, (Ed. M.N. Gupta) Birkhäuser Verlag, Basel - Boston - Berlin 2000, pp. 36-52.
- ^{95.} J.A. Bosley; A.D. Peilow, *Immobilization of lipases for use in non-aqueous reaction systems*, in *Methods in non-aqueous enzymology*, (Ed. M.N. Gupta) Birkhäuser Verlag, Basel - Boston -Berlin 2000, pp. 52-70.
- ^{96.} J.A. Khan; E.N. Vulfson, *Microencapsulation of enzymes and cells for non-aqueous biotransformations*, in: E.N. Vulfson; P.J. Halling; H.L. Holland: *Enzymes in nonaqueous solvents: methods and protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001. pp. 31-41.
- ^{97.} K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, 3rd Edition, Berlin, Germany, 1997, pp. 36-42.
- ^{98.} K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, 3rd Edition, Berlin, Germany, 1997, pp. 47-49.
- ^{99.} Y. Simeó; W. Kroutil; K. Faber, K. In *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnological industries*, (Ed. R.N. Patel), Taylor & Francis Group: Broken, **2007**; Ch. 2, pp. 27-51.
- ^{100.} C. Wolf, *Dynamic stereochemistry of chiral compounds. Principles and applications*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008, Ch. 7, pp. 359-365.
- ^{101.} B. Martin-Matute; J.-E. Bäckvall, *Dynamic kinetic resolutions*, in: V. Gotor; I. Alfonso; E. García-Urdiales: *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. pp. 89-115.
- ^{102.} S.F. Mayer; W. Kroutil; K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332-339.
- ^{103.} L.F. Tietze, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136.
- ^{104.} G.H. Müller, A. Lang, D. R. Seithel, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2513-2522.
- ^{105.} S. Akai, T. Naka, S. Omura, K. Tanimoto, M. Imanishi, Y. Takebe, M. Matsugi, Y. Kita, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4255-4264.
- ^{106.} A. Torres-Gavilán; J. Escalante; I. Regla; A. López-Munguía; E. Castill, *Tetrahedron: Asymmetry* 2007, 18, 2621-2624.
- ^{107.} G.M. Ramos-Tombo; H.P. Schär; B.X. Fernandez; O. Ghisalba, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5707-5710.
- ^{108.} Z.W. Guo; S.H. Wu; C.S. Chen; G. Girdaukas; C.J. Sih, J. Am. Chem. Soc. **1990**, 112, 4942-4945.
- ^{109.} G. Caron; R.J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1995-2000.
- ^{110.} P. Virsu; A. Liljeblad; A. Kanerva, L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2447-2455.
- ^{111.} H. Nohira; K. Hara; K. Nagashima; T. Hayashibara, *Eur. Pat. Appl.*, EP 590685 A1, **1994**, 9 pp.
- ^{112.} E. Forró; K. Lundell; F. Fülöp; L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3095-3099.

