

Forró Enikő „Új enzimes stratégiák laktám és aminosav enantiomerek szintézisére” című MTA doktori értekezésének opponensi véleménye

Forró Enikő értekezésében az enzimkatalizálta reakciók nagy változatosságát mutatja be, egy-egy reakcióhoz jól átgondolt stratégiát javasol, ami mind a kutatásban mind az iparban felbecsülhetetlen újabb szintézis lehetőségeket biztosíthat. Személyében Bernáth Gábor és Fülöp Ferenc nyomdokában, az általuk kialakított hagyományok egyik méltó követőjét üdvözölhetjük.

Az értekezés a gyógyszeripar egyik igen fontos kutatási területével, az enantiomerek elválasztásával kapcsolatos új kutatási eredményekről számol be. A kémikusok újabb és újabb gyógyszerek kutatása során igen nagyszámú új, addig nem ismert molekulát állítanak elő, melyek egy részét más szakemberek kiválasztják, a várható hatás reményében. A kiválasztott molekulák nem ritkán megadott konfigurációjú királis vegyületek, melyeknek az antipódjai (tükörképi párjai) hatástalanok, talán még kedvezőtlen tulajdonságúak is, így csak a kedvező enantiomer fejleszthető gyógyszerre. A további vizsgálatokhoz a kiválasztott enantiomert a néhány mg helyett több 10 g-os, majd kilogrammos méretben is elő kell állítani és kedvező esetben már gyógyszerhatóanyagként, egy egy üzemi sarzs a 100kg-os méretet is jelentősen meghaladhatja. Belátható, hogy ha csak nem áll rendelkezésre valamilyen jól hozzáférhető királis intermedier, akkor az enantiomerünkhöz csak a szintézis során keletkező valamelyik racém vegyület reszolválásával juthatunk. Ha az eredeti szintézis (mellyel a néhány mg. enantiomert nyertük pl. királis HPLC-vel) során nincs reszolválható racém intermedier, akkor másik utat kell keresni és nem ritka, hogy akár a fejlesztés során ezért több szintézisutat is ki kell dolgozni. Végül az ipari gyártáshoz akár az originátor, de a generikus gyártó (vagy gyártók) feltétlenül újabb eljárásokat dolgoznak ki, melyek egyik célja a kedvezőbb enantiomer elválasztás megvalósítása. Egyre gyakoribb lesz, hogy a megfelelő prokirális intermedierből királis katalizátor alkalmazásával nyerik, igen gazdaságos eredménnyel, a végtermékhez szükséges enantiomert, de az ilyen eljáráshoz meg kell találni a katalizátort, aminek a kifejlesztése legtöbbször csak az ipari gyártás kidolgozása során vagy az után történhet meg. Látjuk, hogy a királis gyógyszer hatóanyag előállításához a legtöbb esetben egy racém vegyület kívánt enantiomerjének az elkülönítését kell megoldani. és ennek a

diasztereomerek elválasztására épülő általánosan alkalmazott módszerét Pasteur több mint 160 éve kidolgozta. Mai ismereteink is ennek a jól kicsiszolt változataira épülnek. Ki kell választani azt a királis vegyületet, amelyikkel a racém vegyület, valamilyen oldószerből, frakcionált kristályosítással elválasztható diasztereomereket képez, melyek szűréssel elkülöníthetők. A kristályos diasztereomerből az egyik, az anyalúgban oldva maradtból pedig a másik enantiomert, a diasztereomerek elbontása után, elválasztják. Tehát egy racém vegyület reszolválásához a következő ismeretek szükségesek: reszolválóagens, oldószer, kristályosodás ideje, (kinetikus vagy termodinamikus kontroll érvényesül-e), a diasztereomerek elbontásának a módja és végül a kapott enantiomer keverékből a tiszta enantiomer elválasztása (konglomerátum, racemát viselkedés, kinetikus vagy termodinamikus kontroll fellépése).

Ezzel a módszerrel közel egyidőben, ugyancsak Pasteur alkalmazta először a racém vegyület enantiomerjeinek a másik lehetséges elválasztását az enzimkatalizált kinetikus reszolválást is. A módszer azon alapul, hogy a megfelelő enzim a racém vegyület egyik enantiomerjét kémiai reakcióval (pl. acilezés, hidrolízis stb) gyorsabban alakítja át mint a másikat, és ha elég nagy a két enantiomer reakciósebessége közötti különbség, akkor 50%-os konverziónál a másik enantiomer változatlan marad és a két (nem enantiomer) vegyület már elválasztható.

