

**„Új enzim-katalizált módszerek kifejlesztése és alkalmazása a gyógyszerkutatásban jelentős enantiomertiszta vegyületek előállítására” pályázat (K 71938)
záró beszámolója**

Új direkt enzimes módszert dolgoztunk ki a γ -laktámok *Candida antarctica* B lipáz-katalizált enantioszelektív gyűrűnyítására, melynek segítségével több-grammos tételben állítottunk elő ciklusos γ -laktám és γ -aminosav enantiomereket (köztük a blockbuster Abacavir és Carbovir antivirális gyógyszerek egyik kulcs-intermedierét, az (1*S*,4*R*)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsavat). Jóllehet ez a munka a 2007-ben készített időrendi ütemezés szerint a pályázat utolsó évére volt tervezve, az irodalomban felfokozott jelentőségének köszönhetően a legsürgősebben megvalósítandó célkitűzésünké lépett elő. Az eljárás szabadalmaztatása megtörtént (E. Forró, F. Fülöp PCT/WO/2009007759 A1 (15.01.2009). Az eredmények egy részét szintén publikáltuk (E. Forró, F. Fülöp *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *31*, 5263).

Az irodalomban elsőként végeztünk enzimes reakciókat laktám enantioszelektív gyűrűnyítására oldószer nélküli közegben. Az új „zöld” módszert sikeresen alkalmaztuk a ciszpentacin és különböző származékainak enantiomertiszta formában történő szintézisére (E. Forró; F. Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1005).

Új, irányított kinetikus dinamikus enzimes rezolválási módszert dolgoztunk ki a 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-1-karbonsav enantiomerek előállítására (T.A. Paál, A. Liljebblad, L.T. Kanerva, E. Forró; F. Fülöp *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *31*, 5269; T.A. Paál, E. Forró; F. Fülöp, A. Liljebblad, L.T. Kanerva *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 2784).

Igen hatékony enzimes rezolválási módszert dolgoztunk ki farmakológiai szempontból jelentős enantiomertiszta β -aril- és β -heteroaril-szubsztituált β -aminosavak szintézisére a megfelelő racém amino észterek *Burkholderia cepacia* lipáz-katalizált enantioszelektív hidrolízisére szerves közegben (G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2072; G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1771).

Enzim-katalizált kinetikus módszert dolgoztunk ki az etil 3-amino-2-etilpropanoát és a metil 3-amino-2-izopropilpropanoát rezolválására az amino csoport *Candida antarctica* A lipáz-katalizált aszimmetrikus acilezésén keresztül (M. Fitz, E. Forró, E. Vigóczki, L. Lázár, F. Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *9*, 1114).

Elsőként dolgoztunk ki mind karbocklusos *cisz* és *transz*, mind pedig aciklusos β -aminosavak gázkromatográfiás enantioszeparálását (E. Forró *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1025). Habár az általunk dupla derivatizálásnak nevezett stratégiát nem kvantitatív meghatározás céljával terveztük, igen jó validálási eredményeket mutatott.

Könyvfejezetet állítottunk össze *Karbociklusos β -aminosavak szintézise* cím alatt, melyben az enantiomertiszta β -aminosavak szintézisére kidolgozott direkt és indirekt enzimes stratégiák is bemutatásra kerülnek [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].

Alapkutatás céljából, a karbociklusos és aciklusos β -aminosav enantiomerek szintézisére kifejlesztett direkt enzimes módszerek némelyikét méretnöveltük, több-grammos tételben (> 5 g) állítottuk elő a kívánt enantiomereket. Ezen enantiomerek képezték és folyamatosan képezik az alapját számos együttműködésnek (L. Kiss, E. Forró, R. Sillanpää, F. Fülöp *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 2856; L. Kiss, E. Forró, R. Sillanpää, F. Fülöp *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 551; K. Huang, D.W. Armstrong, E. Forró, F. Fülöp, A. Peter *Chirality* **2009**, *69*, 331; I. Ilisz; R. Berkecz; E. Forró; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter *Chirality* **2009**, *21*, 339; L. Kiss, M. Nonn, E. Forró, R. Sillanpää, F. Fülöp *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2605; A.R.M. Hyyryläinen, J.M.H. Pakarinen, E. Forró, F. Fülöp, P. Vainiotalo *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1235).

Direkt enzimes eljárást dolgoztunk ki β -arilalkil-szubsztituált β -aminoészterek szerves közegű, enantioszelektív hidrolízisére (G. Tasnádi; E. Forró; F. Fülöp, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886). Kiváló enantioszelektivitást ($E > 100$) kaptunk, amikor a reakciókat *Burkholderia cepacia* lipáz PS katalízissal, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-ben vagy *t*-BuOMe-ben, 25 vagy 45 °C-on végeztük. A termék aminoészter és aminosav enantiomereket szerves-vizes extrakcióval vagy szűréssel 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.