- ^{113.} E. Forró; L.T. Kanerva; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 513-520.
- ^{114.} E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1985-1993.
- ^{115.} E. Forró; Z. Szakonyi; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4619-4626.
- ^{116.} 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. 133-171.
- ^{117.} R.J. Kazlauskas; A.N.E. Weissfloch; A.T. Rappaport; L.A.A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- ^{118.} A. Ghanem; H.-Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.
- ^{119.} 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. 133-171.
- ^{120.} W. Uyttenbroeck; D. Hendriks; G. Vriend; I.D. Baere; L. Moens; S. Scharpe, *J. Biol. Chem.* **1994**, *374*, 245-254.
- ^{121.} U. Bornscheuer; O.W. Reif; R. Lausch; R. Freitag; T. Cheper; F.N. Kolisis; U. Menge, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1201*, 55-60.
- ^{122.} K.K. Kim; H.K. Song; D.H. Shin; K.Y. Hwang; S.W. Suh, *Structure*, **1997**, *5*, 173-185.
- ^{123.} J.D. Schrag; L. Yunge; M. Cygler; D. Lang; T. Burgdoff; H.J. Hecht; R. Schmid; D. Schomburg;
 J.J. Rydel; J.D. Oliver; L.C. Strickland; M. Dunaway; S.B. Larson; A. McPherson, *Structure*,
 1997, *5*, 187-202.
- ^{124.} T. Schulz; J. Pleiss; R.D. Schmid, *Prot. Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062.
- ^{125.} M. Luić; S. Tomić; I. Leščić; E. Ljubović; D. Šepac; V. Šunjić; L. Vitale1; W. Saenger; B. Kojić-Prodić, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3964-3973.
- ^{126.} S. Tomić; B. Bertoşa; B. Kojić-Prodić; I. Kolosvary, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1163-1172.
- ^{127.} A. Mezzetti; J.D. Schrag; C.S. Cheong; R.J. Kazlauskas, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 427-437.
- ^{128.} E. Henke; J. Pleiss; U.T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3211-3213.
- ^{129.} X. Grabuleda; C. Jaime; A. Guerrero; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3675-3683.
- ^{130.} M. Cygler; P. Grochulski; R.J. Kazlauskas; J.D. Schrag; F. Bouthillier; B. Rubin; A.N. Serreqi; A.K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186.
- ^{131.} Q. Ying; R.J. Kazlauskas, *Chirality*, **2008**, *20*, 724-735.
- ^{132.} A.N.E. Weissfloch; R.J. Kazlauskas, J. Org. Chem. **1995**, 60, 6959-6969.
- ^{133.} J. Uppenberg; M.T. Hansen; S. Patkar; T.A. Jones, *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.
- ^{134.} J. Uppenberg; N. Oehrner; M. Norin; K. Hult; G.J. Kleywegt, S. Patkar; V. Waagen; T. Anthonsen; T.A. Jones, *Biochem.*, **1995**, *34*, 16838-16851.
- ^{135.} C. Orennius; N. Oehmer; D. Rotticci; A. Mattison; K. Hult; T. Norin, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1217-1220.
- ^{136.} S. Raza; L. Fransson; K. Hult, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 329-338.
- ^{137.} E. Valente; J.R.B. Gomes; R. Moreira; J. Iley, J. Org. Chem. **2004**, 69, 3359-3367.
- ^{138.} F. Hæffner; T. Norin; K. Hult, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1251-1262.
- ^{139.} S. Tomić; B. Kojić-Prodić, J. Mol. Graph. Model. 2002, 21, 241-252.

