

Válasz Dr. Mező Gábor MTA doktora opponensi véleményére

Megköszönöm opponensemnek „Ciklusos béta-aminosavak szelektív és sztereokontrollált funkcionálizálásai” című MTA doktori értekezésemre adott alapos és kedvező bírálatát.

Az opponens kérdéseivel, megjegyzéseivel kapcsolatos válaszokat, magyarázatokat az alábbiakban sorolom fel:

1. ... az opponensben egy kis hiányérzet maradt amiatt, hogy az előállított vegyületek jelentős részét egy olyan stádiumban fejezte be, amikor még nem alkalmasak a peptidekbe történő beépítésre. Nagyon jó lett volna látni, hogy az utolsó lépések (pl. védőcsoportok eltávolítása vagy éppen beépítése) nem okoznak-e valamilyen problémát a vegyületek felhasználható formába hozásakor.

Jóllehet a dolgozatnak nem volt tárgya a szintetizált kismolekulák peptidkémiai alkalmazhatóságának vizsgálata, egyértelműen jobb lett volna, a munka hasznosságának további bemutatásához, ha néhány esetben a védőcsoportok eltávolításával peptidekbe történő beépítésüket is elvégeztük volna. Jelen munkánkban a szelektív és kontrollált funkcionálizációs technikák kidolgozása volt a célunk, főként a racém származékok előállítására. Azonban figyelembe véve, hogy kutatócsoportunkban nemrégén új, hatékony, áramlásos technikán alapuló eljárást dolgoztak ki peptidek szintézisére, amely rövidebb reakcióidő alatt és mindössze 1.5 ekvivalens aminosav felhasználásával történik (ChemSusChem 2014, 7, 3172-3176), a jövőben tervezzük az előállított vegyületek enantiomerjeinek és más hasonló típusú polifunkcionalizált származékoknak, a fenti eljárás alkalmazásával történő peptidkémiai felhasználását.

2. ... az alkalmazott hivatkozások különböző típusú jelölése zavaró egy kicsit, még akkor is, ha érthető a logikája, amit a bevezetés végén el is magyaráz a jelölt.

A hivatkozások megadása a dolgozatban valóban nem szokványos. Ezért is tartottam fontosnak ezt megemlíteni már a dolgozat elején. Véleményem szerint ezt a rendszert alkalmazva gyorsan kiderül, mely saját közlemények képezik a dolgozat alapját. Ezen kívül könnyebben áttekinthető a dolgozat az eredeti publikációk esetleges gyors felhasználásával.

3. ... bizonyos mondatoknál feleslegesnek érzem a többes szám használatát (pl. „A dolgozat első felében a karbociklusos és heterociklusos béta-aminosavak, majd ezután a funkcionális ciklusos aminosav származékok relevánsabb jellemzőit mutatjuk be.”

Helyénvaló opponensem megjegyzése, míg az eredeti közleményeknél a többes szám első személy használata a szokásos, jelen dolgozatban célszerűbb lenne az egyes szám első személy használata.

4. .. a ciszpentacin antifungális hatása valamennyi gombafajta esetén IC_{50} (mg/L) = 0,13 értéket mutat?

Köszönöm a megjegyzést. Valóban nem egyértelmű a megfogalmazás. A fenti érték a *Candida albicans* elleni *in vitro* hatást jelöli.

5. A 38-as vegyület cisz-N-Boc-4-aminopirrolidin-3-karbonsav ezen a néven megkülönböztethető a 18-as (A-87380) vegyülettől? Vagy inkább S és R jelöléseket kellene használni? Mire vonatkozik a cisz?

Köszönöm az észrevételt. Helyes lett volna, ha mindkét szerkezet (18 és 38) esetében a kiralitáscentrumok abszolút konfigurációját adom meg. A cisz előtag itt a relatív térállásra utalna, de így az abszolút konfigurációk megadásával ez szükségtelen lenne.