Hatékony, direkt enzimes stratégiát dolgoztunk ki a racém *cisz*-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidion enantioszelektív ($E > 200$) gyűrünyítésára (E. Forró; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3074). A célmolekula (*2R,3S*)-3-fenilizoszerint, 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) katalízissal, *t*-BuOMe-ben, 60 °C-on végeztük. A termékeket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét. Ugyanakkor, 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, egymást követő két reakció eredményeként két különböző terméké alakult. Így, a *cisz*-3-acetoxi-4-fenil-azetidion-2-on *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált hidrolízise során jó termeléssel (> 43%) kaptuk a két különböző, enantiomertiszta ($ee \geq 98\%$) terméket [egyik a (*2R,3S*)-3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionsav, a Taxol kulcs-intermedierje]. Fontos kiemelni, hogy a jelen szubsztrát két teljesen különböző egysége vett részt a Lipolase katalízissal, 0,5 ekv. hozzáadott H₂O-el, *i*Pr₂O-ben, 60 °C-on végzett átalakításban: a C-3 észter hidrolízise és az amid kötés hidrolitikus hasítása.

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 (E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 637). Kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$) értünk el *Burkholderia cepacia* PS-IM lipázzal, 0,5 ekv. hozzáadott vízzel, *i*Pr₂O-en, 50 °C-on és nyertük jó enantiomerfelesleggel ($ee \geq 98\%$), jó termelés mellett ($\geq 45\%$) a termékeket, melyek szétválasztását szerves-vizes extrakcióval végeztük.

Enzimes eljárást dolgoztunk ki enantiomerdús hidroxi-szubsztituált β -aminoészterek szintézisére, azonban a *Candida antarctica* B lipáz-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 enantiomerfeleslegekkel izolálni (E Forró; L. Schönstein; L. Kiss; A. Vega-Peñaloza; E. Juaristi; F. Fülöp, *Molecules* **2010**, 15, 3998).

A sikeresen méretnövelt enzimes eljárásainkkal több-grammos tételben előállított enantiomereink képezték az alapját sikeres együttműködéseinknek (G. Benedek; M. Palkó; E. Wéber; T.A. Martinek; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2220; Z. Patai; R. Berkecz; I. Ilisz; E. Forró; F. Fülöp; A. Péter, *Chirality* **2010**, 22, 120; B. Kazi; L. Kiss; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 82; L. Kiss; E. Forró; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Synthesis-Stuttgart*, **2010**, 153; A.R.M. Hyyryläinen; J.M.H. Pakarinen; E. Forró; P. Vainiotalo, *J. Mass. Spectrom.* **2010** 45, 198; Z. Pataj; I. Ilisz; E. Forró; A. Aranyi; F. Fülöp; D.W. Armstrong; A. Péter, *Chromatographia* **2010**, 71, 13; L. Kiss; E. Forró; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 3599; K. Németh; E. Varga; R. Iványi; J. Szemán; J. Visy; L. Jicsinszky; L. Sente; E. Forró; F. Fülöp; A. Péter; M. Simonyi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53, 382; G. Fodor; I. Ilisz; J. Szemán; R. Iványi; L. Sente; G. Varga; E. Forró; F. Fülöp; A. Péter, *Chromatographia* **2010**, 71, 29; M. Palkó; G. Benedek; E. Forró; E. Wéber; M. Hänninen; R. Sillanpää; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 957; B. Kazi; L. Kiss; E. Forró; I. Mándity; F. Fülöp, *Arkivoc* **2010**, (ix) 31).

Új totál szintézist dolgoztunk ki a *Carduus crispus* fodros bogáncsból izolált, daganatellenes hatással rendelkező Kriszpin A alkaloid enantiomereinek ($ee > 95\%$) előállítására (E. Forró; L. Schönstein; F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, 22, 1255). Az eljárás egy *Burkholderia cepacia* lipáz-katalizált primer *OH* aszimmetrikus acilezési lépést, vagy a megfelelő észter enantioszelektív hidrolízisét feltételezi. Jóllehet a királis centrumtól 4-atomnyi távolságra lévő reakció centrum enzimes átalakítása igazi kihívást jelentett, az optimalizált körülmények között, 2-lépésben végzett preparatív mennyiségű rezolválások kiváló enantiomerfeleslegekkel ($ee > 94\%$) eredményezték mind az alkohol, mind pedig az észter enantiomereket.

A „zöld” kémia törekvéseinek jegyében enzim-katalizált kinetikus rezolválási eljárásokat optimalizáltunk szuperkritikus közegben. A már szerves közegben, korábbiakban vizsgált két szubsztrátunk, a 4-fenil-2-azetidion *Candida antarctica* B lipáz-katalizált enantioszelektív hidrolízisét, valamint a *transz*-2-cianociklopentanol *Candida antarctica* B lipáz-katalizált, vinil-acetáttal végzett aszimmetrikus acilezését kiváló enantioszelektivitás ($E > 200$) mellett végeztünk szuperkritikus CO₂-ban (M. Utczás; E. Székely; G. Tasnádi; É. Monek; L. Vida; E. Forró; F. Fülöp; B.