- ^{140.} F. Hæffner; T. Norin, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 591-600.
- ^{141.} P.B. Juhl; P. Trodler; S. Tyagi; J. Pleiss *BMC Structural Biology* **2009**, doi:10.1186/1472-6807-9-38 (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0).
- ^{142.} K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, 3rd Edition, Berlin, Germany, 1997, pp. 27-29.
- ^{143.} U.T. Bornscheuer; R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, 1999, p. 15.
- ^{144.} D. Rotticci; J. Ottosson; T. Norin; K. Hult, *Candida antarctica lipase B: A tool for the preparation of optically active alcohols*, in: E.N. Vulfson, P.J. Halling, H.L. Holland, *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*, Humana Press: Totowa, NJ, 2001, pp. 244-261.
- ^{145.} P.F. Mugford; U.G. Wagner; Y. Jiang; K. Faber; R.J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8782-8793.
- ^{146.} M.-J. Kim; Y.I. Chung; Y.K. Choi; H.K. Lee; D.Kim; J. Park; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11494-11495.
- ^{147.} A. Zaks; A.M. Klibanov, *Science*, **1984**, *224*, 1249-1251.
- ^{148.} A.M. Klibanov, *Chemtech.* **1986**, *16*, 354-359.
- ^{149.} A.M. Klibanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144.
- ^{150.} A.M. Klibanov, *Nature*, **2001**, *49*, 241-246.
- ^{151.} J.A. Jongejan, *Effect of organic solvents on enzyme selectivity*, In G. Carrea; S. Riva, *Organic Synthesis with enzymes in non-aqueous media*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; Ch. 2, pp. 25-46.
- ^{152.} A. Zaks; A.M. Klibanov, J. Biol. Chem. **1988**, 263, 8017-8021.
- ^{153.} F. Theil, *Enantioselective lipase-catalysed transesterifications in organic solvents*, in: E.N. Vulfson; P.J. Halling; H.L. Holland, *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*, Humana Press: Totowa, NJ, 2001. pp. 261-276.
- ^{154.} N.G. Muniswar; R. Ipsita, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575-2583.
- ^{155.} S. Tawaki; A.M. Klibanov, J. Am. Chem. Soc. **1992**, 114, 1882-1884.
- ^{156.} Y. Hirose; K. Kariya; I. Sasaki; Y. Kurono; H. Ebiike; K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7157-7160.
- ^{157.} C.R. Wescott; A.M. Klibanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 1-9.
- ^{158.} G. Carrea; S. Riva, Angew. Chem. Int. Ed. **2000**, 39, 2226-2254.
- ^{159.} U.T. Bornscheuer; R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH: Weinheim, 2006, pp. 25-42.
- ^{160.} R. Carlson, *Design and optimization in organic synthesis, Vol.* 8, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1992.
- ^{161.} A. Zaks; A.M. Klibanov, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1985**, 82, 3192-3196.
- ^{162.} K. Watanabe; T. Yoshida; S. Ueji, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 504-515.
- ^{163.} P. Trodler; R.D. Schmid; J. Pleiss, *BMC Structural Biology*, 2009, 9, doi:10.1186/1472-6807-9-38.
- ^{164.} S. Daluge, R.V. Robert, J. Org. Chem. **1978**, 43, 2311-2320.
- ^{165.} N. Namura; H. Ogura; T.J. Kinoshita, *Chromatogr.* **1980**, 202, 375-379.
- ^{166.} J.L.L. Rakels; A.J.J. Straathof; J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051-1056.
- ^{167.} Program "Selectivity" by K. Faber, H. Hoenig, http://www.orgc.TUGraz.at