6. Már a bevezetőben említette a jelölt, hogy „A különböző kémiai átalakítások során tapasztalt szelektivitások a rendelkezésünkre álló spektroszkópiás módszerekkel detektálható szelektivitásra értendő (nyers elegy NMR mérése), hasonló módon történtek az izomerek arányainak meghatározásai, a termelések pedig minden esetben az izolált (kromatográfia, kristályosítás mennyiségekre vonatkoznak)”. Egy általános kérdésem van ezzel kapcsolatban. Az alkalmazott 400-500 MHz-es NMR készülékkel milyen biztonsággal lehet ezt megállapítani egy olyan nyerstermék elegy mintájából, amiből csak 15-20%-os hozammal lehet a kívánt terméket izolálni?

A reakciók során fellépő termékarányokat, izomerarányokat első körben a reakcióelegy ^1H -NMR mérésével próbáltuk meghatározni. Azonban számos esetben, főleg amikor a forralás, a hosszabb reakcióidő során nagyobb mennyiségű polimer anyag is képződött, vagy ha a kívánt

izomer csak 15-20%-ban képződött a nyers NMR spektrumok elemzése nehéz és igen pontatlan lett volna. Az ilyen esetekben egy szilikagélen történő gyors szűrést végeztünk, és a bepárolt nyerstermék NMR spektrumait elemeztük. Így már jól kivehetők voltak az izomerarányok, amelyek összhangban voltak a tisztítás és izolálás során nyert tiszta termékek arányaival is.

7. Később egy másik ábránál ugyan történik magyarázat arra, hogy pl. a 41. ábrán miért történik más-más izomer keletkezése 0°C-on illetve 20°C-on, de talán már itt az első ilyen reakciónál érdemes lett volna kitérni rá. Mint ahogy jó lett volna látni azt, hogy a 42. ábra anyagai hogy készültek.

Helyénvalónak találom a megjegyzést, már a 41. ábra bemutatásánál célszerű lett volna a 142 és 143-as vegyületek képződését a 141-es anyagból részletesen magyarázni. A 20 °C-on, 20 óra után az 1-es szénatomon, az aktív hidrogén jelenléte miatt lejátszódó izomerizáció nem derül ki sem az ábrából sem a szövegből. A 42. ábrán feltüntetett vegyületek szintézisei, a *transz*-2-aminociklohex-4-énkarbonsavból, valamint a *cisz*-2-aminociklohex-3-énkarbonsavból kiindulva történtek hasonló technikával, mint ahogy a 41. ábrán mutattam be. Ezt célszerű lett volna megjelölni a szövegben.

8. Mivel a dolgozat címéhez közvetlenül nem tartozik a három oldalra kiterjedő „3.1.4.2. Funkcionalizált aciklusos béta-aminosavak szintézisei” rész, ezért ezt el lehetett volna hagyni, és helyette inkább a témához szorosabban kapcsolódó részeket lehetett volna egy kicsit jobban kifejteni.

Egyetértek a megjegyzéssel, ez a fejezet kissé kilóg a sorból. Mivel ezek a nyíltláncú származékok ciklusos béta-aminosavakból készülnek el, így érdemesnek tartottam ezeknek a szintéziseit is bemutatni.

9. Az 55. és 56. ábrán fontos lett volna feltüntetni, hogy az epimerizáció (206 és 209 vegyületek keletkezése) mennyi idő alatt játszódik le (a megfelelő cikkből 72 óra látszik). Mivel ezekben a reakciókban a termék csak 43-44%-kal voltak izolálhatók, a kérdés, hogy mi volt még mellettük. A cikkből az látszik, hogy az át nem alakult másik izomertől kellett elválasztani. Vagyis itt nem egy szelektív szintézislépés, hanem pont egy racemizáció játszódik le, ha jól értem.

Valóban informatív és helyesebb lett volna mindkét ábrán a reakcióidők megadása. A bázisos környezetben, az aktív hidrogén részvételével történő izomerizáció egyensúlyi folyamat, a hosszú reakció idő ellenére is, e héttagú gyűrűs vegyületeknél diasztereomer (cisz-transz) keverék volt detektálható. A diasztereoizomereket oszlopkromatográfiás módszerrel ugyan elválasztottuk egymástól, azonban a kívánt transz sztereoizomer izolált mennyisége relatíve alacsony volt.