Simándi, *J. Supercrit. Fluid* **2011**, *55*, 1019; M. Utczás; E. Székely; E. Forró; F. Fülöp; B. Simándi, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3916).

Különböző enantiomertiszta 1,2,3-triazol-szubsztituált aminociklopentanolok, izoxazolinnal kondenzált új ciklusos β -aminoészterek, valamint fluorozott karbociklusos aminosavak és aminoészterek enantiomereit ($ee > 98\%$) állítottuk elő (L. Kiss; E. Forró; F. Fülöp, *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 220; M. Nonn; L. Kiss; E. Forró; Z. Mucsi; F. Fülöp, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 4079; L. Kiss; E. Forró; S. Fustero; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4993; L. Kiss; E. Forró; S. Fustero; F. Fülöp, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6528). A kiindulási enantiomertiszta vegyületek preparatív mennyiségben történő előállítását a megfelelő racém β - és γ -laktámok *Candida antarctica* B lipáz-katalizált enantioszelektív gyűrűnyitásával, valamint a megfelelő észterek enantioszelektív hidrolízisével végeztük. Néhány esetben kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$) kaptunk, amikor a reakciókat, a „zöld” oldószerként elfogadott *t*-BuOMe-ben, a megszokott magas hőmérsékleten (60 °C) végeztük. A hidrolízis eredményezte termék aminosav és el nem reagált laktám ill. aminoészter enantiomereket, az általunk már korábbiakban is alkalmazott szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.

Együttműködés keretében, néhány preparatív-mennyiségben (> 5 g) előállított β -aminosav enantiomer került további vizsgálatra (C.D. Chisholm; F. Fülöp; E. Forró; T.J. Wenzel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2289).

Fontos lépéseket tettünk az áramlásos kémia területén. A korábbiakban, kizárólag szakaszos üzemmódban végzett enzimes módszereinket bővítettük, ötvöztük az időközben beszerzett H-Cube készülékben, folyamatos üzemmódban végzett enzimes reakciók kivitelezésével. Így, a jól ismert, farmakológiai jelentőséggel bíró kalikotomin és homokalikotomin tetrahidroizokinolin-vázis aminoalkohol intermedierek enzimes rezolválására mind áramlásos, mind pedig szakaszos módszereket sikerült kidolgoznunk (L. Schönstein; E. Forró; F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *közlésre beküldve*). Jóllehet szekunder alkoholok enzim-katalizált aszimmetrikus acilezését már leírták folyamatos üzemmódban, primer alkoholok ilyen irányú rezolválására nem találtunk példát az irodalomban. Mi több, három homológ izokinolin-vázis aminoalkohol esetében vizsgáltuk az aktív OH királis centrumtól való távolságának hatását a *Candida antarctica* B lipáz-katalizált O-acilezésük enantioszelektivitására és sebességére.

Két összefoglaló közleményt írtunk a farmakológiai szempontból is jelentős β - és γ -aminosav enantiomerek előállítására mind direkt, mind indirekt, vízben, szerves oldószerben, oldószermentes közegben, ill. szuperkritikus közegben kidolgozott enzimes eljárásokról (Forró E., *Acta Pharm. Hung.* **2011**, *3*, 125; E. Forró; F. Fülöp, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *közlésre beküldve*).

Új többszörösen funkcionizált enantiomertiszta aminociklohexán karbonsavakat szintetizáltunk a több-grammos tételben, megfelelő racém β -laktám enzimes gyűrűnyitásával előállított (1*R*,2*S*)-2-aminociklohexán-1-karbonsavból (L. Kiss; E. Forró; F. Fülöp, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4438).

A „zöld” kémia törekvéseinek jegyében fontosnak tartom kiemelni, sikeresen méretnöveltük egyik, korábbiakban félmikro méretben, oldószermentes közegben kidolgozott enzim-katalizált kinetikus rezolválási eljárásunkat. Ily módon, az *exo*-3-azatriciklo[4.2.1.0^{2.5}]non-7-én-4-on *Candida antarctica* B lipáz-katalizált gramm-mennyiségű hidrolízisét oldószermentes közegben végeztük és kiváló enantioszelektivitás ($E > 200$) mellett kaptuk az enantiomertiszta β -laktámot, amelyből új, diszubsztituált cispentacin származékokat állítottunk elő (L. Kiss; M. Cherepanova; E. Forró; F. Fülöp, *Chem. Eur. J.* **2012**, *közlésre beküldve*).

Jelen pályázat ideje alatt 39 közlemény jelent meg ($\Sigma IF = 100,699$), melyek közül 19 közleményben ($\Sigma IF = 51,348$) mondtam köszönetet az OTKA támogatásért. 1 szabadalmunk és 1 könyvfejezetünk szintén megjelent. Jelenleg 3 közlemény, köszönettel az OTKA irányába (2) van elbírálás alatt. A legfontosabb eredmények hazai és nemzetközi fórumokon egyaránt bemutatásra kerültek.