- ^{168.} C.A. Godoy; B. Rivas; M. Filice; G. Fernández-Lorente; J.M. Guisan; J.M. Palomo, *Process. Biochem.* **2010**, *45*, 534-541.
- ^{169.} J.M. Palomo, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1-14.
- ^{170.} F. Fülöp, In *Studies in Natural Product Chemistry* Vol. 22, Atta-ur-Rahman, (Ed.) Elsevier Science Publishers, 2000, pp. 273-306.
- ^{171.} F. Fülöp, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181-2204.
- ^{172.} M. Liu; M.P. Sibi, *Tetrahedron* **2002**, *40*, 7991-8035.
- ^{173.} R.C. Lloyd; M.C. Lloyd; M.E.B. Smith; K.E. Holt; J.P. Swift; P.A. Keene; S.J.C. Taylor; R. McCague. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 717-728.
- ^{174.} E. Juaristi; V.A. Soloshonok, *Enantioselective synthesis* of β -amino acids, 2nd Edition, Wiley-Interscience: New York, NY, USA, 2005.
- ^{175.} C. Palomo; A. Claudio; M. Jesus; I. Ganboa; M. Oiarbide, *Synthesis of β-amino acids and their derivatives from β-lactams: Update*, in: E. Juaristi; V.A. Soloshonok, *Enantioselective Synthesis of β-Amino Acids*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, 2005, pp. 477-495.
- ^{176.} J.A. Miller, S.T. Nguyen, *Mini Rev. Org. Chem.* **2005**, *2*, 39-45.
- ^{177.} A. Liljeblad, L.T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.
- ^{178.} B. Alcaide; P. Almendos; C. Aragoncillo, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4437-4492.
- ^{179.} M.T. Aranda; P. Perez-Faginas; R. Gonzalez-Muniz, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 325-341.
- ^{180.} S.J. Collier; M.A.K. Vogel; B.J. Wong; N.K. Modukuru, *Biocatalytic approaches to chiral heterocycles*, in: G.W. Gribble; J.A. Joule, *Progress in heterocyclic chemistry* (21), Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Tokyo, Elsevier Science & Technology, 2009. Ch. 1, pp. 1-34.
- ^{181.} J. Bandala; E. Juaristi *Recent developments in the synthesis of* β *-amino acids*, in: A.B. Hughes, *Amino Acids, peptides and proteins in organic chemistry*, Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, 2009, pp. 291-365.
- ^{182.} R. Csuk, P. Dörr, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 269-276.
- ^{183.} C.T. Evans, S.M. Roberts, M. Stanley, *Eur. Pat. Appl.* (1991), 7 pp. EP 424064 A1.
- ^{184.} S.J.C. Taylor, R. McCague, R. Wisdom, C. Lee, K. Dickson, G. Ruesroft, F. O'Brien, J. Littlechild, J. Bevan, S.M. Roberts, C.T. Evans, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1117-1128.
- ^{185.} A.D. Brabban; J. Littlechild; R. Wisdom, J. Ind. Microbiol. Biotech. **1996**, 16, 8-14.
- ^{186.} K.E. Holt-Tiff, *Chem Taday* **2009**, *27*, 23-25.
- ^{187.} N.H. Cromwell; B. Philips, *Chem. Rev.* **1979**, *79*, 331-358.
- ^{188.} E.L. Setti; R.G. Micetich, *Curr. Med.Chem.* **1998**, *5*, 101-113.
- ^{189.} M.M. Neuhauser; L.H. Danziger, *Beta-lactam antibiotics*, in: S.C. Piscitelli; K.A. Rodvold: *Drug interactions in infectious diseases*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001. pp. 151-184.
- ^{190.} L. Kiss; F. Fülöp, *Synlett*, **2010**, 1302-1314.
- ^{191.} H.L. Mansell, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6025.
- ^{192.} P.J. Parsons; N.P. Camp; N. Edwards; L.R. Sumoreeah, *Tetrahedron* **2000**, 56, 309-315.
- ^{193.} T.-L. Ho; E. Zinurova, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 134-137.
- ^{194.} Trost, B. M.; Oslob, J. D. J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 6936-6937.
- ^{195.} T. Wegge; S. Schwarz; G. Seitz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1405-1410.