10. A 62-es ábrán bemutatott 229-es anyagnál miért nem ortogonális védőcsoportot alakítottak ki az új aminocsoporton. Ez relevánsabb lenne peptid kémiai szempontból. Ez felvetődik a 63-as ábrán bemutatott anyagok esetén is, még akkor is, ha ezeket módosított peramivir értékes prekursorainak tekintik. Számomra ez a megállapítás kicsit erőltetettnek tűnik a szerkezetek összehasonlítása alapján.

Köszönöm opponensem javaslatát. Őszintén szólva, az ortogonális védőcsoportok kialakítására, a kísérletek végrehajtásakor mi nem is gondoltunk. Valóban érdekes, ortogonálisan védett vegyületekhez jutottunk volna, ha a Boc helyett például a Cbz védőcsoportot alakítottuk volna ki. Egyetérték a megjegyzéssel, helytelen peramivir prekursorokról beszélni a 63-as ábra kapcsán, helyesebb lett volna talán a peramivir analógok prekursorait említeni.

11. A metatézis reakciókkal kapcsolatban a kérdésem; lehet-e valamivel magyarázni, hogy miért hatékonyabb az egyik Grubbs katalizátor az egyik esetben és máskor a másik? Lehet-e tervezni, hogy mikor melyiket érdemes használni, vagy mindig próbálkozni kell?

A metatézis kísérleteket megelőzően számos irodalmi adatot áttekintve, az volt a meglátásunk, a legtöbb esetben keresztmetatézist sikeresen a Hoveyda-Grubbs-2 katalizátor jelenlétében végeztek el. Azonban jelenlegi ismereteim szerint a metatézis reakciók lefolyása nagyon sok esetben mind a szelektivitásra mind a kitermelésre vonatkozóan előre megjósolhatatlan. A reakciók a legtöbb esetben szubsztrátfüggőek, lényeges az alkalmazott olefin elektronhiányos illetve elektronban gazdag természete, a szubsztráton levő funkciócsoportok elektronos tulajdonságai és relatív térszerkezete, vagy az alkalmazott katalizátor típusa is. A mi konkrét esetünk is ezt igazolta, a reakciókat a négy különböző katalizátorral elvégezve különböző izomerekkel más-más eredményre jutottunk. Megemlíteném, hogy újabb típusú katalizátorok

kipróbálását tervezzük a jövőben (Chem. Eur. J. 2008, 14, 806 – 818; J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11360-11370; Chem. Rev. 2015, 115, 871–930; Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 4389–4408).

12. A fluortartalmú ciklusos béta-aminosavak szintézisével kapcsolatban a következő kérdéseim merültek fel; a 85. ábrán bemutatott reakcióban két izomer keletkezett 31 és 42%-os termeléssel. A DAST és a Deoxofluor helyett nem próbálták ki a többi említett fluorozó szert, amelyek más mechanizmus szerint reagálnak, a sztereoszelektivitás növelése érdekében? Számomra az sem teljesen világos, hogy az XtalFluor-E miért nem generál F⁻ iont a 80. ábrán bemutatott reakcióban és miért igen a 94. ábrán lejátszódó reakcióban? Mennyire stabilak a kialakított fluor-származékok savra és bázisra, amelyek a védőcsoportok eltávolításához szükségesek, hogy peptidekbe lehessen építeni ezeket.

A 85-ös ábrán látható transzformációt DAST és Deoxofluor reagensek mellett XtalFluor illetve Fluolead (2,4,6-trimethylbenzolkén-trifluorid) reagensekkel is végrehajtottuk. Fluolead-el nem történt fluorozás, hanem intramolekuláris S_N reakció során oxazolidinonvázis vegyület (Eur. J. Org. Chem. 2011, 4993–5001) képződött, míg az XtalFluor-E jelenlétében hosszú reakcióidő után alacsony konverzióval csak igen kismértékben képződött fluortartalmú termék.

Mindkét átalakulás során (80. ábra és 94. ábra) a fluorid-ion a nukelofil, ez valóban nem derül ki a 80-as ábrából, amit célszerű lenne pontosítani (J. Org. Chem. 2010, 75, 3401–3411).

A fluortartalmú származékok továbbalakításait, a védőcsoportok eltávolítását tervezzük, ezek peptidkémiai felhasználása egy további pályázatunk részét képezik, az ehhez kapcsolódó kísérleteket a közeljövőben fogjuk elvégezni.