Tehát egy racém vegyület enantiomerjei enzim katalitikus kinetikus reszolválással (miután már nem enantiomerek) elkülöníthetők, ha a következőket ismerjük: a megfelelő enzim, megfelelő reagens, oldószer, a reakció optimális hőmérséklete, reakcióidő, a reakció követésének módszere, és az eltérő kémiai karakterű két vegyület elkülönítésének az eljárása.

A szerves kémiai reakciókhoz képest mindkét módszer hátránya, hogy a királis reagens (reszolválóagens vagy enzim) kiválasztásának nincsenek általános szabályai. Nagy kísérleti munkát és rutint igényel. A diasztereomer elválasztáson alapuló eljárással a gyakorlatban nem lehet tiszta enantiomerhez, csak enantiomer keverékekhez jutni és ezért szükséges a diasztereomer egy (vagy többszöri) átkristályosítása, vagy az enantiomer keverék újra reszolválása, vagy az enantiomer keverék további tisztítása (pl. átkristályosítása). Az enantiomer keverék tisztítása során ügyelni kell a racemát vagy konglomerátum viselkedés következményeire is. A nem reszolvált racém hányadot vissza kell forgatni. Ezek a reszolválási eljárások robusztus technológiák kidolgozására alkalmasak.

Az enzimkatalitikus kinetikus resolválással bármelyik enantiomer (vagy származék) enantiomer-tisztán különíthető el a reakcióelegyből, még akkor is ha az enzim kedvezőtlen enantioszelektivitása miatt az enantiomer keverékkel meg kell ismételni a resolválást. Ezek igen nagy műszerezettséget és felkészültséget igénylő eljárások.

Vitathatatlan tehát, hogy megfelelő szerkezetű racém vegyületek enantiomerjeinek az elválasztására igen előnyös az enzimkatalitikus kinetikus resolválás alkalmazása és ezt a Jelölt rendkívül szellemes, intuitív kísérleti munkájának eredményei az eddigieknél is jobban igazolják. Ugyanis az előállított enantiomereket más módszerek, például a diasztereomerek elválasztásán alapuló eljárások alkalmazásával nem is lehetett volna előállítani. Tehát a dolgozatban leírt resolválási eljárásoknak nincs alternatívája, amit a témában megadott szabadalmi eljárások is igazolnak. A kidolgozott eljárások méretnövelhetőek, ami a gyakorlati felhasználás alapfeltétele. Mindezek után az értekezés szerint a Jelölt legfontosabb eredményei a következők:

- Az enzimes reakciók követésére enantioszelektív analitikai módszert dolgozott ki, így sorozatban végzett előkísérletekkel optimalizálta a reakciókörülményeket.
- Megoldotta az enantiomerek, a termékek szétválasztását, szerkezetigazolását, tisztaságvizsgálatát.
- Adott esetekben eljárás kombinációkat dolgozott ki.
- Indirekt enzimes módszereket dolgozott ki karbociklusos β -laktámok resolválására N-hidroxi-metilezett racémek egyik enantiomerjének O-acilezésével. Ezzel Anatoxin intermediereket szintetizált.
- Indirekt enzimes módszereket dolgozott ki aciklusos β -laktámok resolválására N-acetoxi-metilezett származékok szelektív hidrolízisével.
- A cisz-3-acetoxi- β -laktám származékokat ugyancsak szelektív hidrolízissel resolválta.
- Direkt enzimes módszereket alkalmazott β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására és javaslatot tett a lejátszódó folyamatok sztereokémiájára, értelmezésére.
- Eljárást dolgozott ki karbociklusos β -aminosavak szintézisére és előállította a ciszpentacint valamint homológ származékait.
- Szintetizált telítetlen karbociklusos cisz-2-amino-1-cikloalkán-karbonsavakat ugyancsak gyűrűnyitást alkalmazva.