- ^{196.} N.A. Arbella; K. O'Callaghan; A. Furey; K.J. James, *Chemistry of cyanobacterial neurotoxins-Anatoxin-a: synthetic approaches*, in: L.M. Botana, *Phycotoxins*, Ames: Blackwell Publishing Professional, 2007. pp. 119-139.
- ^{197.} M. Zegarac; E. Mestrovic; N.K. Hulita; D. Filic; M. Dumic; A. Grunenberg; B. Keil; H. Ceric, *PCT Int. Appl. WO 2005100302 A1*, 2005.
- ^{198.} Z. Hameršak; M. Roje; A. Avdagić; V. Šunjić, *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 635-644.
- ^{199.} T. Iwamoto; E. Tsujii; M. Ezaki; A. Fujie; S. Hashimoto; M. Okuhara; M. Kohsaka; H. Imanaka; K. Kawabata; Y. Inamoto; K. Sakane; *J. Antibiotics*, **1990**, *43*, 1-7.
- ^{200.} K. Kawabata; Y. Inamoto; K. Sakane; T. Iwamoto; S. Hashimoto, *J. Antibiotics*, **1990**, *43*, 513-518.
- ^{201.} M. Konishi; M. Nishio; K. Saitoh; T. Miyaki; T. Oki; H. Kawaguchi, *J. Antibiotics* **1989**, *42*, 1749-1755.
- ^{202.} T. Oki; M. Hirano; K. Tomatsu; K. Numata; H. Kamei, J. Antibiotics **1989**, 42, 1756-1762.
- ^{203.} T. Hashimoto; S. Kondo; T. Takita; M. Hamada; T. Takeuchi; Y. Okami; H. Umezawa, J. *Antibiot.* **1968**, *21*, 653-658.
- ^{204.} M.E. Bunnage, T. Ganesh, I.B. Masesane, D. Orton, P.G. Steel, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 239-242.
- ^{205.} E. Abraham; S.G. Davies; A.J. Docherty; K.B. Ling; P.M. Roberts; A.J. Russel; J.E. Thomson; S.M. Toms, *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 1356-1362.
- ^{206.} P. Kapferer; A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2764-2789.
- ^{207.} P.H. Carter, U.S. Pat. Appl. 2005/277,666, 2005; [*Chem. Abstr.* **2005**, *144*, 51452].
- ^{208.} S. Gedey; J. Van der Eycken; F. Fülöp, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1967-1969.
- ^{209.} I. Kanizsai; S. Gyónfalvi; Z. Szakonyi; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Green Chem.* **2007**, *9*, 357-360.
- ^{210.} J.L.Price; W.S. Horne; S.H. Gellman, J. Am. Chem. Soc. **2007**, 129, 6376-6377.
- ^{211.} I.M. Mándity; E. Wéber; T.A. Martinek; G. Olajos; G.K. Tóth; E. Vass; F. Fülöp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2171-2175.
- ^{212.} F. Fülöp, T.A. Martinek; G.K. Tóth, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, **35**, 323-334.
- ^{213.} E. Torres; C. Acosta-Silva; F. Rua; A. Alvarez-Larena; T. Parella; V. Branchadell; R.M. Ortuno, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5669-5675.
- ^{214.} D. Haldar, *Curr. Org. Synth.* **2008**, *5*, 61-80.
- ^{215.} D. Fernández; E. Torres; F.X. Avilés; R.M. Ortuňo; J. Vendrell, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3824-3828.
- ^{216.} L.T. Kanerva; P. Csomós; O. Sundholm; G. Bernáth; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1705-1716.
- ^{217.} P. Csomós; L.T. Kanerva; G. Bernáth; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1789-1796.
- ^{218.} S.G. Cohen; Y. Sprinzak; E. Khedouri, J. Am. Chem. Soc. **1961**, 83, 4225-4228.
- ^{219.} S.G. Cohen; S.Y. Weinstein, J. Am. Chem. Soc. **1964**, 86, 725-728.
- ^{220.} C. Evans; R. McCague, S.M. Roberts; A.G. Sutherland; R. Wisdom, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 2276-2277.
- ^{221.} D.L. Crittenden, A. Park, J. Qiu, R.B. Silverman, R.K. Duke, G.A. R. Johnston, M.J.T. Jordan, M. Chebib, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 447-455.
- ^{222.} M. Ordonez, C. Cativiela, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 3-99.