13. A 302-es vegyületet nem nevezném glicinészternek. Pontosabban kellett volna megadni a vegyület megnevezését. Egyébként ez a 3.3. rész nagyon elnagyolt, így szerintem jobb lett volna elhagyni és a felszabadult helyett inkább a korábbi témák részletesebb kifejtésére használni.

A 302 vegyület, ami glicinészterekből készül, megnevezése valóban helytelen. A helyes neve etil-, metil- illetve *terc*-butil2-(difenilmetiléneamino)-acetát lehet. A 3.3. fejezet eredményei felületesen kerültek bemutatásra, talán el lehetett volna hagyni, azonban úgy éreztem a funkcionizált azetidinváz kialakítása értékes eredmény szintetikus kémiai szempontból. Így kerültek ismertetésre e vegyületeknek a szintézisei.

14. A 3.4. részben leírt (epi)tasromin szintézise hogy viszonyul az irodalomban leírt más módszerekkel történt előállításokhoz? Vagyis érdemes-e az itt leírt szintézis utat követni (bonyolultság, kitermelés, ár)?

A két alkaloid szintézisét, mint egy újabb alternatív szintetikus megközelítést mutattuk be. Az irodalomban már korábban ismert 13 szintézismódszerrel összehasonlítva elmondható, hogy habár az általunk kidolgozott módszer reakciólépéseinek termelése közepesek, az egyszerű és olcsó kiindulási vegyületek illetve reagensek felhasználása, valamint az egyszerűen kivitelezhető átalakítások miatt viszonylag hatékony eljárásnak tekinthető. Fontos előnye még, hogy a módszer sztereokontrollált, a végtermékekben a kiralitáscentrumok konfigurációját predeterminálja a kiindulási vegyületek szerkezete. Hátránya viszont a toxikus és drága ozmiumvegyület használata.

Köszönöm opponensem a dolgozat tartalmára illetve az ábrákra vonatkozó további észrevételeit, megjegyzéseit, javaslatait. Sajnálatos, hogy többszöri áttekintés után is a dolgozatban maradtak elírások, hibák.

15. 4-es vegyület azonos az Irodalmi háttér rész 10-es vegyületével.

16. A 11-es számú tilidin esetében azonban egy fölösleges H maradt a N-atomon. Az 5-ös ábrán a ciszpentacin származékoknál a HCl sókat talán szerencsésebb lett volna ionos formában jelölni. Az icofungipen 9-es vegyület nevében 4-metilidént kellene használni 4-metilén helyett. Magyar nyelvű dolgozatban a tizedes vessző használata célszerű a tizedes pont helyett (ld. a IC50 értékeket).

17. A 9. oldalon az szerepel, hogy az orizoximicin (62-es anyag, lásd 14. ábra). Valójában ez a 16. ábrán szerepel. A bagougeramine A (36-os számmal van jelölve, míg az ábrán 35-ös szám alatt szerepel (itt a nevében az e a végén nem szerepel).

18. A 18. ábrán a 72-es vegyület (laninamivir) nem tűnik a zanamivir (68-as vegyület) béta-aminosav módosított analógjának.

19. A folyamat ábrákban nem tartom szerencsésnek a h és min jelöléseket az időtartamra egy magyar nyelvű dolgozatban.

20. A 28. ábrán a racém biciklusos laktám (83-as vegyület) esetén nem kellene a sztereoizomert jelölő megvastagított vonalak.

21. Nem tartom helyesnek a sok helyen használt béta-aminoészter kifejezést a béta-aminosav észter helyett.

22. A 61-es ábrán és más hasonló ábrákon, ahol csak felsorolás szintjén lettek bemutatva az új vegyületek, érdemes lett volna feltüntetni az adott vegyületek kitermelési adatait.

A fentebb felsorolt észrevételekkel, megjegyzésekkel, javaslatokkal mind egyetértek, a javításokat illetve módosításokat el fogom végezni.

Végezetül még egyszer megköszönöm opponensem méltató szavait, alapos, gondos és konstruktív bírálatát. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Szeged, 2016. március 24.



Kiss Loránd