- Oldószermentes eljárásokat dolgozott ki enzimes resolválásokra.
- Nagy gyűrűtagszámú transz β -aminosavakat állított elő gyűrűnyitással.
- A 4-aril-szubsztituált β -laktámok szelektív hidrolízisével a megfelelő β -aminosavak illetve β -laktámok enantiomerjeihez jutott.
- A cisz-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidinon szelektív gyűrűnyitásával a Taxol-oldallánc kulcs-intermedierjét állította elő.
- γ -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitásával az N-védett és szabad NH funkciójú enantiomerekhez jutott. A nem védett laktámok esetében a reakcióelegyből az aminosavat szűréssel különítette el, így előállította az Abacavir és Carbovir szintézisének a kulcs-intermedierjeit.
- A β -amino-észterek szelektív hidrolízisével karbociklusos cisz és transz aminosavak, ill. aminosav észterek enantiomerjeit állította elő.
- A β -aril és heteroaril szubsztituált és β -arilalkil-szubsztituált β -amino-észterek szelektív hidrolízisével kapott reakcióelegyeket szerves-vizes extrakcióval dolgozta fel és így állított elő többek között Sitagliptin intermediert.
- A Taxol oldallánc kulcsintermedierjét a megfelelő β -amino-észterek szelektív hidrolízisével is előállította.
- A Taxol oldallánc kulcsintermedierjét a cisz-3-acetoxi-4-fenil-azetidinon ugyanazon enzimmal végzett hidrolízisével és szelektív gyűrűzárásával is előállította, a módszert enzimes domino reakciónak nevezte.
- Kidolgozta a dupla derivatizálás módszerét az aminosavak gázkromatográfiás elválasztására, mely lehetővé tette az enzimes reakciók követését.

Mindezekből az is következik, a téziseit elfogadom.

A felsorolt eredményeiről 22 közleményben és 2 szabadalmi leírásban számolt be, melyek közül 18 esetben az első szerző. Az értekezését ezekre a közleményeire hivatkozva állította össze, de eredményei csak a folytatását képezik a 9 enzimes, a 18 munkájához alapanyagokat szolgáltató szintetikus munkáról szóló közleménynek, illetve 23 szintetikus és analitikai tárgyú közleménynek, melyeknek ugyancsak társszerzője. Ez az összesen 74 közlemény 2000 és 2010 között jelent meg.

Az értekezés igen jól felépített és megszerkesztett munka, mely mértéktartóan mutatja be a jól rendszerezett eredményeket, a megállapításai logikusak, helytállóak végig érdekfeszítő olvasmány.

Néhány nyilvánvaló elírást találtam:

- 21. oldal 4. sor (R)-3-amino-3-(3,5-diklór)propionsav (nyilván diklór fenil)
- 42 o. alulról 3. sor optimalizültunk (optimalizáltunk)
- 47. o. 16 táblázat 1. és 3. sor a jelentős időfüggést érdemes lenne kiemelni
Alulról 2. sor i Pr_2O -ben (2. sor -19 táblázat)-ott 1,4 –dioxán van
- 56. o. alulról 11. sor „ eljárst” - helyett „eljárast”.

Kérdéseim:

- Mivel magyarázható, hogy ha a királis C atomhoz arilalkil csoport kapcsolódik (61. o.) más konfigurációjú aminosavészter hidrolizál mint akkor, ha az aromás, vagy a heteroaromás gyűrű közvetlenül kapcsolódik hozzá?
- Milyen megfontolás alapján választotta az additív vegyületeket (64. o., 29. táblázat).
- Milyen lehetőséget lát az alkalmazottaktól lényegesen nagyobb molekula méretű racém vegyületek enzimikus reszolválására?
- Milyen módon lehetne reaktív funkciós csoportot nem tartalmazó racém vegyületek enzimikus reszolválását megoldani?
- Egynél több enzim együttes alkalmazása milyen újabb reszolválási lehetőségeket biztosíthatna, például észter hidrolízis, gyűrűnyitás, vagy más reakciók esetében? Egyáltalán az enzimek keverékei javíthatják-e az egyedi enzimekkel elérhető eredményeket?

Az értekezésben összefoglalt munkák megtervezése, kivitelezése, jól átgondolt, mértéktartó, de gyakran igen szellemes értékelése, bizonyításai kiváló szakembert mutatnak be.

Az értekezés szerkesztése, fogalmazása, kiállítása példaértékű.

Eredményei és munkássága alapján javaslom Forró Enikő MTA doktori értekezése nyilvános vitájának a kitűzését és ennek alapján az MTA Doktora cím odaítélését.

Budapest. 2011. március 28.

Fogassy Elemér