- ^{223.} S. Ramanathan, G. Shen, J. Hinkle, J. Enejosa, B. P. Kearney, *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2007**, *46*, 160-166.
- ^{224.} L.J. Waters, G. Moyle, S. Bonora, A.D'Avolio, L. Else, S. Mandalia, A. Pozniak, M. Nelson, B. Gazzard, D. Back, M. Boffito, *Antivir. Ther.* **2007**, *12*, 825-830.
- ^{225.} M. A. Wainberg, J. L. Martinez-Cajas, B. G. Brenner, *Fut. HIV Ther.* **2007**, *1*, 291-313;
- ^{226.} J. Weiss, N. Weis, N. Ketabi-Kiyanvash, C.H. Storch, G. Caroline, W.E. Haefeli, *Eur. J. Pharm.* **2008**, *579*, 104-109.
- ^{227.} M. Freiria, A.J. Whitehead, W.B. Motherwell, *Synthesis* **2005**, 3079-3084.
- ^{228.} N. Venhoff, B. Setzer, K. Melkaoui, U. A. Walker, *Antivir. Ther.* **2007**, *12*, 1075-1085.
- ^{229.} B.G. Roy, P.K. Jana, B. Achari, S.B. Mandal, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1563-1566.
- ^{230.} P.S. Hervey; C.M. Perry, *Drugs* **2000**, *60*, 447-479.
- ^{231.} J. Melroy, V. Nair, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3847-3852.
- ^{232.} S.R. Nagarajan; B. Devadas; J.W. Malecha; H. Lu; P.G. Ruminski; J.G. Rico; T.E. Rogers; L.D. Marrufo; J.T. Collins; H.P. Kleine; M.K. Lantz; J. Zhu; N.F. Green; M.A. Russel; B.H. Landis; L.M. Miller, D.M. Meyer, T.D. Duffin, V.W. Engleman, M.B. Finn, S.K. Freeman, D.W. Griggs; M.L. Williams; M.A. Nickols; J.A. Pegg; K.E. Shannon; C. Steininger; M.M. Westlin; G.A. Nickols; J.L. Keene, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3783-3800.
- ^{233.} E.C. Lawson; W.J. Hoekstra; M.F. Addo; P. Andrade-Gordon; B.P. Damiano; J.A. Kauffman; J.A. Mitchell; B.E. Maryanoff *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2619-2622.
- ^{234.} B.P. Damiano; J.A. Mitchell; E. Giardino; T. Corcoran; B.J. Haertlein, L. de Garavilla; J.A. Kauffman; W.J. Hoekstra; B.E. Maryanoff; P. Andrade-Gordon *Thromb. Res.* **2001**, *104*, 113-126.
- ^{235.} J. Hanson ; X. de Leval ; J.-L. David ; C. Supuran ; B. Pirotte ; J.-M. Dogné *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* **2004**, *2*, 157-167.
- ^{236.} S. Yan; G. Larson; J. Z. Wu; T. Appleby; Y. Ding; R. Hamatake; Z. Hong; N. Yao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 63-67.
- ^{237.} C. Bachand; M. Belema; D.H. Deon; A.C. Good; J. Goodrich; C.A. James, R. Lavoie; O.D. Lopez; A. Martel; N.A. Meanwell; V.N. Nguyen; J.L. Romine; E.H. Ruediger; L.B. Snyder; D.R. St. Laurent; F. Yang; D.R. Langley; L.G. Hamann, US Patent 0044379, 2008.
- ^{238.} N.A. Thornberry; A.E. Weber, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 557-568.
- ^{239.} A.E. Weber, J. Med. Chem. **2004**, 47, 4135-4141.
- ^{240.} S.H. Havale, M. Pal, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1783-1802.
- ^{241.} J. Xu; H.O. Ok; E.J. Gonzalez; L.F. Colwell Jr; B. Habulihaz; H. He; B. Leiting; K.A. Lyons; F. Marsilio; R.A. Patel; J.K. Wu; N.A. Thornberry; A.E. Weber; E.R. Parmee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 4759-4762.
- ^{242.} K.B. Hansen; J. Balsells; S. Dreher; Y. Hsiao; M. Kubryk; M. Palucki; N. Rivera; D. Steinhuebel; J.D. Armstrong III; D. Askin; E.J.J. Grabowski, *Org. Proc. Res. Dev.*, **2005**, 9, 634-639.
- ^{243.} T.M.V.D. Pinho e Melo; A.L. Cardoso; F. Palacios; J.M. de los Santos; A.A.C.C. Pais; P.E. Abreu; J.A. Paixa; A.M. Beja; M.R. Silva, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 8141-8148.
- ^{244.} K.B. Hansen; Y. Hsiao; F. Xu; N. Rivera; A. Clausen; M. Kubryk; S. Krska; T. Rosner; B. Simmons; J. Balsells; N. Ikemoto; Y. Sun; F. Spindler; C. Malan; E.J.J. Grabowski; J.D. Armstrong III, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8798-8804.
- ^{245.} D.G.I. Kingston, D.J. Newman, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **2007**, *10*, 130-144.
- ^{246.} J.C. Borah; J. Boruva; N.C. Barua, *Curr. Org. Synth.* **2007**, *4*, 175-199.

- ^{247.} R. Brieva; J.Z. Crich; C.J. Sih, J. Org. Chem. **1993**, 58, 1068-1075.
- ^{248.} Y. Kuge; K. Shioga; T. Sugaya; S. Tomioka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 1157-1161.
- ^{249.} H. Nakano; Y. Okuyama; K. Iwasa; H. Hongo, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2381-2384.
- ^{250.} U.T. Bornscheuer, *Chem. Biotech.* **2002**, 543-547.
- ^{251.} F. Fülöp, M. Palkó, J. Kámán, L. Lázár, R. Sillanpää, *Tetrahedron: Asymmetry* 2000, *11*, 4179-4187.
- ^{252.} Z.C. Gyarmati; A. Liljeblad; M. Rintola; G. Bernáth; L.T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3805-3814.
- ^{253.} H. Li; A. Argade; R. Singh; S. Thota; D. Carroll; K. Tso; V. Taylor; J. McLaughlin; V. Markovstov, *PCT Int. Appl. WO 2005/118544 A2*, 2005.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Bernáth Gábor professzor úrnak, hogy 1993 novemberében felvett az általa vezetett Intézetbe. Hálával gondolok vissza a kezdetekre.

Tanító mesteremnek, Fülöp Ferenc professzor úrnak köszönöm, hogy megelőlegezte bizalmát, hogy hitt bennem. Szigorúan irányított, tanított, kritizált. És arra is volt példa, hogy azt mondta "nem is olyan rossz". És megcsinálta, megcsináltuk a Labort, a jól működő Enzimes Labort. Külön köszönöm megtisztelő barátságát.

Köszönöm Liisa T. Kanerva professzor asszonynak, hogy a Turkui Egyetemen töltött 10 hónapos tanulmányutam alatt rámutatott az enzimekkel kikövezett útra, hogy kalauzolt és bátorított az új munka útvesztőjében.

Köszönetet mondok Kurt Faber professzor úrnak, aki 1999 tavaszán fogadott munkacsoportjába, és akinél 2 hónap alatt megtanultam, hogy a sütő-élesztőt nemcsak háziasszonyok használják.

Romas J. Kazlauskas professzor úrnak köszönöm, hogy a McGill Szerves Kémia Intézetében az enzimes csapatának tagjává fogadott 2001-ben, fél évre, hogy az ott folyó munkákba betekintést engedett, hogy több-szemmel láthattam a körülöttem és általam változó világot.

Köszönet illeti a SZTE Gyógyszerkémiai Intézetének enzimes csoportjában végzett PhD hallgatókat, Dr. Kámán Juditot, Dr. Solymár Magdolnát, Dr. Fitz Mónikát és a jelenleg PhD doktori értekezésüket író Paál Tihamért és Tasnádi Gábort, valamint Schönstein László jelen doktoranduszt, akik megbízhatóan és lelkesen vettek részt a munkákban, hozzájárultak kutatási eredményeink eléréséhez.

Sok kiindulási racemát szintéziséért mondok köszönetet Árva Judit vegyész üzemmérnöknek, aki nem csak mondja, hogy "amit megtehetsz ma, ne halaszd holnapra".

Mosolyukért köszönetet mondok minden kedves kollégámnak és barátomnak.

Köszönöm a Magyar Tudományos Akadémia (Békésy György Posztdoktori Ösztöndíj, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj), a Magyar Ösztöndíj Bizottság (Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj), az Oktatási Minisztérium (FKFP 0115/2001) és az OTKA (46440, 71938) anyagi támogatását.

Köszönetet szeretnék mondani Édesapámnak, aki a távolság ellenére is mindvégig velem volt, akivel megoszthattam mind a jó, mind a kevésbé jó híreket, és aki velem örült vagy éppen bíztatott, ha kellett. Köszönöm.